

УДК: 619:616.98:579.843.95:636.22/.28

М.А. Шибаев, С.А. Дудников, Л.Б. Прохвятилова

(ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГУ «ВНИИЗЖ»)

г. Владимир, Россия)

ВЫЯВЛЕНИЕ PASTEURELLA MULTOCIDA У КРС В ЦЕНТРАЛЬНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ: КЛИНИКО-ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА

Ключевые слова: клиническая эпидемиология, возбудитель пастереллеза.

Введение

Респираторные заболевания молодянка крупного рогатого скота (КРС) является острой проблемой во всем мире. Эти заболевания чаще всего представляют комплексные, полиэтиологические инфекционные процессы, в которых на разных стадиях развития патологии принимают участие инфекционные агенты вирусной и бактериальной природы, гельминты. Патогенные агенты при этом часто выступают как ко-факторы, обуславливающие совместную патологию, и синергисты, усиливающие эффект патологического процесса и утяжеляющие течение инфекционного процесса, а сам патологический процесс начинается, как правило, из предшествующего носительства, когда животные клинически здоровы. Массовое заболевание (эпизоотический процесс), таким образом, возникает при попадании группы животных-носителей под воздействие стресс-фактора. Немаловажную роль в развитии данной патологии играют микроорганизмы вида *Pasteurella multocida* (2, 6, 7).

P. multocida - грамотрицательная бактерия, принадлежащая к порядку *Pasteurellales*, семейству *Pasteurellaceae*, роду *Pasteurella*. Согласно классификации Carter Heddleston (8, 14) все штаммы *P. multocida*, циркулирующие в природе, подразделяют на пять серогрупп, охарактеризованных по капсульному антигену (А, В, D, Е и F) и 16 сероваров, отличающихся по соматическому антигену (от 1 до 16).

P. multocida имеет широкий круг хозяев, включая большинство млекопитающих, птиц, а также человека. У КРС микроорганизм является возбудителем геморрагической септицемии (серовары В:2, В:5 в Азии и Е:2 в Африке) и легочных пастереллезов (серогруппы А и D) с развитием клинической картины фибринозной бронхопневмонии, серозно-фибринозного плеврита и перикардита. Так же широко распространено носительство *P. multocida* с персистенцией возбудителя на слизистых оболочках верхнего отдела респираторно-

го тракта клинически здоровых животных (1, 12, 13, 16).

Пастереллез КРС, вызываемый *P. multocida*, широко распространен в стадах крупного рогатого скота многих стран и наносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам, особенно при ассоциативной инфекции с вирусными, бактериальными и микоплазменными патогенами (4, 5, 10). Однако, данных о распространенности и серовариантном/серогрупповом составе штаммов *P. multocida*, циркулирующих на территории РФ и в отдельных регионах и участвующих в развитии комплекса респираторных заболеваний КРС, в изученной литературе нами не обнаружено, что, по видимому, обусловлено как сложностью лабораторной диагностики, которая в большинстве случаев основывается на выделении культуры *P. multocida*, ее идентификации до вида и определения патогенности для лабораторных животных, так и отсутствием популяционных исследований этой патологии (5).

В настоящее время выявление и идентификация *P. multocida* возможна как с применением традиционных методов микробиологии (микроскопия, выделение чистой культуры, биопроба) и серологии, так и с использованием молекулярно-биологических методов (полимеразная цепная реакция, нуклеотидное секвенирование и др.) (11, 15, 16).

Поскольку *P. multocida* в антигенном отношении неоднородна, перекрестного напряженного иммунитета при инфицировании животных пастереллами различных серогрупп и сероваров не выявлено. При этом успешная специфическая профилактика возможна только при полном соответствии видового и серовариантного состава вакцин с видовым и серовариантным составом эпизоотических штаммов (9, 17).

Целью нашего исследования было:

- оценить превалентность данного возбудителя в Центральном федеральном округе (ЦФО) РФ;
- выявить статистическую значимость

связи эпидемиологических критериев инфицирования *P. multocida* с клиническими проявлениями, сопровождающимися поражением респираторного тракта у КРС;

- уточнить эффективность вакцинации профилактикой пастереллеза КРС, проводимой в обследованных хозяйствах.

Материалы и методы

Биологические образцы. Для изучения распространенности *P. multocida* в ЦФО проводили отбор проб (мазки из носовой полости телят в возрасте от 15 дней до 7 месяцев) в хозяйствах (N=13) семи областей ЦФО (Московская, Владимирская, Тамбовская, Брянская, Белгородская, Тверская, Костромская). В выборку попали животноводческие хозяйства с различным направлением хозяйственной деятельности (молочное, мясное и т.д.), формой содержания животных, а так же поголовьем (от 900 до 6.500 голов). Выбор хозяйств проводился квазислучайно, согласно предъявляемым требованиям минимальной территориальной репрезентативности выборки в географически удаленных друг от друга точках, исходя из 95% уровня вероятности и 10% превалентности болезни в популяции (мнимая превалентность), что давало нам для бесконечно большой популяции значение в 30 проб из каждого хозяйства. Для непосредственного выбора конечной единицы (животное) применяли простой случайный выбор без возвращения внутри кластера (3).

Отбор образцов для анализа осуществляли с использованием одноразовых транспортных систем, состоящих из стерильной пластиковой пробирки и аппликатора с тампоном (COPAN, Италия) с добавлением в качестве транспортной среды стерильного физиологического раствора хлорида натрия. Было отобрано 390 образцов.

Суммарную ДНК из культуральной бактериосодержащей суспензии и патологического материала от животных выделяли с использованием универсального набора реагентов для пробоподготовки (ООО «Компания Биокон», Россия), в соответствии с инструкцией к набору.

Амплификация кДНК. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в программируемом амплификаторе RTC-100TM (MJ Research, Inc., США).

Индикация фрагмента гена KMT1 *P. multocida*. В пробирку объемом 0,2 мл помещали реакционную смесь (V= 25 мкл)

следующего состава: 12 мкл деионизированной воды, 1 мкл 10 пмоль праймера PM-SV-F 5'-AAT-TGA-GTT-TTA-TGC-CAC-TTG-AAA-TGG-3' и 1 мкл 10 пмоль праймера PM-SV-R 5'-TGG-CCA-TAA-GAA-ACG-TAA-CTC-AAC-AT-3', 2 мкл 25 mM MgCl₂, 1 мкл 10 mM dNTP, 1,25 ед. Go Taq® ДНК-полимеразы, 5 мкл 5x Green Go Taq® Flexi буфера для Go Taq® ДНК-полимеразы (Promega, США). К реакционной смеси добавляли 3 мкл ДНК. На поверхность реакционной смеси наслаивали 10 мкл минерального масла. Реакцию проводили при следующих температурных и временных режимах: один цикл: при 90 °C в течение 4 мин; сорок циклов: при 94 °C – 30 с, 60 °C – 30 с и 72 °C – 30 с; один цикл: при 72 °C в течение 5 мин. Результаты исследования учитывали путем анализа продуктов амплификации исследуемых образцов методом электрофореза в 2% агарозном геле. Результаты электрофореза визуализировали на трансиллюминаторе в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм. Наличие в результате реакции фрагмента ДНК длиной 272 пар нуклеотидов свидетельствовало о присутствии генома *P. multocida* в исследуемом материале. Аналитическую чувствительность и специфичность метода определяли использованием культуральных бактериосодержащих суспензий микроорганизмов *Pasteurella multocida* трех серотипов (А, В и D)*. Установлено, что данная методика способна выявлять *P. multocida* в концентрации 10¹ КОЕ/мл.

Дифференциацию серогрупп *P. multocida* по капсульному полисахаридному антигену проводили с помощью выявления фрагментов генома связанных с биосинтезом полисахаридной капсулы *P. multocida*. Для этого использовали метод ПЦР по методике, изложенной в Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Paris: OIE, 2008). Данная методика позволяет идентифицировать все серогруппы *P. multocida* по капсульному антигену, т.е. серогруппы А, В, D, Е и F (16).

Расчет эпизоотологических показателей (χ^2 , Re, Rne, OR, AR и VE) проводили с использованием матрицы формата 2x2 («латинского квадрата»), с помощью компьютерной программы STATISTICA 6 (StatSoft, Inc, 2001) (3).

Результаты и обсуждение

Обследование 13 стад, расположенных в 7 регионах страны (рис. 1), входящих в

* коллекция микроорганизмов ФГУ «ВНИИЗЖ» (лаборатория диагностики бактериальных инфекций животных)

ЦФО, с использованием разработанной тест - системы для индикации гена КМТ1 *P. multocida* показало, что стадная превалентность инфицирования *P. multocida* теллят крайне высока и составляет 100% (положительные пробы выявлены во всех обследованных хозяйствах). Индивидуальная превалентность составила 61,8% (положительные результаты ПЦР получены в 241 из 390 проб). При этом все изоляты *P. multocida*, выявленные в настоящем исследовании, относятся к серогруппе А. Ни одной пробы, содержащей представителей серогрупп В, D, Е или F, нами не выявлено (мнимая превалентность исследования 10%).

Клиническая эпидемиология устанавливает связь результатов диагностических исследований с реальной ситуацией, прогнозом и избираемыми мерами борьбы и профилактики. В первую очередь мы попытались ответить на вопрос: насколько положительный диагноз, полученный с использованием метода ПЦР, соотносим с заражением животных *P. multocida* и развитием клинических признаков. Для этого было проведено сравнение результатов диагностических исследований у животных с поражением респираторного тракта и клинически здоровых животных.

Животных с клиническими признаками поражения респираторного тракта рассценивали как «заболевших», а без соответствующих признаков - «условно здоровы-

ми». Результаты исследований проб в ПЦР делили дихотомически на инфицированных - *P. multocida* «+» и не инфицированных - *P. multocida* «-». Результаты исследований 390 проб представлены в таблице 1.

Эпидемические критерии ассоциации результатов диагностического теста (в нашем исследовании ПЦР) с клиническими признаками поражения респираторного тракта были оценены по следующим показателям: хи – квадрат (χ^2), абсолютный риск поражения респираторного тракта среди инфицированных ($Re = a/(a+b)$) и неинфицированных ($Rne = c/(c+d)$) животных, отношение шансов ($OR = ad/bc$) и атрибутивный риск ($AR = Re - Rne$). Данные показатели позволяют выносить суждение о параметрах ассоциации поражения респираторного тракта и положительными результатами выявления инфицированности *P. multocida* в ПЦР:

- расчетные значения $\chi^2_{0,95} = 0,88$, - что существенно меньше критического значения 3,84. Таким образом, нет оснований полагать, что для указанной вероятности (95%) положительные результаты разработанного теста и поражения респираторного тракта - взаимосвязанные события. Высокий процент выявления *P. multocida* в образцах от клинически здоровых животных (59,5%) - свидетельство широкого здорового носительства;

- расчетные значения показателей абсолютного риска проявления клиниче-

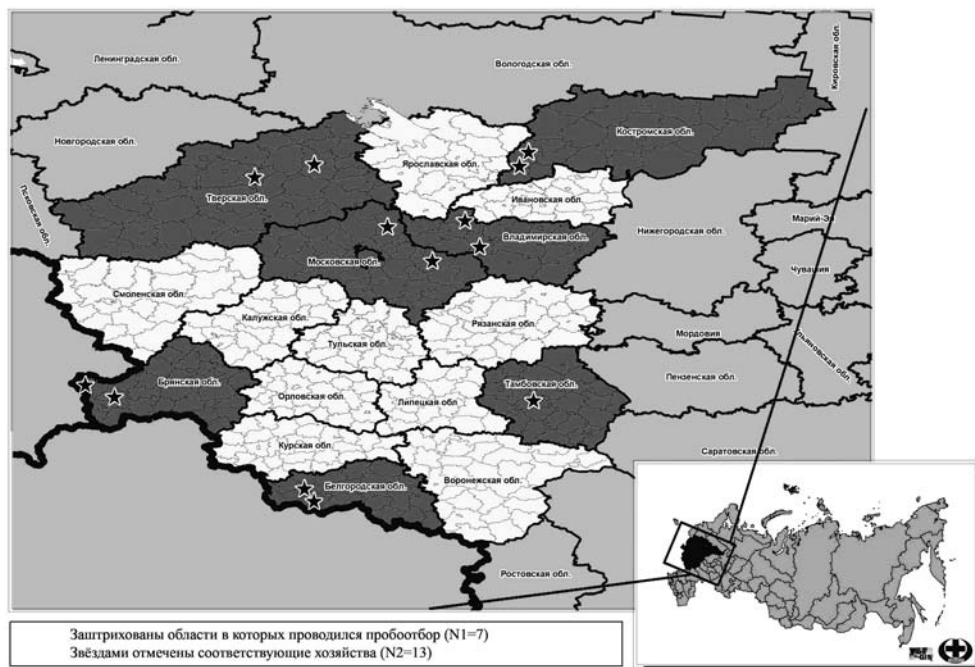


Рис.1. Картография регионов отбора проб

Матрица формата 2x2 двух дихотомических переменных:
инфицированности и клинического статуса

Исследование (ПЦР)	Клинический статус		
	Заболевшие	Здоровые	
<i>P. multocida</i> «+»	125 (a)	116 (b)	241
<i>P. multocida</i> «-»	70 (c)	79 (d)	149
	195	195	390

ских признаков поражения респираторного тракта среди инфицированных (**Re**) и неинфицированных (**Rne**) *P. multocida* животных (51,87% и 46,98%, соответственно) свидетельствовали о том, что отношение шансов (**OR**) выявления *P. multocida* в группе заболевших животных всего в 1,2 раза выше, чем в группе здоровых животных. Это служит основанием признать как высокий уровень здорового носительства, так и низкую превалентность *P. multocida* у телят с клинически выраженными признаками поражения респираторного тракта (64%);

- атрибутивный риск (**AR**), указывающий на долю заболевших животных в положительно реагирующей группе, где заболевание было обусловлено именно воздействием *P. multocida*, составил всего 4,89% или 4,9 случаев на 100 голов;

Таким образом, эпидемическая концепция риска и шансов, хотя и свидетельствует о взаимосвязи результатов диагностического теста (выявление *P. multocida* с использованием метода на основе ПЦР) и клинически выраженных поражений респираторного тракта, но эта связь не носит статистически значимого характера.

Поскольку в 6 из 13 обследованных хозяйств (46,1%) проводилась специфическая профилактика пастереллеза КРС с помощью различных вакцин, то в выборку попали животные как из стад, в которых проводилась вакцинация, так и из стад, в которых таковая не проводилась. Практически важным являлся вопрос о том, насколько эффективна вакцинопрофилактика пастереллеза КРС, реализуемая в обследованных хозяйствах, при том, что досто-

верных обоснований необходимости вакцинопрофилактики – нет. С этой целью провели сравнение числа животных с поражением респираторного тракта с числом клинически здоровых особей. В обеих группах все животные были инфицированы *P. multocida* (по результатам, полученным с использованием метода ПЦР). Животных делили дихотомически по клиническому статусу («заболевшие» - «здоровые») и по признаку иммунизации («вакцинированные» - «невакцинированные»).

Результаты исследований 241 пробы представлены в таблице 2.

Индекс эффективности вакцины в полевых условиях (**VE = 1-OR**) составил -37%. Таким образом, при комплексе респираторных заболеваний, в котором участвует *P. multocida*, эффективность вакцинации не установлена, возможно даже наличие феномена «иммунной экзальтации» - введение вакцины провоцирует переход скрытого носительства в клиническую форму болезни. Низкая эффективность вакцинопрофилактики в данном случае связана, скорее всего, не с качеством препарата, а с несоответствием серовариантного состава используемых вакцин штаммам, циркулирующим на территории ЦФО РФ.

Аналогичным образом оценили индекс эффективности вакцины для животных не инфицированных *P. multocida* (по результатам полученным с использованием метода ПЦР). Результаты исследований 149 проб представлены в таблице 3.

При этом расчетные значения показателя индекса эффективности вакцины в полевых условиях (**VE**) дали парадоксальный результат: при комплексе респиратор-

Таблица 2

Ретроспективная оценка вакцинации против пастереллеза КРС
по поголовью телят инфицированных *P. multocida*

Вакцинация против пастереллеза КРС	Клинический статус		
	Заболевшие	Здоровые	
вакцинированные	66 (a)	52 (b)	118
невакцинированные	59 (c)	64 (d)	123
	125	116	241

Таблица 3.

Ретроспективная оценка вакцинации против пастереллеза КРС по поголовью телят, не инфицированных *P. multocida*

Вакцинация против пастереллеза КРС	Клинический статус		
	Заболевшие	Здоровые	
вакцинированные	24 (a)	38 (b)	62
невакцинированные	46 (c)	41 (d)	87
	70	79	149

ных заболеваний, в котором *P. multocida* не участвует, эффективность вакцинации составила 44%.

Выводы

Результаты проведенного исследования 390 проб из 13 хозяйств 7 областей Центрального федерального округа позволяют сделать следующие выводы:

- индивидуальная превалентность пастереллеза (клинического и субклинического) составила 61,8% (241 положительная проба из 390);
- в Центральном федеральном округе в основном циркулирует *P. multocida* серогруппы А (n = 241). Если циркуляция других серогрупп и имеет место, то их превалентность существенно ниже 10%;
- групповая превалентность составила 100%, т.е. во всех обследованных хозяйствах идентифицированы животные - пастереллоносители и/или телята с призна-

ками поражения респираторного тракта у которых выявили возбудителя пастереллеза;

- среди клинически больных животных пастереллоносителями являлось 64,1% (125 из 195), а среди клинически здоровых особей 59,5% (116 из 195). Различия не носят статистически значимого характера;
- достоверные различия по пастереллоносительству среди животных с выраженными признаками поражения респираторного тракта и клинически здоровыми телятами отсутствуют ($\chi^2 < 3,84$, $\alpha = 0,95$; OR = 1,2; AR = 4,9 заболевших на 1000);
- ретроспективная оценка вакцинопрофилактики пастереллеза КРС, как по группе пастереллоносителей (n=241), так и по группе животных, где не установлено инфицированности *P. multocida* (n=149), не выявила статистически значимой эффективности препарата.

РЕЗЮМЕ

По результатам исследований 390 проб (мазки из носовой полости телят 0,5 – 7 месячного возраста) из 13 хозяйств 7 областей Центрального федерального округа установлено:

- во всех хозяйствах среди поголовья телят КРС циркулирует возбудитель пастереллеза исключительно одной серогруппы: *Pasteurella multocida* типа А (n=241);
- высокая индивидуальная (61,8%) и групповая (100%) превалентность пастереллоносительства;
- отсутствие достоверных различий в превалентности пастереллоносительства у животных с клинически выраженными признаками поражения респираторного тракта и клинически здоровых животных (64,1 и 59,5% соответственно, $\chi^2 < 3,84$, $\alpha = 0,95$; OR = 1,2; AR = 4,9 заболевших на 1000);
- низкая эффективность вакцинопрофилактики пастереллеза КРС как по группе животных с клинически выраженными признаками поражения респираторного тракта, так и у клинически здоровых телят.

SUMMARY

Testing of 390 samples (nasal swabs from 0.5-7 month-old calves) from 17 farms located in 7 regions of the Central Federal Okrug revealed:

- circulation of only one type of pasteurellosis agent, *Pasteurella multocida* serogroup A, in calves on all cattle farms (n=241);
- high individual and group animal prevalence of *Pasteurella* carrier state – 61.8% and 100%, respectively;
- absence of significant differences in pasteurellosis carrier state prevalence between animals with clinically apparent respiratory signs and clinically healthy animals (64.1% and 59.5%, respectively, $\chi^2 < 3.84$, $\alpha = 0.95$; OR = 1.2; AR= 4.9 diseased per 1,000 animals);
- low efficiency of vaccine prophylaxis of bovine pasteurellosis both in animals with clinically apparent respiratory signs and clinically healthy calves.

Литература

1. Бакулов, И.А. Пастереллез как зооантропонозная инфекция / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.И. Козлова. // *Вопр.вет. микробиологии, эпизоотологии и вет.-сан.экспертизы*. - Ульяновск, 1994. - Ч.2. - С. 26-32.

2. Гамелин, О. Актуальность инфекционных респираторных заболеваний у крупного рогатого скота / О. Гамелин // *Ветеринар*. - 2002. - № 6. - С. 9 - 12.

3. Дудников, С.А. Количественная эпизоотология: основы прикладной эпидемиологии и биостатистики / С.А. Дудников. - Владимир: Демиург, 2004. - 460 с.

4. Мозгис, В. Я. Диарейные и респираторные заболевания телят, вызываемые условно – патогенными микроорганизмами / В. Я. Мозгис. - Рига:

- Зинатне, 1993. – 176 с.
5. Селиверстов, В.В. Пастереллезы животных / Селиверстов В.В. // Ветеринария. – 2003. - № 10. – С. 3 – 5.
6. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits / G.D. Snowden, L.D. Van Vleck, L. V. Cundiff, [et al] // J Anim Sci - 2007. - Vol. 85. - P. 1885-1892.
7. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors G. D. Snowden, L. D. Van Vleck, [et al] // J Anim Sci - 2006. Vol. 84. – P. 1999-2008.
8. Carter, G. Studies on *P. multocida*. A haemagglutination test for the identifying of serological types // Am. J. Vet. Res. – 1955. - Vol. 16, P. 481 – 484.
9. Confer, A.W. Immunogens of *Pasteurella* / A.W. Confer // Vet Microbiol. – 1993. – Vol. 37, N 3 – 4. – P. 353 – 368.
10. Dabo, S.M. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. / S.M. Dabo, J.D. Taylor, A.W. Confer // Anim Health Res Rev. – 2007. – Vol. 8, N 2. – P. 129 – 150.
11. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida* / F. Dziva, A. P. Muhairwa, M. Bisgaard, H. Christensen // Vet. Microbiol. – 2008. – Vol. 81. P. 12 – 22.
12. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds / T. Autio, R. Pohjanvirta, R. Holopainen, [et al] // Vet. Microbiol. – 2007. – Vol. 119. – P. 256–265.
13. Experimental induction of pneumonic pasteurellosis in calves by intratracheal infection with *Pasteurella multocida* biotype A:3 / A. Dowling, J. C. Hodgson, A. Schocka, [et al] // Res Vet Sci. – 2002. – Vol. 73. – P. 37 – 44.
14. Heddleston, K.L. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species / K.L. Heddleston, J.E. Gallagher, P.A. Rebers // Avian Dis. – 1972. – Vol. 16, N 4. – P. 925 – 936.
15. Hunt, M. L. The molecular biology of *Pasteurella multocida* M. L. Hunt, B. Adlra, K. M. Townsend // Vet. Microbiol. – 2000. – Vol. 72. – P. 3 – 25.
16. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008 Paris: OIE, 2008. – P. 739 – 751.
17. Srikumara, S. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex / S. Srikumara, C. L. Kellinga, A. Ambagala / Anim Health Res Rev. – 2007. – Vol. 8, P. 215 – 229.