Лечим подобное подобным

Артем ЛЕМИШ, кандидат ветеринарных наук
Анастасия КРУГЛЕВСКАЯ, магистр биологических наук
Наталья ЛЕМИШ, микробиолог
Диагностическая ветеринарная лаборатория Республики Беларусь

Известно, что основную роль в профилактике инфекций отводят активной иммунизации поголовья, которая позволяет снизить заболеваемость и тяжесть течения болезни, повысить сохранность животных, сохранить структуру стада, а также уменьшить расход медикаментов, затрачиваемых на лечение.

Аутогенная вакцина — адресная вакцина. Ее изготовляют из бактерий, выделенных от больного животного, и используют в качестве лекарства. Такие вакцины, в отличие от других средств (в том числе антибиотиков), более эффективны, ведь, как известно, микроорганизмы приобретают резистентность к антибиотикам, которые при массовом и длительном использовании оказывают выраженное побочное действие.

Кроме того, аутовакцину можно применять как отдельно, так и в сочетании с другими методами и средствами. Принцип заключается в лечении подобного подобным.

Плевропневмония свиней (*Actinobacillus pleuropneumoniae — APP*) — заболевание дыхательной системы, протекающее в острой форме. Болезни подвержены в основном подсвинки, свиньи на откорме и животные основного стада. Заболеваемость достигает 40–75%, летальность — 70–85%, что ведет к значительному экономическому ущербу.

Возбудители плевропневмонии свиней — грамотрицательные мелкие капсулообразующие неподвижные коккобактерии. Сегодня известно 15 серологических вариантов *APP* (наиболее этиологически значимые — первые 12, но доминируют 1–6, 9 и 12).

Чтобы определить циркулирующий в стаде серотип или ассоциацию нескольких серотипов, необходимо использовать набор диагностических гипериммунных сывороток для постановки серологических реакций (РА, РНГА, РИД) с выделенной из пораженных легких культурой.

Самые главные компоненты в патогенезе *APP* — порообразующие экзотоксины АрхIV, АрхI, АрхII и АрхIII. Все вирулентные *A. pleuropneumoniae* штаммы вырабатывают эти токсины. В патогенезе немаловажную роль играют белки внешней оболочки, липополисахариды и полисахариды клеточной стенки.

АрхI, АрхII и АрхIII повреждают (лизируют) альвеолярные эпителиальные и эндотелиальные клетки, эритроциты, нейтрофилы и макрофаги. Адгезия *A. pleuropneumoniae* к клеткам хозяина может произойти даже при

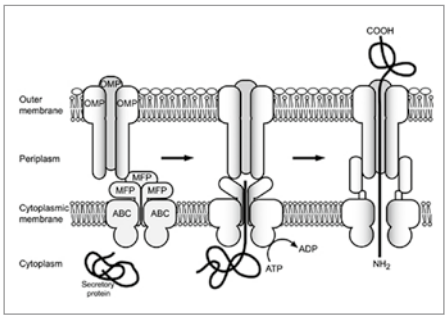


Рис. 1. Первый тип секреторной системы бактерии (T1SS)

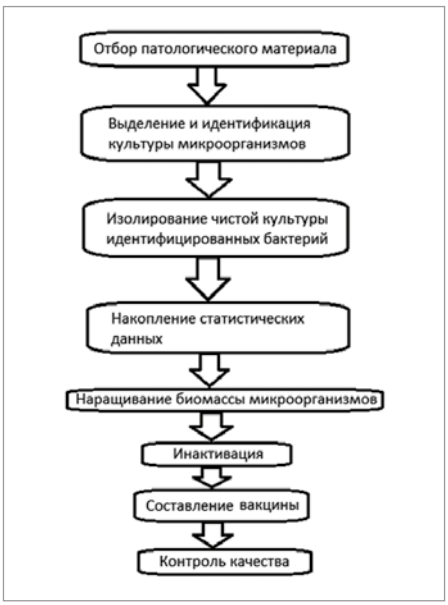


Рис. 2. Основные стадии производственного процесса аутовакцины

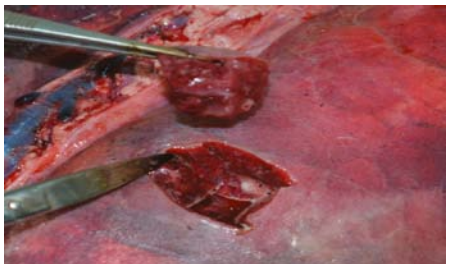


Фото 1–3. Характерные патоморфологические изменения в легких при APP

наличии Арх-токсиннейтрализующих антител. Четвертый токсин (ApxIV), присутствующий во всех штаммах *A. pleuropneumoniae*, имеет ключевое и пусковое значение для полной вирулентности бактерии.

Арх-токсины относят к семейству RTX-токсинов (от англ. repeats in toxin — повторяющийся), где X — любая повторяющаяся аминокислота. В буквенном выражении это выглядит так: [GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F X]. Количество повторов варьирует в зависимости от семейства белков RTX, выполняющих функцию связывания Ca^{2+}, который в свою очередь облегчает экспорт токсина за пределы наружной мембраны клетки через АТФ-опосредованный тип секреторной системы (T1SS).

Сам же токсин не попадает в периплазматический слой бактериальной клетки и не повреждает ее, а секретируется наружу **(рис. 1)**. Структуру, состоящую из трех белков, кодирует один кластер генов — токсин RTX, RTX-активирующая ацилтрансфераза и T1SS белки. Такое строение характерно для всех токсинов семейства RTX. ApxIV-токсин вырабатывается бактерией *A. pleuropneumoniae* только в присутствии клеток-мишеней (клеток хозяина). Функция ApxIV-токсина — проделывание отверстий в мембранах клеток-мишеней.

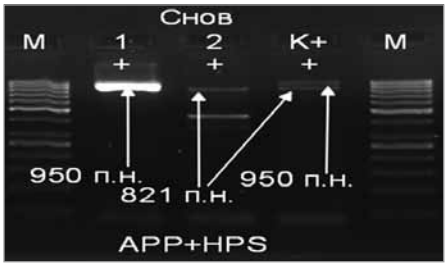


Рис. 3. Постановка ПЦР с праймерами, специфичными к Haemophilus parasuis, Actinobacillus pleuropneumonia (К+ — положительный контроль реакции, ДНК Haemophilus parasuis — 821 п. н.; К+ — положительный контроль реакции, ДНК Actinobacillus pleuropneumonia — 950 п. н.; М — маркер)

Результаты ИФА-диагностики

Проба	Половозрастная группа	Серотипы							
		ApxIV	1–9–11	2–6	3–6–8	4–7	5	10	12
1–8	Свиноматки: холостые	П	0	0	П (84%)	П (235%)	П (65%)	0	0
9–16	подсосные	П	0	0	П (44%)	П (212%)	0	П (79%)	0
17–24	глубоко супоросные	П	0	П (70%)	П (111%)	П (189%)	П (114%)	0	0
25–32	Ремонтные свинки	П	П (50%)	П (55%)	П (51%)	П (299%)	П (137%)	0	0
33–42	Поросята: 15-дневные	П	0	0	С (44%)	П (92%)	0	0	0
43–52	40-дневные	П	0	0	0	П (59%)	0	0	0
53–62	70-дневные	П	0	0	0	0	0	0	0
63–72	110-дневные	П	0	0	П (147%)	0	0	0	0

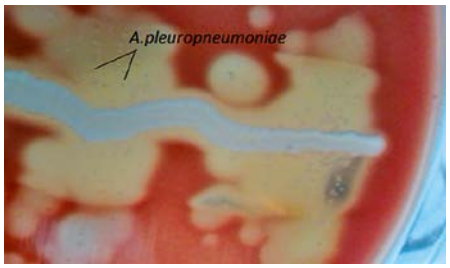
Примечание. П — положительно, С — сомнительно, 0 — отрицательно.

Вот почему при производстве вакцины в состав антигена необходимо включать как осадок, содержащий инактивированные клетки бактерий (источник эндотоксинов), так и надосадочную жидкость (источник экзотоксинов). Основные стадии производства аутовакцины отображены на **рисунке 2**.

Отбор патологического материала проводят в хозяйствах, где у свиней регистрируют характерные для *APP* патологоанатомические изменения в легких, соблюдая требования асептики и антисептики. Для бактериологического анализа достаточно кусочка пораженного легкого или мазка, выполненного при помощи тампона-зонда на транспортной среде Стюарта или транспортной среде Эймса с активированным углем.

Если на ферме невозможно качественно провести отбор материала, легкое в лабораторию направляют целиком. На **фото 1–3** видны характерные патоморфологические изменения в легких свиней при *APP*.

На взятый патологический материал составляют сопроводительный документ с подробным указанием наименования предприятия, адреса, вида и количества материала, даты отбора, эпизоотической ситуации в хозяйстве, анамнестических, клинических и патологоанатомических данных, вида запрашиваемых исследований, количества отправляемых с пробами упаковок. Упаковка инфицированного материала должна гарантировать его доставку в целости и исключать возможность рассеивания возбудителей инфекций по пути следования.



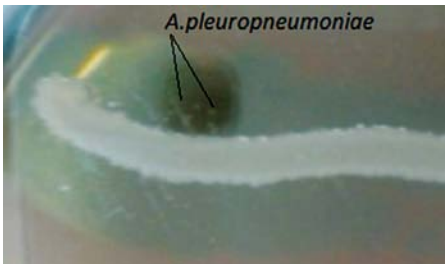


Фото 4–6. Выделение чистой культуры A. pleuropneumoniae

Чтобы выделить и идентифицировать культуры микроорганизмов, производят посев патологического материала, взятого от больных свиней, на плотной питательной среде с добавлением ростового *V*-фактора, после чего изолируют чистые культуры *A. pleuropneumoniae* **(фото 4–6)**.

Для определения видовой принадлежности культур, находящихся в патологическом материале, необходимо провести исследования методом ПЦР (полимеразной цепной реакции) с праймерами, специфичными к *A. pleuropneumoniae* и *Haemophilus parasuis (HPS)*.

На **рисунке 3** изображена электрофореграмма продуктов амплификации бактериальных ДНК с праймерами *APP* + *HPS*. Видно, что образцы действительно содержат эти культуры микроорганизмов.

Серогрупповую принадлежность *A. pleuropneumoniae* выявили в ходе эксперимента методом реакции агглютинации с моновалентными иммунными сыворотками. Результаты подтвердили, что выделенная культура бактерий принадлежит к серогруппам 6 и 4.

Для накопления статистических данных в хозяйстве отобрали 72 пробы сыворотки крови свиней различных технологических групп: пробы 1–8 — холостые свиноматки, 9–16 — подсосные свиноматки, 17–24 — глубоко супоросные свиноматки, 25–32 — ремонтные свинки (поросята), 30–42 — 15-дневные поросята, 43–52 — 40-дневные, 53–62 —70-дневные, 63–72 — 110-дневные. Из отобранного материала (сыворотки крови) выделены специфические антитела **(таблица)**.

Можно сделать вывод, что иммунологический профиль исследуемых сывороток крови свиней различных технологических групп подтверждает циркуляцию возбудителя *A. pleuropneumoniae*. На это указывают антитела к ApxIV, которые синтезируются только при наличии в стаде эпизоотических штаммов бактерий.

Показано доминирование иммунного ответа в отношении серотипов 3–6–8 и 4–7 в группе свиноматок, однако отмечен значительный разброс серотипов *APP* в группе ремонтных свинок. У поросят молозивно-молочного периода серотипы аналогичны серотипам свиноматок, что объясняется наличием колострального (материнского) иммунитета. К 70-дневному возрасту антитела к серотипам полностью исчезают. Это создает благоприятные условия для вспышки плевропневмонии. В группе поросят 110-дневного возраста зарегистрировали циркуляцию доминирующего болезнетворного серотипа.

Возбудитель *A. pleuropneumoniae* не размножается на обычных питательных средах, поэтому для роста в питательную среду необходимо добавлять сыворотку крови лошади (10%) и НАД-фактор (0,05%).

Для получения бóльшей биомассы клеток наращивание проводили поэтапно:

Пробирка 10 мл → Колба 200 мл → Колба 1 л

1 сутки 1 сутки

Средняя концентрация клеток — 3×10^9 КОЕ/мл.

Инактивацию бактериальных клеток и их токсинов осуществляли 0,3%-м формалином в течение 7–10 суток при температуре культивирования. Чтобы усовершенствовать процесс, микробную культуру подвергали дополнительной обработке — встряхиванию на термошейкере. Получили суспензию клеток — антиген.

Вакцина включает антиген (инактивированная культура клеток в конечной концентрации не менее 3 млрд м. к./см^3) и масляный адъювант, необходимый для усиления и ускорения иммунного ответа. Для получения вакцины, выравнивания и поддержания pH на постоянном уровне (6,8–7,4) используют забуференный физиологический раствор. Приготовленную эмульсию разливают в стерильные флаконы по 100 мл, укупоривают и маркируют.

Полученную вакцину проверяют на соответствие физико-химическим и биологическим показателям (внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей и плесени, стабильность, безвредность и реактогенность, иммуногенная (антигенная) активность, стерильность и pH).

Для определения способности вырабатывать иммунитет животным опытной группы ввели вакцину двукратно в дозе 2 см^3 (повторно — через 14 суток после первого введения). Спустя 14 дней после вакцинации отобрали сыворотку крови и провели ИФА-диагностику.

Средний уровень антител опытной группы свиней составил не менее 174% по отношению к показателям аналогов контрольной группы, где получен отрицательный результат на протяжении всего срока наблюдения.

В ходе эксперимента установили, что в ответ на введенный препарат — вакцину эмульгированную инактивированную для профилактики актинобациллярной плевропневмонии свиней (аутоиммунную) — у животных вырабатывается иммунитет в отношении шестого серотипа *A. pleuropneumoniae*. Аутовакцина обладает высокой иммуногенностью, не вызывает дополнительного заражения и новых заболеваний.

Благодарим за сотрудничество и помощь при написании статьи врачей ветеринарной медицины Сергея Герасимчука, Дениса Потапчука, Александра Пономарева и Дмитрия Соколова. ЖР

Республика Беларусь