

Авторы: Д.Н. Масюк, С.Г. Коляда, А.В. Кокарев, Н.Ю. Неверковец, Г.С. Мовкалова
 НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР БИОБЕЗОПАСНОСТИ И ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ РЕСУРСОВ АПК ДДАЕУ

Особенности лабораторной диагностики **актинобациллярной плевропневмонии свиней**

Актинобациллярная плевропневмония свиней (АПП) — инфекционное заболевание, характеризующееся поражением органов дыхания с развитием геморрагической, гнойно-некротической пневмонии и плеврита.

Возбудитель – микроорганизм *Actinobacillus pleuropneumoniae* — мелкая грамтрицательная капсулообразующая полиморфная палочка.

На сегодняшний день известно

2 биотипа, биотип I (NAD-зависимые) и биотип II (NAD-независимые). *A. pleuropneumoniae*, которые включают 15 серотипов микроорганизма. Все эти серотипы подразделяются на: высоко-, средне- и низковирулентные (см. **Таблицу 1**). АПП широко распространена во всем мире и поражает только свиней. Основным источником заболевания служат домашние свиньи, но исследования Vengust G. et al., 2006 показали,

что в Словении более 50% диких кабанов были серопозитивными по АПП, и возможно могли быть источником заболевания. Вспышки плевропневмонии были зарегистрированы у свиней практически во всех европейских странах, а также в США, Мексике, Южной Америке, Японии, Корее, Тайване и Австралии, и во многих других странах Европы, в том числе и Украине (см. **Таблицу 2**). Тем не менее, распределение серотипов, вызывающих вспышки в разных регионах мира радикально отличается. Поэтому, в хозяйствах, где принято решение о введении вакцинации против АПП, необходимо провести серотипизацию циркулирующего серотипа возбудителя (или нескольких).

По данным Desrosiers D. 2004, переболевшие животные могут оставаться переносчиками АПП в течение нескольких месяцев, главным образом из-за хронически пораженных легких и миндалин. При высоком иммунном статусе животных в хозяйстве и низкой виру-

Таблица 1. Вирулентность различных серотипов *Actinobacillus pleuropneumoniae*, Oliveira S., 2003

A. pleuropneumoniae			
Вирулентность	Высокая	Средняя	Низкая
Смертность	высокая	низкая	–
Поражения	обширные поражения легких	сильные поражения легких	низкое эпизоотическое значение
Серотипы	1, 5(a,b), 9, 10, 11, 14	2, 4, 6, 7, 8, 12, 15 (13)	в основном 3
Токсины	APX I+APX II	APX II+APX III	APX III
	APX IV		

лентности возбудителя, животные могут не болеть клинически, а становиться субклиническими носителями, при этом возбудитель локализуется в основном в миндалинах. В таком случае, правильная оценка статуса фермы по АПП проводится с помощью послеубойного мониторинга: осмотр состояния легочной ткани и отбор миндалин для обнаружения возбудителя.

Как правило, распространение возбудителя в стаде происходит за счет внедрения животных-носителей в группу к здоровым животным. Основным путем распространения заболевания является прямой контакт между инфицированными и здоровыми свиньями или воздушно-капельный способ передачи. Перемещение и смешивание свиней из разных групп увеличивает риск распространения заболевания. При первичном попадании в стадо, заболевание проявляется, в основном, в острой форме инфекции, со временем переходящую в хроническую и/или осложненную формы.

Внезапные вспышки АПП на благополучных фермах (Gottschalk M., 2006), в которые не завозили новое поголовье, обусловлены воздействием экзогенных стресс-факторов или конкурентных респираторных патогенов на животных-бактерионосителей.

нов на животных-бактерионосителей.

Клинические признаки заболевания изменяются в зависимости от возраста животных, состояния их иммунной системы, условий окружающей среды, и степени воздействия возбудителя инфекции.

При острой форме АПП у свиней отмечается повышенная температура тела до 41,5°C, проявляется апатия, и анорексия. Возможны единичные случаи краткосрочной диареи и рвоты. Больные животные лежат на полу без каких-либо проявлений респираторной патологии. Частота сердечных сокращений повышается, кожа носа, ушей, конечностей, а позже и все тело становятся синюшными. В заключительной стадии, появляется серьезная отдышка с дыханием через рот, животные остаются в сидячем положении. Незадолго до смерти, как правило, появляются обильные, пенистые, кровянистые выделения изо рта и ноздрей. Часто можно обнаружить одного или нескольких мертвых животных без клинических признаков с типичными пенистыми кровянистыми выделениями из носа. Экспериментальные исследования показывают, что заболевание может протекать и в молниеносной форме, при этом гибель животного происходит

через 3 часа после инфицирования.

Хроническая форма развивается после исчезновения острых симптомов. Полностью отсутствует лихорадка, наблюдаются спонтанный или прерывистый кашель различной интенсивности. Снижается аппетит, что способствует снижению скорости роста. Состояние животных чаще всего усугубляется другими респираторными инфекциями (например, микоплазмами, бактериями или вирусами).

Подобные актинобациллярной плевропневмонии патолого-анатомические изменения легочной ткани свиней отмечают также и при других инфекциях, поэтому следует проводить дифференциацию от чумы свиней, гриппа, пастереллёза и др. Также следует учитывать и сочетанное действие инфекционных агентов, что особенно актуально при циркуляции низковирулентных серотипов АПП.

Диагностика

В условиях промышленного свиноводства при большой концентрации поголовья, широко распространены ассоциативные болезни. Сложность их изучения заключается в наличии большого количества этиологических факторов и трудности их выделения и идентификации. Также следует учитывать, что нынешняя эпизоотическая ситуация в свиноводстве обусловлена повсеместным применением антибактериальных препаратов и вакцин. Все эти факторы обуславливают появлению атипичных форм инфекции.

В ассоциированных инфекциях могут участвовать возбудители разной патогенности и вирулентности. Три группы таких инфекций: сочетание только патогенных возбудителей; смешанные инфекции, объединяющие слабовирулентных, условнопатогенных возбудителей; сочетание патогенных и условнопатогенных возбудителей.

Поэтому, ключевым моментом диагностика АПП в стаде, является комплексные исследования с учетом эпизоотической ситуации, клинической картины, результатов патолого-анатомического вскрытия и комплекса лабораторных исследований.

Современная концепция лабораторной диагностики АПП характеризуется проведением прямых и непрямых методов выявления данного патогена. Наиболее распространенными в лабо-

Таблица 2. Географическое распределение серотипов *Actinobacillus pleuropneumoniae* Gottschalk M., Taylor D., 2006

Страна	Распространенные серотипы	Доминирующие серотипы
Бельгия	2, 3, 6, 7, 8, 9, 11	3
Бразилия	1, 3, 4, 5, 7, 9	5, 3
Канада	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15	5, 7, 1, 12
Хорватия	2, 7, 8, 9	2, 9
Чехия	1, 2, 4, 5, 7, 12	9, 2, 11
Дания	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12	2
Франция	2, 3, 7, 8, 9	9
Германия	2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10	9, 2, 7
Венгрия	1, 2, 3, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12	3, 2, 7
Италия	1, 2, 3, 4, 5, 7	5
Ирландия	3	3
Нидерланды	1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11	2, 9, 11
Норвегия	2	2
Польша	1, 2, 5, 9	1, 9
Испания	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12	4, 7, 2
Швеция	2, 3, 4	2
Швейцария	2, 3, 7, 9	2
Великобритания	1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10	2, 3, 8
США	1, 3, 5, 7, 8, 9, 15	1, 5

раторной практике прямыми методами являются — бактериологические, иммуногистохимические, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Непрямыми или косвенными методами лабораторной диагностики являются серологические исследования, в основе которых лежит определение специфических антител к возбудителю инфекции, наиболее широкое применение получил иммуноферментный анализ (ИФА).

Практикующие врачи ветеринарной медицины, при отправке биологического материала в лабораторию, должны учитывать и принимать во внимание надежность и достоверность различных методик. Для этого используют понятие диагностической специфичности и чувствительности, объективности и субъективности. Высокая чувствительность метода позволяет выявить специфический антиген или антитела, а высокая специфичность — подтвердить правильность результата. Как правило, чем выше чувствительность метода, тем ниже специфичность и наоборот. Поэтому, использование одного лабораторного метода не всегда позволяет правильно поставить или подтвердить клинический диагноз.

Одним из наиболее распространенных методов диагностики АПП есть бактериологические исследования. Первичное выделение АПП из легочной ткани осуществляется на 5% кровяном агаре с подсевом культуры «баккормилки». После аэробной инкубации на протяжении 18-24 часов (в присутствии 5% CO₂), возле зоны «баккормилки», появляются небольшие колонии, окруженные прозрачной зоной полного гемолиза — феномен сателлитного роста (что обусловлено NAD-зависимостью микроорганизма).



Это позволяет быстро подтвердить предполагаемый диагноз бактериологическим методом. Для некоторых серо-

типов (таких как 7 и 12), зона гемолиза, как правило, менее интенсивна. Альтернатива кровяному агару «шоколадный агар» или PPLO агар с добавлением NAD также позволяет расти микроорганизмам, но они сложнее выделяются в этих средах.

На сегодня, этот метод наиболее экономически обоснован (относительно низкая стоимость исследований), хотя и имеет определенные недостатки, такие как низкая чувствительность и необходимость квалифицированных специалистов. Следует отметить, что бактериологическую диагностику АПП оптимально применять для обнаружения патогена при острой/подострой формах болезни.

Для диагностики следует выбирать свежесквашенных животных, к которым не применялась антибактериальная терапия. Этот метод также хорош тем, что позволяет определить чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам.

В случаях необходимости диагностики хронической формы инфекции в хозяйстве или выявлении субклинических носителей, выделить культуру *A. pleuropneumoniae* бактериологическим методом практически невозможно. Это связано, с одной стороны, малым количеством возбудителя в тканях, а с другой — колонизацией лёгких другими микроорганизмами, которые могут подавлять рост *A. pleuropneumoniae* на питательных средах.

Присутствие *A. pleuropneumoniae* может быть выявлено в тканях с помощью иммуногистохимических исследований. Этот метод дает возможность выявления и определения точной локализации антигенов возбудителя АПП в гистологических срезах в результате их реакции с мечеными специфическими антителами, а также идентифицировать возбудителя в органах и тканях.

На сегодняшний день, наиболее высокоэффективным способом диагностики АПП является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Этот метод является наиболее чувствительным и высокоспецифичным. Он основан на выявлении фрагмента ДНК, являющегося специфичным для *A. pleuropneumoniae*. ПЦР позволяет четко, быстро и относительно недорого определить наличие уникальной последовательности генома.

Благодаря высокой чувствительнос-

ти, ПЦР позволяет проводить витальную диагностику АПП, обнаруживать латентно протекающую инфекцию, выявлять свиней-носителей *A. pleuropneumoniae*, оценивать качество антибактериальной терапии. Для прижизненной диагностики необходимо использовать мазки из миндалин, носовые выделения, которые отбираются с помощью одноразовых аппликаторов. Для посмертной диагностики используют миндалины, фрагменты легких с патологоанатомическими изменениями, средостенные лимфатические узлы.

Следует отметить, что обнаружение специфического для *A. pleuropneumoniae* участка ДНК методом ПЦР не дает возможность дифференцировать циркулирующий в стаде серотип. Учитывая тот факт, что большинство обычных стад инфицированы одновременно несколькими низкопатогенными серотипами, положительный результат сложно интерпретировать. Поэтому, для того чтобы, выявить циркулирующий тип *A. pleuropneumoniae*, необходимо провести секвенирование. Секвенирование на сегодня в Украине достаточно ограничено в использовании, а также довольно дорогое для применения в условиях промышленного свиноводства, поэтому наиболее часто используют серологическую типизацию.

Серологические методы широко используются для диагностики, контроля, лечения и профилактики вирулентных серотипов АПП. На протяжении многих лет стандартным тестом для диагностики АПП являлась реакция связывания комплемента (РСК). В настоящее время эта реакция используется редко, т.к. у нее низкая чувствительность и не все серотипы возможно идентифицировать. Этот метод может давать кросс-реакции с различными серотипами, а также с *Actinobacillus suis* и как следствие дают ложно-положительные результаты. Из недостатков следует отметить, что РСК достаточно трудоемка в исполнении. По данным Opriessnig T. et al, 2012, РСК является в настоящее время единственным критерием приемлемым для подтверждения того, что свиньи чистые по *A. pleuropneumoniae* для экспорта в Китай.

В настоящее время большинство лабораторий во всем мире, в том числе и наш научно-исследовательский центр, используют иммуноферментный анализ (ИФА), как наиболее технологичный метод для мониторинга и серотипи-

заций АПП. ИФА является наиболее эффективным методом для обнаружения субклинических форм инфекции АПП (Broes A., Gottschalk M., 2003). Некоторые страны, такие как Канада и Дания, для эпидемиологического надзора в племенных стадах систематически используют метод ИФА.

Серологическая диагностика АПП заключается в двух основных подходах. Первый направлен на выявление антител к токсину Арх IV, а второй – на выявление антител к длинной цепи липополисахаридов бактериальной стенки (LPS), что позволяет не только выявить животных, контактировавших с возбудителем АПП, но и идентифицировать их серотипы и контролировать качество вакцинации.

ИФА, определяющий антитела к токсину Арх IV, является высокоспецифичным для диагностики АПП, так как это единственный вид токсина, который продуцируют все серотипы *A. pleuropneumoniae*. Поэтому наличие положительного результата свидетельствует о контакте положительно реагирующих животных с одним или несколькими серотипами *A. pleuropneumoniae*. Данный ИФА тест рекомендуется использовать в стадах с неизвестным серологическим статусом для скрининга АПП. Следует учитывать, что этот тест может давать ложные положительные или отрицательные результаты, что усложняет диагностику.

Нужно учитывать, что и низковирулентные штаммы *A. pleuropneumoniae* также продуцируют токсин Арх IV. В таких случаях у животных могут регистрироваться высокий уровень антител в следствии инфицирования низковирулентными серотипами. Использование ИФА теста по выявлению антитела к токсину Арх IV в качестве диагностического инструмента для высоковирулентных серотипов будет не эффективным. Достоверные результаты при использовании этого теста могут быть получены,

при регулярном мониторинге здоровья стада, свободного от всех серотипов *A. pleuropneumoniae*. Из недостатков этого метода можно констатировать низкую чувствительность теста, а также ложноположительные результаты в случаях колонизации организма *A. suis*.

Вторым подходом в серодиагностике АПП является серотипизация циркулирующих в стаде типов АПП — выявление антител характерных для определенных серотипов *A. pleuropneumoniae* (1, 2, 3, 9, 11, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 15). Серотипизация имеет важное значение для выбора бактеринов, определения технологии их использования в качестве превентивной стратегии, а также позволяет оценить стадо на наличие различных серотипов АПП при мониторинге. Особо важно использование данного теста при определении доминирующих серотипов в стаде и понимания этиологической структуры серотипов АПП животных на карантине. Во избежание перекрестные реакции при проведении серотипизации рекомендуется проводить исследования 2-3 раза с интервалом в несколько недель.

Высокоэффективным способом диагностики и контроля инфекции АПП в стаде является сочетанное применение ИФА для обнаружения антител к LPS клеточной стенки бактерий и к токсину Арх IV.


ИФА тест для серотипизации дает возможность не только выявить циркулирующий в стаде тип *A. pleuropneumoniae*, но и отследить уровень и длительность иммунного ответа на действие вакцинных антигенов (применимо для вакцин, в которых используются инактивированные целые бактериальные клетки). На этом фоне, применение ИФА теста к токсину Арх IV может использоваться как DIVA (differentiate infected from vaccinated animals) тест, который позволяет дифференцировать животных, инфицированных эпизоотическим штаммом от животных,

вакцинированных инактивированными вакцинами.

Применение серологических тестов для выявления бессимптомно инфицированных стад и животных имеет большое значение. *A. pleuropneumoniae* является очень динамичным патогеном — ему характерны мутации, поэтому практические подходы к диагностике и использование имеющихся на рынке диагностикумов должны быть готовы к нетипичным ситуациям.

Таким образом, для скрининга стада, которое благополучно по АПП или с неизвестным статусом, а также для выявления инфицированных свиней среди вакцинированного поголовья оптимальным является использование ИФА теста для выявления антител к токсину Арх IV. Для идентификации средне- и высоковирулентных серотипов *A. pleuropneumoniae*, а также для выявления доминирующих в стаде серотипов, определение уровня поствакцинальных антител более целесообразным является использование теста для обнаружения антител к LPS клеточной стенки бактерий. Следует отметить, что эти различные подходы в исследованиях дополняют друг друга, поскольку они обнаруживают антитела к различным антигенам.

Выводы

Для выявления АПП в стаде нужно использовать комплексный подход, с учетом эпизоотической ситуации, клинической картины, результатов патологоанатомического вскрытия и комплексных лабораторных исследований. При выборе лабораторных исследований необходимо понимать цель исследования (выявление патогенна, мониторинговые или скрининговые исследования и т.д.) принимать во внимание статус вашего стада, учитывать чувствительность и специфичность метода, а также учитывать оснащенность лаборатории и квалифицированность персонала. 

Список литературы

1. Gottschalk M, Taylor D. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw B, Zimmerman J, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine*. 9th ed. Blackwell Publishing, 2006. – P. 563–576.
2. Broes A, Gottschalk M. *Why and how to diagnose Actinobacillus pleuropneumoniae subclinical infections*. Proc AASV. Orlando, Florida, 2007. – P. 193–198.
3. Коляда С. Г. Особенности ИФА-диагностики актинобациллярной плевропневмонии свиней / С. Г. Коляда, Д. М. Мясук, А. В. Кокарев, Г. С. Мовкалова // *Материалы одиннадцатого международного конгресса специалистов ветеринарной медицины*. – Киев, 9-10 октября 2014. – С. 49–50.