

ГЛАВА 3.8.2.

АТРОФИЧЕСКИЙ РИНИТ СВИНЕЙ

РЕЗЮМЕ

*Атрофический ринит представляет собой инфекционную болезнь свиней, характеризующуюся серозными или серозно-гнойными выделениями из носа, укорочением или изгибом рыла, атрофией костей носовой раковины и снижением продуктивности. Он может быть энзоотическим или встречаться спорадически, в зависимости от разнообразных факторов, включая иммунитет стада. Наиболее тяжелая прогрессирующая форма обусловлена инфицированием токсинообразующими штаммами *Pasteurella multocida*, по отдельности или в комбинации с *Bordetella bronchiseptica*. Инфицирование *B. bronchiseptica* по отдельности может вызывать слабые или умеренные формы заболевания с не прогрессирующей атрофией носовой раковины. Атрофия носовой раковины может быть заметна только после забоя или выявляться у живых животных при рентгенографическом или томографическом исследовании. Кроме того, на тяжесть и встречаемость данного заболевания могут влиять факторы окружающей среды и уход за животными. Большая доля внешне здоровых стад свиней может быть инфицирована *B. bronchiseptica* или нетоксинообразующими штаммами *P. multocida* и демонстрировать слабую степень или низкую частоту атрофии носовой раковины.*

Идентификация возбудителей: *Диагностика атрофического ринита зависит от клинического и патологоанатомического исследования пораженных свиней с одновременным выделением и характеристикой *P. multocida* и *B. bronchiseptica*. Выделение обоих микроорганизмов часто затруднено в результате более интенсивного роста других бактерий. Частота выделения возрастает при хранении мазков из носовой полости или миндалин при температуре 4–8°C в непитательной транспортной среде и при использовании селективных культуральных сред.*

**Pasteurella multocida* и *B. bronchiseptica* можно идентифицировать с помощью традиционных биохимических исследований. Кроме того, изоляты *Pasteurella multocida* можно охарактеризовать на основе оболочечных и соматических антигенов. Оболочка типа D преобладает во многих регионах мира, но в некоторых превалирует тип А. Оболочечные антигены можно различить с помощью серологических методов непрямой гемагглютинации или иммунофлуоресценции, химически по флокуляции в акрифлавине или по чувствительности к гиалуронидазе. Типы соматического антигена можно различать с помощью гель-диффузионной реакции преципитации, при этом тип 3 у свиней встречается чаще всего. Токсинообразование у изолятов *P. multocida* может быть продемонстрировано путем испытания на цитотоксичность на культуре клеток. В настоящее время разработан коммерческий токсинспецифический твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА), который широко используется в некоторых регионах мира для различения токсинообразующих и нетоксинообразующих изолятов. Кроме того, его можно использовать для выявления продукции токсинов бактериями в первичной культуре на чашках без необходимости предварительного выделения и идентификации отдельных колоний.*

*Методы анализа, основанные на использовании ДНК-зондов, и полимеразная цепная реакция (ПЦР) обеспечивают быструю, чувствительную и высокоспецифичную детекцию *B. bronchiseptica* и как токсинообразующих, так и нетоксинообразующих штаммов *P. multocida* в тех лабораториях, которые имеют возможность использовать эти методы.*

Описана также множественная ПЦР, которая может использоваться для оболочечного типирования *P. multocida*.

Серологические реакции: Обнаружение антител к *P. multocida* и *B. bronchiseptica* не имеет большого значения, поскольку нетоксинообразующие штаммы *P. multocida* имеют антигены с перекрестной реактивностью с токсинообразующими штаммами, а *B. bronchiseptica* может быть выделена во многих стадах свиней. Имеется коммерческий тест, основанный на выявлении антител к токсину *P. multocida*, но он имеет ограниченное значение, поскольку не у всех инфицированных свиней образуются такие антитела. Широкое использование вакцинации токсоидом *P. multocida* приводит к образованию антител вакцинного происхождения, что затрудняет интерпретацию результатов.

Требования к вакцинам и биологическим препаратам для диагностики: В продаже имеется несколько вакцин, содержащих бактерии *B. bronchiseptica* и смесь токсинообразующих и/или нетоксинообразующих штаммов *P. multocida* или токсоид, полученный от *P. multocida* или рекомбинантной *Escherichia coli*.

А. ВВЕДЕНИЕ

Атрофический ринит представляет собой инфекционную болезнь свиней, характеризующуюся задержкой развития или деформацией носовой раковины и перегородки.

1. Возбудители заболевания

Различают две формы атрофического ринита в зависимости от возбудителя заболевания (De Jong, 2006):

- i) Тяжелая прогрессирующая форма, вызванная токсинообразующими изолятами *Pasteurella multocida*, чаще всего с оболочкой типов D или A, по отдельности или в комбинации с *Bordetella bronchiseptica*.
- ii) Менее тяжелая не прогрессирующая форма со слабой или умеренной атрофией носовой раковины, часто без значительной деформации рыла, вызванная *B. bronchiseptica*.

2. Описание заболевания

Первые клинические признаки включают чихание, затрудненное дыхание и выделения из глаз с темными потеками на морде, затем выделения из носа, которые могут варьировать от серозных до серозно-гнойных; в некоторых случаях у свиней может развиваться носовое кровотечение. Атрофия носовой раковины и искривление перегородки может привести к укорочению или изгибу рыла и в некоторых случаях к затруднениям при питании. Более высокая тяжесть заболевания связана с чрезмерной скученностью животных и плохими уходом, условиями содержания и условиями окружающей среды. Снижение продуктивности обычно наблюдается при умеренной или высокой тяжести атрофического ринита, хотя точная связь между инфицированием этими бактериями и понижением прибавки массы тела не установлена.

Bordetella bronchiseptica или токсинообразующие штаммы *P. multocida* могут присутствовать в стаде без клинических признаков заболевания, особенно при отсутствии других патогенов дыхательных путей и оптимальных условиях окружающей среды и уходе. Такое носительство несет риск передачи этих возбудителей в другие стада, в которых может произойти прогрессирование до тяжелого заболевания. *Bordetella bronchiseptica* и токсинообразующая *P. multocida* часто обнаруживаются у многих одомашненных и диких животных, что может потенциально приводить к передаче этих бактерий в стада свиней.

3. Зоонозный риск и требования биобезопасности

Инфицирование людей *B. bronchiseptica* происходит редко и чаще всего наблюдается у лиц с нарушенным иммунитетом, контактирующих с инфицированными или вакцинированными домашними животными; о передаче возбудителя от свиней к людям не сообщалось. *Pasteurella multocida* может быть серьезным патогеном у человека, но большинство случаев зоонозного инфицирования связаны с контактом с домашними или дикими животными. *Pasteurella multocida* также часто выделяется у здоровых людей, являющихся носителями, работающих на свинофермах или живущих рядом с ними, и связана с хроническими или острыми респираторными заболеваниями у этих людей (Donnio *et al.*, 1999; Marois *et al.*, 2009). Передача возбудителя происходит главным образом в результате укусов или контаминации царапин и ран инфицированным материалом, но может также быть результатом вдыхания аэрозоля. Люди, контактирующие со свиньями, инфицированными *P. multocida*, в особенности имеющие нарушенный иммунитет, должны соблюдать меры предосторожности. При работе с клиническими пробами и культурами *B. bronchiseptica* и *P. multocida* следует соблюдать меры безопасности уровня 2.

4. Дифференциальная диагностика

Цитомегаловирус свиней также вызывает ринит у поросят, но заболевание не прогрессирует до атрофии носовой раковины или искривления рыла. У некоторых свиней может наблюдаться асимметричное развитие костей, связанное с привычным кусанием стойла или поилок, что может приводить к заметному несоответствию верхней и нижней челюсти. При внимательном осмотре это состояние можно отличить от укорочения или искривления рыла, характерного для атрофического ринита.

В. ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Диагностика атрофического ринита проводится с использованием клинических, гистопатологических и микробиологических исследований, при этом последние особенно важны для стад с субклинической инфекцией. Обычно считается, что если в стаде имеется токсинообразующий штамм *P. multocida*, стадо считается пораженным прогрессирующим атрофическим ринитом, независимо от того, есть ли клинические признаки этого заболевания (Pedersen *et al.*, 1988). Поэтому во многих странах контроль направлен на выявление инфекции, даже при субклинической инфекции у животных, которые считаются потенциальными носителями инфекции.

1. Гистопатологические диагностические критерии

Атрофия носовой раковины может быть выявлена при убое, при изучении разрезов рыла на уровне первого/второго премоляра. Субъективная оценка атрофии носовой раковины является удобным способом и часто используется для мониторинга стад (De Jong, 2006), но для исследований, требующих анализа данных, лучше подходят объективные шкалы измерения (Gatlin *et al.*, 1996). Рентгенографическое (Done, 1976) и томографическое (Magyar *et al.*, 2003) исследования могут предоставить объективные данные по живым животным, при этом томография позволяет выявить не только тяжелые поражения, но и более незначительные изменения, которые нельзя обнаружить рентгенологически. Однако эти методы имеют ограниченное использование, потому что для них требуется специальное оборудование и опыт работы с ним. Диагностике способствует выявление характерных гистопатологических признаков, включая фиброзное изменение костной ткани вентральной части носовой раковины при различной степени воспалительных и репаративных изменений.

2. Идентификация возбудителей

2.1. В культуре *in vitro*

Поскольку *P. multocida* преимущественно колонизирует миндалины, ее чаще всего выделяют с использованием мазков или биоптата миндалин (Ackermann *et al.*, 1994). Мазки из носовой полости особенно полезны для выделения *B. bronchiseptica*. Если взятие проб из миндалин не представляется возможным, для выделения обоих микроорганизмов можно использовать мазки из полости носа. Следует использовать тампоны на гибком держателе; забор проб у молодых поросят легче проводить с использованием небольших тампонов. Одним тампоном берут пробы с обеих сторон носовой полости, после чего его помещают в непитательную транспортную среду (например, фосфатно-солевой буфер) и хранят при 4–8°C при перевозке в целях предотвращения избыточного роста других бактерий, характеризующихся более быстрым ростом. Время перевозки не должно превышать 24 ч.

Хотя и *P. multocida*, и *B. bronchiseptica* хорошо растут на кровяном агаре, лучше использовать селективную среду, поскольку их выявлению может препятствовать избыточный рост других бактерий, присутствующих в большом количестве. Еще одной трудностью при выделении *B. bronchiseptica* является то, что этот микроорганизм растет медленнее, чем большинство других бактерий, присутствующих в клинических образцах. Для выделения *P. multocida* используются различные составы сред, содержащие антибиотики, но сравнительные исследования, имеющиеся в литературе, показывают, что наивысшая частота выделения этого микроорганизма наблюдается при использовании модифицированной среды Найта (кровяной агар с бычьей кровью, содержащий 5 мкг/мл клиндамицина, 0,75 мкг/мл гентамицина) (Lariviere *et al.*, 1993) или КРМД (кровяной агар с бычьей кровью, содержащий 3,75 ед./мл бацитрацина, 5 мкг/мл клиндамицина, 0,75 мкг/мл гентамицина и 2,25 мкг/мл амфотерицина В) (Ackermann *et al.*, 1994). Агар Мак-Конки с 1% глюкозы и 20 мкг/мл фуральтадона используется во многих лабораториях как селективная среда для выращивания *B. bronchiseptica* из мазков из носовой полости, однако модифицированная среда Смита-Баскервилля (пептонный агар, содержащий 20 мкг/мл пенициллина, 20 мкг/мл фуральтадона и 0,5 мкг/мл гентамицина) демонстрирует превосходство, особенно если количество бактерий *B. bronchiseptica* низкое (Lariviere *et al.*, 1993; Smith, Baskerville, 1979). Еще большая частота выделения отмечена при использовании кровяного агара, содержащего 40 мкг/мл цефалексина (Lariviere *et al.*, 1993). Кроме того, была описана селективная среда для одновременного выделения *P. multocida* и *B. bronchiseptica*, представляющая собой кровяной агар, содержащий 5 мг/л клиндамицина гидрохлорида, 0,75 мг/л гентамицина сульфата, 2,5 мг/л К-теллурита, 5 мг/л амфотерицина В и 15 мг/л бацитрацина (De Jong, Borst, 1985). Однако следует отметить, что К-теллурит иногда ингибировал рост *P. multocida* типа D (Lariviere *et al.*, 1993).

2.2. Биохимические характеристики

Pasteurella multocida является грамотрицательной биполярной плеоморфной палочкой и образует на кровяном агаре негемолитические сероватые колонии с характерным «сладковатым» запахом. Она не растет на агаре Мак-Конки, но дает положительную реакцию на оксидазу и каталазу и образует индол.

Bordetella bronchiseptica также представляет собой грамотрицательную палочку, образующую на кровяном агаре или среде Борде-Жангу выпуклые колонии диаметром 1–2 мм, обычно гемолитические, после 48 ч роста. Она не образует ферментов, но дает положительную реакцию на оксидазу, каталазу, цитрат и мочевины и растет при 6,5% NaCl.

Для подтверждения идентификации изолятов *B. bronchiseptica* были описаны варианты реакции агглютинации с использованием специфических антисывороток, но соответствующие сыворотки отсутствуют в широком доступе.

2.2.1. Оболочечное типирование *P. multocida*

Оболочечное типирование *P. multocida* полезно для эпидемиологических целей, поскольку *P. multocida* часто имеет слизистую оболочку. Традиционно используется серотипирование на основе реакции непрямой гемагглютинации (Carter, 1955), но лишь несколько лабораторий во всем мире делают и сохраняют требуемые антисыворотки. Однако для различения большинства выделенных от свиней изолятов обычно используются более простые химические методы. Штаммы, образующие оболочку типа D, дают сильную флоккуляцию в водном растворе акрифлавина 1/1000 (Carter, Subronto, 1973), а штаммы с оболочкой типа A можно идентифицировать по ингибированию роста в присутствии гиалуронидазы (Carte, Rundell, 1975). Небольшая часть свиных изолятов не имеет оболочки.

2.2.2. Проведение реакции с акрифлавином для *P. multocida* с оболочкой типа D

- i) Проводят посев каждого испытуемого изолята *P. multocida* в пробирку, содержащую 3 мл бульона с сердечно-мозговым экстрактом, с использованием свежей культуры на кровяном агаре с бычьей кровью. В качестве положительного и отрицательного контроля используют известный штамм с оболочкой типа D и известный штамм с оболочкой типа A.
- ii) Засеянные пробирки инкубируют при 37°C в течение 18–24 ч.
- iii) Осаждают бактерии с помощью центрифугирования и отбрасывают 2,5 мл надосадочной жидкости.
- iv) Добавляют 0,5 мл водного раствора 1/1000 нейтрального акрифлавина. Раствор акрифлавина хранят не более одной недели при 4°C в защищенном от света месте.
- v) Размешивают для ресуспендирования осадка бактерий и инкубируют пробирку при комнатной температуре без встряхивания.
- vi) Через 5 мин осматривают на предмет появления выраженного хлопьевидного осадка.

2.2.3. Проведение реакции с гиалуронидазой для *P. multocida* с оболочкой типа A

- i) Готовят свежие культуры испытуемых изолятов на кровяном агаре с бычьей кровью. В качестве положительного и отрицательного контроля используют известный штамм с оболочкой типа A и известный штамм с оболочкой типа D.
- ii) Каждый испытуемый штамм высевает на отдельную чашку с триптиказо-соевым кровяным агаром с 5% овечьей крови или 6% бычьей крови, делая петлей несколько параллельных линий на расстоянии примерно 3–5 мм друг от друга вдоль диаметра чашки. Для максимальной продукции гиалуронозой кислоты важно, чтобы чашки были свежими, без обезвоживания.
- iii) Линиями густо высевает образующий гиалуронидазу штамм *Staphylococcus aureus* под прямым углом к линиям роста *P. multocida*.
- iv) Чашки инкубируют при 37°C во влажной атмосфере и периодически осматривают в течение до 24 ч. Штаммы типа A должны продемонстрировать выраженное ингибирование роста на участках близ линий роста *S. aureus*.

2.2.4. Типирование соматического антигена *P. multocida*

Различия липополисахаридов клеточной стенки штаммов *P. multocida* обеспечивают основу для типирования соматических антигенов. В реакции гель-диффузионной преципитации можно выявить 16 типов (Heddleston *et al.*, 1972), при этом у свиней чаще всего обнаруживается тип 3. Хотя требуемая для этого антисыворотка отсутствует в широком доступе, многие референтные лаборатории и некоторые диагностические лаборатории проводят типирование соматического антигена.

2.2.5. Обнаружение токсина *P. multocida*

Диагностика прогрессирующего атрофического ринита зависит от характеристики изолятов *P. multocida* как токсинообразующих. Термолабильный токсин *P. multocida* вызывает некроз кожи у морских свинок и приводит к гибели мышей при внутрибрюшинном введении. Токсинообразование может также быть продемонстрировано *in vitro* в результате изучения цитопатического действия в монослоях клеток легких эмбриона крупного рогатого скота (EBL) (Rutter, Luther, 1984), клеток почек африканских зеленых мартышек (Vero) (Pennings, Storm, 1984) или клеток носовой раковины крупного рогатого скота (Eamens *et al.*, 1988). Бактерии выращивают в бульоне с сердечно-мозговым экстрактом, инкубируемым при 37°C в течение 24 ч, а затем осаждают путем центрифугирования. Надосадочную жидкость стерилизуют путем фильтрования и титруют на монослоях культуры клеток в микротитровальных планшетах. После инкубации при 37°C в течение 2–3 дней монослои окрашивают кристаллическим фиолетовым и изучают под микроскопом для выявления цитопатического действия. Быстрый тест на культуре клеток, в котором подозрительные колонии выращивают на агаровой аппликации на клетках EBL (Chanter *et al.*, 1986), обеспечивает более эффективный анализ большого количества изолятов.

Твердофазный иммуноферментный анализ (твердофазный ИФА) с использованием моноклональных антител позволяет выявить токсин в смеси бактерий, полученных из первичной среды для выделения (Foged, 1992). Это важное преимущество, поскольку свиньи могут одновременно быть колонизированы смесью токсинообразующих и нетоксинообразующих штаммов (Ackermann *et al.*, 1994; De Jong, 2006). При использовании методов культуры клеток потребовалось бы изучение каждой колонии *P. multocida* в образце, что практически невозможно, чтобы достигнуть того же уровня чувствительности, что в твердофазном ИФА.

Данный твердофазный ИФА имеется в продаже в Европе и некоторых других регионах мира¹ (но не в США) и является общепринятым во многих областях как предпочтительный метод выявления носителей и борьбы с прогрессирующим атрофическим ринитом. Хотя данный метод отличается высокой специфичностью, наличие положительного результата без наличия заболевания в прошлом или без признаков, позволяющих подозревать данное заболевание, требует тщательных исследований для выделения токсинообразующих изолятов от животных, пробы которых были исследованы.

2.3. Молекулярные методы

Основой идентификации токсинообразующих штаммов *P. multocida* и *B. bronchiseptica* во многих лабораториях являются морфология колоний и биохимические методы. Однако существует много методов анализа, основанных на использовании ДНК-зондов (Kamps *et al.*, 1990; Register *et al.*, 1998) или полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Kamp *et al.*, 1996; Lichtensteiger *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 1994; Register, DeJong, 2006), для выявления токсинообразующих штаммов *P. multocida* и/или *B. bronchiseptica* от свиней, которые представляют собой более быстрые, более специфичные и более чувствительные диагностические методы. Диагностические лаборатории все чаще используют ПЦР для идентификации этих возбудителей, поскольку оборудование и опыт становятся все более доступными. Важное значение имеет надлежащая внутренняя валидация с известными контролями, а также стандартизированный непрерывный контроль качества (см. главу 1.1.6. «Принципы и методы валидации диагностических наборов для анализа инфекционных заболеваний»).

Множественная ПЦР для типирования оболочки *P. multocida* (Townsend *et al.*, 2001) представляется методом, дающим более надежные результаты, чем фенотипические

¹ За информацией о наличии/покупке обращайтесь в компанию «DakoCytomation Denmark A/S», Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Дания; <http://www.dakocytomation.com>.

методы, и часто используется в имеющихся соответствующее оборудование диагностических лабораториях.

Различные методы фингерпринтинга ДНК, включая рестрикционный эндонуклеазный анализ (REA), риботипирование, гель-электрофорез в импульсном поле и методы на основе ПЦР были оценены различными группами исследователей на предмет использования для различения изолятов *P. multocida*. Было проведено несколько прямых сопоставлений методов с использованием штаммов, выделенных от свиней с атрофическим ринитом, но в настоящее время REA является методом выбора для эпидемиологических исследований, поскольку обеспечивает высокий уровень различения штаммов без необходимости в особом оборудовании или реактивах (Djordjevic *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 1994; Harel *et al.*, 1990)

3. Серологические реакции

В настоящее время нет пригодных серологических реакций, позволяющих надежно выявлять животных, инфицированных токсинообразующими штаммами *P. multocida*, у которых может развиваться заболевание или которые могут передавать инфекцию. Выявление антител к *P. multocida* не может быть полезным, поскольку нетоксинообразующие штаммы имеют много антигенов, обладающих перекрестной реактивностью с антигенами токсинообразующих штаммов. Для выявления антител к токсину *P. multocida* был разработан метод твердофазного ИФА (Foged, 1992), имеющийся в продаже в Европе и некоторых других регионах мира (см. сноску 1). Однако у многих животных, инфицированных токсинообразующими штаммами *P. multocida*, не образуются антитела к токсину, и широкое использование содержащих токсин вакцин ограничивает диагностическую ценность этого метода твердофазного ИФА стадами, в которых не проводилось вакцинации, и выявлением реакции на вакцину в вакцинированных стадах.

Инфицирование *B. bronchiseptica* можно выявить серологически с помощью реакции агглютинации с обработанными формалином бактериями или с использованием более чувствительного метода твердофазного ИФА (Venier *et al.*, 1984). Если речь не идет о мониторинге состояния серонегативного стада, обнаружение антител к *B. bronchiseptica* не имеет значения, поскольку этот микроорганизм присутствует во многих внешне здоровых стадах свиней.

С. ТРЕБОВАНИЯ К ВАКЦИНАМ

1. Вводная информация

В продаже имеется несколько вакцин, содержащих цельноклеточные бактерии *B. bronchiseptica* в комбинации с бактерином токсинообразующей *P. multocida* и/или токсиндом *P. multocida*. Бактерин токсинообразующей *P. multocida* чаще всего относится к оболочечному типу D, но некоторые вакцины, кроме того, содержат и штамм типа A, который может быть токсинообразующим или нетоксинообразующим. Имеются также живые аттенуированные вакцины против *B. bronchiseptica*. Вакцины, содержащие только *B. bronchiseptica*, непригодны для борьбы с прогрессирующим атрофическим ринитом, но могут быть полезны в стадах с непрогрессирующей формой. Вакцины против *Pasteurella multocida* и *B. bronchiseptica* снижают уровень колонизации животных этими бактериями, но не приводят к их элиминации и не предотвращают заражение. Большинство имеющихся в продаже вакцин содержат или масляный адъювант, или гель гидроксида алюминия.

Токсин *P. multocida* является единственным наиболее важным защитным антигеном в отношении прогрессирующего атрофического ринита. Вакцины на основе токсина *P. multocida* обеспечивают специфическую защиту от действия токсина, который сам по себе может использоваться для воспроизведения всех основных признаков данного заболевания (см. обзор Foged, 1992). Уровень продукции токсина *P. multocida*

относительно низкий, и индукции образования токсинспецифических антител под действием содержащих только бактериин вакцин может быть недостаточно. Очищенный токсид (инактивированный формальдегидом) обладает большей иммуногенностью, чем неочищенный токсид, и на иммуногенность инактивированной формы не влияет смешивание с бактерином *B. bronchiseptica*. Однако трудность и затратность широкомасштабной очистки из культур *P. multocida* препятствует рутинному включению нативного химически инактивированного токсиды в вакцины. Рекомбинантные вакцины, содержащие белки субъединицы токсина или генетически декотсифицированные производные полномолекулярного токсина обладают высокой эффективностью, и их производство менее затратно (Hsuan *et al.*, 2009; Pejsak *et al.*, 1994). Вакцина, содержащая ДНК, кодирующую полномолекулярный, но ферментативно инактивированный токсид, продемонстрировала высокую иммуногенность у свиней, но ее эффективность в случае заражения пока не оценена (Register *et al.*, 2007).

Bordetella bronchiseptica образует несколько токсинов и адгезинов, которые являются потенциальными факторами вирулентности у свиней. Была продемонстрирована эффективность лишь одного из них, белка наружной мембраны пертактина, в отношении профилактики заболевания у свиней (Kobisch, Novotny, 1990). Несмотря на этот факт, вызывающий некроз кожи токсин, образуемый *B. bronchiseptica*, помимо токсина, образуемого *P. multocida*, традиционно считается основным фактором вирулентности и защитным иммуногеном у свиней (De Jong, 2006). Ряд исследований убедительно свидетельствуют о том, что токсин является фактором вирулентности и, без сомнения, играет роль в патогенезе и, возможно, в профилактике. Однако роль пертактина и некоторых других факторов вирулентности в защитном иммунитете, скорее всего, равна или даже важнее таковой токсина.

Bordetella bronchiseptica обладает фенотипической изменчивостью в определенных условиях роста (например, при температуре ниже 37°C или в присутствии химических модуляторов, таких как MgSO₄ или никотиновая кислота), в которых образование большинства факторов вирулентности обратимо снижается. При культивировании с низкой частотой обнаруживаются спонтанные мутанты, постоянно неспособные образовывать большинство факторов вирулентности. Важное значение для поддержания культур в фазе I (также называемой Bvg⁺), или вирулентном состоянии, имеет обращение внимания на морфологию колоний, площадь чашки, занятую хорошо разделенными колониями. Колонии фазы I небольшие (1–2 мм в диаметре), выпуклые и гемолитические на кровяном агаре. Прекращение гемолиза и появление более крупных плоских колоний указывает на переход в авирулентную форму. По возможности культуры следует размножить с использованием отдельных гемолитических колоний для минимизации медленного накопления авирулентных клонов в культуре.

2. Краткое описание производства и минимальные требования к традиционным вакцинам

2.1. Характеристики посевного вируса

2.1.1. Биологические характеристики

Для штаммов бактерий, используемых для получения цельноклеточных бактеринов, а также для штаммов, из которых получают очищенные антигены, следует использовать систему посевных серий.

В случае цельноклеточных бактеринов следует описать происхождение и историю штаммов *P. multocida* и *B. bronchiseptica* и дать полную характеристику исходного посевного материала в протоколе серии исходного посевного материала. *Bordetella bronchiseptica*, используемая для изготовления вакцины, должна быть представлена вирулентной культурой фазы I, а используемые изоляты *P. multocida* должны быть токсинообразующими.

Рабочий посевной материал, используемый для производства вакцины, должен быть получен из исходного посевного материала, и все значимые свойства должны быть проверены в соответствии с протоколом серии исходного посевного материала.

2.1.2. Критерии качества

И исходный посевной материал, и рабочий посевной материал должны представлять собой чистые культуры, не контаминированные бактериями, микоплазмами и вирусами. Подлинность видов бактерий и образование соответствующих антигенов должны быть подтверждены.

2.2. Способ изготовления

2.2.1. Описание процедуры производства

Точная информация по стандартам для производства эффективных коммерческих вакцин отсутствует, но известно, что они содержат 10^{10} формализированных клеток *B. bronchiseptica* и 10 мкг токсина *P. multocida* в одной дозе. Для *Bordetella bronchiseptica* должно быть подтверждено, что культура находится в фазе I, а для *P. multocida* должно быть подтверждено, что культура содержит достаточные уровни токсина. Для производственной культуры следует использовать установленное количество пассажей. Клетки *Bordetella bronchiseptica* и клетки *P. multocida* и/или токсин инактивируются, детоксифицируются и соединяются с адьювантом. Поскольку токсин *P. multocida* является внутриклеточным и высвобождается при лизисе клеток в стационарной фазе, надосадочную жидкость следует забирать примерно через 48 ч после окончания экспоненциальной фазы роста.

2.2.2. Требования к средам

Все штаммы бактерий должны размножаться в средах, поддерживающих эффективный рост и обеспечивающих оптимальную экспрессию антигенов, важных для индукции образования защитных антител.

2.2.3. Внутрипроизводственный контроль

Семенные и производственные культуры высевают на чашки с кровяным агаром и инкубируют. На этих чашках не должно наблюдаться роста неспецифических колоний. Культуры инактивируются формальдегидом. Проводятся испытания для проверки эффективности процесса инактивации и для анализа на остаточный формальдегид. Количественное определение антигенов проводится путем подсчета общего количества клеток с использованием камеры для подсчета количества бактерий при определении количества целых клеток или путем определения массы антигенов для установленных антигенов, например, токсина *P. multocida*, с помощью количественного иммуноферментного анализа.

2.2.4. Испытания партии готового препарата

Каждая серия вакцины должна быть испытана на стерильность в соответствии со стандартными методами (см. главу 1.1.9. «Испытания биологических материалов на стерильность и отсутствие контаминации»), описанные в Европейской фармакопее или Своде федеральных нормативных документов США.

Каждая серия вакцины должна быть испытана на безопасность у вида животных, для которых она предназначена, путем введения двойной дозы с использованием рекомендованного способа вакцинации, а затем введения одной дозы через 2 недели. Не должно наблюдаться аномальных местных или системных реакций. В случае использования консерванта концентрация должна определяться для каждой серии. Она не должна превышать максимально допустимый уровень.

Каждая серия вакцины должна быть испытана на активность с использованием валидированного серологического метода, коррелирующего с защитой, выявленной при изучении эффективности, как описано в разделе С.2.3.2. Испытание на активность не обязательно проводится с животными, для которых вакцина предназначена – можно использовать мышей или кроликов. В этих случаях должна быть продемонстрирована корреляция уровней защитных антител с таковыми у целевого вида животных.

2.3. Требования к регистрации

2.3.1. Требования к безопасности

Хотя инактивация бактериальных культур с помощью валидированного метода является стандартной процедурой, оба вида бактерий образуют вызывающие некроз кожи токсины, и детоксификация этих токсинов должна быть подтверждена, если токсиноиды используются в качестве компонентов вакцины. Должны быть проведены стандартные испытания на безопасность для инактивированных вакцин (см. главу 1.1.8. «Принципы производства ветеринарных вакцин»).

Если в качестве адъюванта используется масляная эмульсия, случайное введение вакцины себе лицом, проводящим вакцинацию может вызывать сильную местную реакцию. В таких случаях следует немедленно обратиться за медицинской помощью и обработать рану как рекомендуется в случае травмы с введением смазочных материалов.

2.3.2. Требования к эффективности

Обычно эта вакцина применяется на поздних сроках супоросности, чтобы потомство было защищено в результате получения антител с молозивом. Эффективность испытываемой вакцины должна быть определена путем вакцинирования групп супоросных свиноматок. Их потомство должно быть заражено вирулентными культурами *B. bronchiseptica* и токсинообразующими *P. multocida*. Должна иметь место выраженная профилактика клинических признаков атрофического ринита, т.е. атрофии носовой раковины. Сравнение клинических признаков у контрольных и вакцинированных животных может быть проведено в соответствии с системой баллов Done (1976).

Если вакцина может применяться независимо от стадии беременности, продолжительность иммунитета должна составлять не менее 6 месяцев, чтобы бустер-вакцинация два раза в год могла поддержать эффективные уровни антител.

2.3.3. Стабильность

Каждая серия вакцины должна проходить ускоренные испытания на стабильность при хранении с корреляцией с результатами испытаний на хранение в режиме реального времени.

3. Вакцины, основанные на использовании биотехнологических методов

Было описано и исследовано в экспериментальных условиях много вакцин, содержащих ферментативно инертные субъединицы токсина *P. multocida* или полномолекулярный токсин, инактивированный в результате мутации. Рекомбинантные белки обычно экспрессируются *Escherichia coli* и перед использованием очищаются. В настоящее время в продаже имеется лишь несколько вакцин, содержащих рекомбинантный токсин или субъединицы токсина; они могут включать, а могут не включать бактериин *P. multocida*. Имеющиеся в настоящее время данные свидетельствуют о том, что такие вакцины обеспечивают уровни токсинспецифических антител, равные или более высокие, чем уровни, достигаемые при применении вакцин, содержащих нативный химически инактивированный токсин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- ACKERMANN M.R., DEBEY M.C., REGISTER K.B., LARSON D.J. & KINYON J.M. (1994). Tonsil and turbinate colonization by toxigenic and nontoxigenic strains of *Pasteurella multocida* in conventionally raised swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 375–377.
- CARTER G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.
- CARTER G.R. & RUNDELL S.W. (1975). Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.*, **96**, 343.
- CARTER G.R. & SUBRANTO P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 293–294.
- CHANTER N., RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1986). Rapid detection of toxigenic *Pasteurella multocida* by an agar overlay method. *Vet. Rec.*, **119**, 629–630.
- DE JONG M.F. (2006). In: Diseases of Swine, Ninth Edition, Straw B.E., Zimmerman J.J., d'Allaire S. & Taylor D.J., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 577–602.
- DE JONG M.F. & BORST G.H. (1985). Selective medium for the isolation of *P. multocida* and *B. bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, **116**, 167.
- DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., HA H., WALKER M.J. & CHIN J.C. (1998). Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxigenic (toxA-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxigenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 679–688.
- DONE J.T. (1976). Porcine atrophic rhinitis: snout radiography as an aid to diagnosis and detection of the disease. *Vet. Rec.*, **98**, 23–28.
- DONNIO P.Y., ALLARDET-SERVENT A., PERRIN M., ESCANDE F. & AVRIL J.L. (1999). Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J. Med. Microbiol.*, **48**, 125–131.
- EAMENS G.J., KIRKLAND P.D., TURNER M.J., GARDNER I.A., WHITE M.P. & HORNITZKY C.L. (1988). Identification of toxigenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. *Aust. Vet. J.*, **65**, 120–123.
- FOGED N.T. (1992). *Pasteurella multocida* toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *APMIS Suppl.*, **25**, 1–56.
- GARDNER I.A., KASTEN R., EAMENS G.J., SNIPES K.P. & ANDERSON R.J. (1994). Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 442–447.
- GATLIN C.L., JORDAN W.H., SHRYOCK T.R. & SMITH W.C. (1996). The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 121–126.

- HAREL J., COTE S. & JACQUES M. (1990). Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 422–426.
- HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitation test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
- HSUAN S.-L., LIAO C.-M., HUANG C., WINTON J.R., CHEN Z.-W., LEE W.-C., LIAO J.-W., CHEN T.-H., CHIOU C.-J., YEH K.-S. & CHIEN M.-S. (2009). Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine*, **27**, 2923–2929.
- KAMP E.M., BOKKEN G.C., VERMEULEN T.M., DE JONG M.F., BUYS H.E., REEK F.H. & SMITS M.A. (1996). A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 304–309.
- KAMPS A.M., BUYS W.E., KAMP E.M. & SMITS M.A. (1990). Specificity of DNA probes for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* strains. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1858–1861.
- KOBISCH M. & NOVOTNY P. (1990). Identification of a 68 kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.*, **58**, 352–357.
- LARIVIERE S., LEBLANC L., MITTAL K.R. & MARTINEAU G.P. (1993). Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 364–367.
- LICHTENSTEIGER C.A., STEENBERGEN S.M., LEE R.M., POLSON D.D. & VIMR E.R. (1996). Direct PCR analysis for toxigenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 3035–3039.
- MAGYAR T., KOVÁCS F., DONKÓ T., BÍRÓ H., ROMVÁRI R., KOVÁCS M. & REPA I. (2003). Turbinate atrophy evaluation in pigs by computed tomography. *Acta Vet. Hung.*, **51**, 485–491.
- MAROIS C., FABLET C., GAILLOT O., MORVAN H., MADEC F. & KOBISCH M. (2009). Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1830–1836.
- NAGAI S., SOMENO S. & YAGIHASHI T. (1994). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1004–1010.
- PEDERSEN K.B., NIELSEN J.P., FOGED N.T., ELLING F., NIELSEN N.C. & WILLEBERG P. (1988). Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition. *Vet. Rec.*, **122**, 190–191.
- PEJSAK Z., WASIŃSKA B., MARKOWSKA-DANIEL I. & HOGG A. (1994). Field evaluation of thirteen regimens for the control of progressive atrophic rhinitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**, 125–132.

- PENNINGS A.M. & STORM P.K. (1984). A test in vero cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of having atrophic rhinitis. *Vet. Microbiol.*, **9**, 503–508.
- REGISTER K.B. & DEJONG K.D. (2006). Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.*, **117**, 201–210.
- REGISTER K.B., LEE R.M. & THOMSON C. (1998). Two-color hybridization assay for simultaneous detection of *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* from swine. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 3342–3346.
- REGISTER K.B., SACCO R.E. & BROCKMEIER S.L. (2007). Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine*, **25**, 6118–6128.
- RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1984). Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.*, **114**, 393–396.
- SMITH I.M. & BASKERVILLE A.J. (1979). A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **27**, 187–192.
- TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.
- VENIER L., ROTHSCHILD M.F. & WARNER C.M. (1984). Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: comparison of agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay methods. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 2634–2636.