

УДК 619: 616.98:636.4-053

НЕОНАТАЛЬНЫЕ ПОРОСЯТА КАК БИОИНДИКАТОР ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ЭДС В ОЧАГЕ ИНФЕКЦИИ

Масюк Д. Н., Сосницкий А. И., Коляда С. Г., Кокарев А. В., Шаталов С. А.
*Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет,
г. Днепр, Украина, e-mail: plpprt@ua.fm*

Описано возникновение и развитие энзоотического процесса альфавирусной коронаинфекции на свинопоголовье и формирование очага эмерджентной инфекционной патологии среди благополучного стада, после заноса возбудителя инфекции с автотранспортом мясокомбината.

Отмечена индикаторная биороль неонатальных поросят в этиопатогенезе и клиническом проявлении ЭДС, так как контагиозность PEDV для новорожденных поросят и летальность до 5-ти суточного возраста стремятся к 100 %. Клинические проявления и патологоанатомические изменения описывались в рамках диарейного синдрома, патогномонический симптом – водянистая диарея.

В сыворотках крови половозрелых животных благополучного стада, через месяц после проявления у них диарейного синдрома с явлениями гастроэнтерита, с помощью ELISA выявляли IgG к антигенам PEDV. После вовлечения в энзоотию неонатальных поросят – зарегистрировали типичный симптомокомплекс ЭДС и массовый падеж, в этом проявилась их биоиндикаторная функция в отношении эмерджентного вируса. В фекалиях заболевших животных в очаге инфекции, независимо от возраста, регулярно регистрировали методом PCR-RT PEDV.

Кишечная микрофлора была представлена непатогенной транзитной гнилостной микрофлорой, различного таксономического подчинения, с высокой ферментативной активностью. Физиологически полезная резидентная пробиотическая микрофлора отсутствовала.

Ключевые слова: ЭДС, эмерджентная патология, энзоотия, неонатальные поросята, биоиндикаторы PEDV, диарейный синдром, водянистая диарея, кишечная микрофлора, PCR-RT, ELISA

Эпидемическая диарея свиней (ЭДС, PED) – это эмерджентная высоко контагиозная зоонозная вирусная инфекция свиней с фекально-оральным путем передачи вируса и преимущественным развитием летального диарейного синдрома у неонатальных поросят. Возбудитель ЭДС – *Alphacoronavirus PEDV*, семейство *Coronaviridae* [1, 3, 4].

Болеют свиньи всех возрастных групп, но наиболее восприимчивы новорожденные поросята до 10 дней, у них развивается изнурительная водянистая диарея, дегидратация, метаболический ацидоз, интоксикация, истощение и гибель. С рождения до 5 дней падеж достигает 100 %; с 6 до 10 дней – 60 %; с 11 до 15 дней – 30 %, далее 3 % и менее. Поросята-сосуны заболевают в первые дни жизни и гибнут через 2–4 дня, поэтому их бесполезно иммунизировать. Единственная специфическая иммунобиологическая защита – колостральные иммуноглобулины, создающие лактогенный иммунитет [1, 2, 8].

ЭДС впервые зарегистрировали в Англии в 1971 г, затем в Бельгии в 1978 г, где был изолирован референтный штамм CV 777. С 1980 по 1990 гг. ЭДС широко распространилась в Европе. С 1995 по 2011 гг. ЭДС проникла в Японию, Корею, Китай и Таиланд. В 2005 г. ЭДС установили в РФ, в 2013 г. – в США, в 2014 г. – в Украине [2, 6, 7].

Высокоэффективных и биобезопасных способов специфической иммунопрофилактики и терапии не разработано, а существующие биопрепараты не обеспечивают эрадикации возбудителя и надежной защиты от экспансии PEDV на восприимчивом контингенте животных, поэтому развитие эпизоотии ЭДС является трудно контролируемым процессом. Практически поголовная гибель неонатальных поросят и отсутствие этиопатогенетической коррекции инфекционного процесса, т.е. неуправляемость экспансии возбудителя на свинопоголовье, приводит к колоссальным экономическим потерям в промышленном свиноводстве, что дает основания для отнесения ЭДС к эмерджентным и особо опасным инфекциям в свиноводстве [5, 8].

Цель работы: изучить этиопатогенез диарейного синдрома неонатальных поросят и энзоотический процесс инфекционной патологии кишечного тракта среди свиней, индуцированный альфакоронавирусом.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования биоматериала от больных животных выполнены в НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского ГАЭУ.

Клинико-эпизоотологический анализ инфекционной ситуации в неблагополучном хозяйстве проводили используя рутинные методологии сбора и обработки данных характеризующих симптомокомплекс заболевания, с учетом клинических признаков, возраста, распространения и продолжительности инфекционной патологии, количества павших и заболевших, патологоанатомических изменений на вскрытии.

Бактериологическое исследование содержимого желудочно-кишечной трубки исследуемых поросят включало индикацию и идентификацию микробионтов различного таксономического подчинения. Для выделения аэробных бактерий использовали простые и обогащенные питательные среды, а именно: МПБ и МПА в нативном виде и с добавлением 10 % сыворотки

крови, сердечно-мозгової бульон, агар Эндо, XLD агар. Анаэробы ізолювали посевом матеріала в бульон Кита-Тароци і на кровяній 5 % агар, плесени і дрожжі – на агар Сабуро. Для індикації пробіотическої мікрофлори іспользували посеви на прості среди с добавлением мела і гідролізованного казеїна.

Морфо-тинкторіальні і біохіміческіє свойства полевих культур ізучали рутинними методами. Патогенность ідентифікованих суточних культур мікроорганізмів определяли в біопробе на білих мишах. Бульонну культуру іспользуемого мікроорганізма в об'єме 0,3 см³ вводили підкожно 4 білим мишам, живої масою 18–20 г.

Серодіагностику ЭДС проводили с помощью ELISA на імуноферментном анализаторе-фотометре BioTek ELx800 (США), іспользуя тест-систему «Swinecheck® PED» («Biovét», Канада). Согласно інструкції к набору, сыворотки считаються положительними по ЭДС при значении S/P образца выше 0,4 Ед, при их разведении 1:200.

Індикацію *PEDV* в біоматеріалі і его количественную характеристику осуществляли методом PCR-RT с помощью тест-системы «EZ-RED/TGE/PDCoV MPX 1.0 Real time RT-PCR» на амплификаторе CFX 96 Real-Time System фирмы BIO RAD (США).

Результаты исследований. В одном из свиноводческих предприятий, расположенном в центральном регионе Украины, провели клинко-эпизоотологический анализ і лабораторное исследование чрезвычайно контагиозной инфекционной патологии с диарейным синдромом і высокой, практически поголовной гибелью неонатальных поросят. Общая численность поголовья на предприятии составляет более 20000 голов свиней. Каждую неделю на свиномкомплексе рождається свыше 2800 поросят.

Первоначально вспышка ЭДС в виде легкого течения водянистой диареи возникла среди ремонтных свиноматок, после приезда в хозяйство скотовоза с мяскокомбината, где производился забой свиней из неблагополучного пункта. Выяснилось, что рабочие обслуживающие автомашину, заходили в свинарник без соблюдения санитарно-эпизоотических мер предосторожности (не переодевались, не пользовались дезковриком). Заболевание возникло через сутки после посещения животноводческого помещения посторонними лицами. Кишечная патология в течение 4-х суток распространилась на большую часть свиноматок свинарника, у четверти стада расстройства дефикации не замечено. Симптомкомплекс кишечного расстройства включал быстро проходящую водянистую диарею без общеорганизменных отклонений от физиологической нормы, температурная реакция отсутствовала, поедаемость корма не уменьшилась, поведенческие реакции не изменились. Через 5–6 суток после появления первых случаев легкого клинического течения диареи, состояние животных в свинарнике нормализовалось. Появление быстропроходящей диареи среди половозрелых свиноматок не вызвало беспокойства у животноводов і было оставлено без надлежащего внимания, причиной незначительного кишечного расстройства сочли погрешности в кормлении.

Через месяц после кишечного расстройства, неопределенной этиологии на момент происходящего события, были проведены ретроспективные диагностические мероприятия по сероіндикации IgG к Ag капсида *PEDV* в ELISA. Для этого у 10 % свиней (n=60; N=600) свинарника, отобранных методом случайной бесповторной выборки, взяли кровь для проведения серологических исследований. В результате получили диагностические титры у 92 % образцов в разведении 1:200, что подтвердило предварительный диагноз на ЭДС і пути заноса инфекции на благополучную территорию. Также, у этих-же животных отобрали пробы фекалий і в PCR-RT идентифицировали РНК *PEDV* в концентрации $1,9 \times 10^7 \pm 0,16 \times 10^6$ (P≤0,01) геном-эквивалентов в 1 г биоматериала.

Клинически энзоотия ЭДС была зарегистрирована у неонатальных поросят, полученных при тутовом опоросе от здоровых свиноматок, через трое суток после поступления в помещение свиноматок, ранее переболевших не диагностированной ЭДС в легкой форме, возникшей непосредственно после посещения свинарника рабочими, обслуживавшими скотовоз мяскокомбината, где производился забой неблагополучных по ЭДС животных (что было подтверждено при дальнейшем эпизоотологическом расследовании путей заноса инфекции).

Все новорожденные поросята, полученные после введения в свинарник животных – носителей і выделителей возбудителя инфекционной патологии – заболели ЭДС с типичным симптомкомплексом.

Поросята начинали поносить через сутки после рождения, у большей части животных понос начинался на 2–3 сутки, реже диарея появлялась на 4–6 сутки. Диарея сочеталась с рвотой, у некоторых поросят рвота была неукротимой і очень мучительной. Фекалии сразу разжижались і превращались в водянистые испражнения, бесцветные или зеленовато-желтые, без примеси крови. Диарея была упорной, не проходила круглосуточно і быстро приводила к дегидратации, животные худели, у них начинали контурировать ребра, позвоночник, маклоки. Кожа становилась морщинистой, неэластичной, сухой, шероховатой. Депрессия быстро усиливалась, поросята заметно слабели, токсические явления, метаболический ацидоз і астения нарастали. Через 3–6 суток течения диарейного синдрома, на фоне гипотермии і прогрессирующего истощения, поросята погибали. Летальность среди поросят, у которых клиника проявлялась в первые 72 часа жизни, составила 100 %. Незначительная часть животных, около 20 % от заболевших, у которых признаки диареи проявились на 4–5 сутки, после тяжелого переболевания, длившегося более 10 суток, на фоне рутинной терапии неспецифического характера – выжили, но они уже не представляли хозяйственной ценности, были отнесены к санитарному браку і удалены из стада.

Диагноз на ЭДС установили с помощью исследования проб фекалий в PCR-RT от 10 % заболевших поросят (n=75; N=770).

В результате PCR-RT идентифицировали РНК *PEDV* в концентрации $0,18 \times 10^7 \pm 0,09 \times 10^6$ (P≤0,01) геном-эквивалентов в 1 г биоматериала.

Поросята, заболевшие после двухнедельного возраста, переносили энтеральные расстройства значительно легче, с незначительным отходом, не имеющим существенного эпизоотического значения, выздоравливали. После переболевания

наблюдалась двухнедельная задержка физиологического развития – постинфекционная астения, с последующим, практически полным восстановлением откормочных кондиций. Для месячных и более старших животных PEDV уже не представлял эмерджентной угрозы.

Павших поросят вскрывали и описывали патологоанатомические изменения. Прежде всего обращает внимание состояние истощения, анемия и тяжелейшей интоксикации в сочетании с явлениями метаболического ацидоза и алиментарной астении. В ЖКТ ярко выражены признаки гастроэнтерита и десквамации секреторного эпителия тонкого и толстого кишечника. Печень, почки и сердечная мышца в состоянии зернистой дистрофии. Регионарные лимфоузлы отечны и гиперплазированы. Селезенка незначительно увеличена, серого цвета. Слизистые анемичны, сосуды спавшиеся, жировые депо внутренних органов истощены.

При бактериологическом обследовании рутинными методами фекалий и содержимого кишечника 8 неонатальных поросят, павших от ЭДС, патогенных микроорганизмов не обнаружили. Также не были изолированы молочно-кислые пробиотические варианты микробиоты. В содержимом кишечника не выявили плесневые грибы и дрожжи. Кишечная микрофлора была представлена банальной транзитной микрофлорой, попавшей в пищеварительный тракт поросят из окружающей среды и преимущественно состояла из гнилостных микроорганизмов с высокой ферментативной активностью, различного таксономического подчинения. Из содержимого кишечника были изолированы бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Coccaceae*. При использовании метода посевов предельных разведений на элективные питательные среды изолировали в чистой культуре и идентифицировали согласно определителю Берджи 18 культур *E. coli*, 6 культур *P. vulgaris*, 7 культур *Klebsiella spp.*, 21 культуру антракоидных бацилл, без видовой идентификации, 16 культур клостридий, из них 4 культуры *C. perfringens*, 7 культур энтерококков. Идентифицированные культуры прокариот обладали типичными для своего вида морфо-тинкториальными, культуральными и биохимическими свойствами. Исключительно высокой сахаролитической активностью характеризовались культуры *C. perfringens*, сильно выраженными протеолитическими потенциями обладали культуры антракоидных бацилл, кишечной палочки и вульгарного протей. При биологическом исследовании патогенных потенциалов идентифицированных культур прокариот на белых мышах гибели инфицированных животных не отмечали в течение 5-ти суток наблюдения, что однозначно можно интерпретировать как показатель апатогенности идентифицированных культур микроорганизмов. Идентифицированные кишечные микроорганизмы оказались чувствительны к неомицину, фрамицетину, апрамицину, триметоприму, линкомицину.

Резюмируя вышеизложенное можно сделать заключение, что PEDV инфицируются свиньи всех возрастных групп, но эмерджентное воздействие возбудитель оказывает на поросят 1–10 суточного возраста, убивая до 100 % помета. С 2-х недельного возраста и далее чувствительность поросят к вирусу резко снижается и с 1–2 месяцев опасность для жизни исчезает. При этом в энзоотический процесс включается все свинополовье, которое становится перманентным источником инфекции для неонатальных поросят.

Патогенез эпидемической диареи у неонатальных неиммунных поросят включает тотальную десквамацию секреторного эпителия дистального отдела ворсинок слизистой оболочки тонкого кишечника, как следствие возникают: обширное воспалительное поле с нейро-гуморальным негативным прессингом по типу положительной обратной связи с дегидратацией, интоксикацией микробиального происхождения и алиментарной дистонией.

Кишечная микрофлора, представленная разнообразными представителями гнилостной транзитной микробиоты, с высокой ферментативной активностью, в процессе бурной жизнедеятельности выделяла огромное количество токсических продуктов метаболизма, оказывающих негативное общеорганизменное воздействие на поросят и усугубляющих течение основного заболевания. При этом необходимо отметить полное отсутствие физиологически позитивной пробиотической микробиоты, что логически нуждается в целенаправленной терапевтической коррекции кишечного микробиоценоза официальными биопрепаратами пробиотиков и симбиотиков.

Выводы. 1. Неонатальные поросята являются биоиндикатором циркуляции вируса ЭДС в очаге инфекции, так как показатели заболеваемости и смертности стремятся к 100 %, при этом диарейный синдром инфекционной патологии с учетом эпизоотологической ситуации является патогномоническим и эмерджентным.

2. Содержимое кишечника больных поросят подвергается гнилостному распаду под влиянием экзоферментов транзитной микрофлоры с последующей общеорганизменной интоксикацией. Пул кишечных прокариот представлен непатогенными аэробными и факультативно-анаэробными бактериями семейств *Coccaeobacteriaceae* и *Enterobacteriaceae*, бациллами, клостридиями с высокой ферментативной активностью. Молочно-кислые микроорганизмы не выявлены.

3. С помощью PCR-RT в фекалиях больных животных идентифицировали РНК PEDV в концентрации от $0,18 \times 10^7 \pm 0,09 \times 10^6$ г.э./г ($P \leq 0,01$) у неонатальных поросят до $1,9 \times 10^7 \pm 0,16 \times 10^6$ г.э./г ($P \leq 0,01$) у половозрелых животных; в ELISA у животных инфицированного стада отмечали диагностические титры IgG в разведении 1:200.

Список литературы

1. Carvajal A. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease // Carvajal A., Argüello H., Martínez-Lobo F.J., Costillas S., Miranda R., de Nova P. J. G., Rubio P. // Porcine Health Management. – 2015. // <http://porcinehealthmanagement.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40813-015-0007-9>
2. Daštjerdi A. Porcine Epidemic Diarrhea Virus among Farmed Pigs, Ukraine. / A. Daštjerdi, J. Carr, J. Richard e.a. // Emerging Infectious Disease – 2015. – V. 21, № 12. – P. 2235-2237. www.cdc.gov/eid.
3. Song D. and Park B., Porcine Epidemic Diarrhea Virus, a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis and vaccines // Virus Genes, 2012. - 44:167-175

4. Stevenson G.W. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions and viral genomic sequences. / G.W. Stevenson, H. Hoang, K.J. Schwartz e.a. // J. Vet Diagn. Invest. – 2013. – V. 25. – P. 649-654. <http://dx.doi.org/10.1177/1040638713501675>
5. Ветеринарне законодавство України: збірник науково-правових актів [Текст] / І.В. Яценко, О.В. Митрофанов, М.М. Бондаренко [та ін.] – Х.: Стиль, 2012. – 316 с.
6. Кокарев А.В. Загальні уявлення про коронавірусні ентерити у свиней та особливості їх лабораторної діагностики. Практичне видання для фахівців агробізнесу «Корми і факти» / А.В. Кокарев, С.Г. Коляда, Г.С. Мовкалова, А.В.Крайній, Д.М. Масюк //– Київ, 2016 – №4 (68). – С. 33–35.
7. Кокарев А.В. Застосування молекулярно-генетичного методу для діагностики епідемічної діареї свиней / А.В. Кокарев, С.А Шаталов, Д.М. Масюк // Матеріали 12 міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини, 2014. – С.48-49. – Режим доступу http://biosafety-center.com/wp-content/uploads/2015/11/2014_3.pdf
8. Сайт Міжнародного Епізоотичного Бюро. Режим доступу: <http://www.oie.int/en>

NEONATAL PIGLETS HOW BIO-INDICATOR CIRCULATION OF VIRUS PED IN THE SITE OF INFECTION

Masiuk D. M., Sosnitsky O. I., Koliada S. G., Kokarev A. V., Shatalov S. A.
DSAEU, Dnipro, Ukraine

We describe the origin and development process alphavirus corona infection enzootic in pigs and the formation of emergent infectious disease outbreak among the free herd, after skidding pathogen with road slaughterhouse.

It noted the role of the biological indicator of neonatal piglets in the etiopathogenesis and clinical manifestations of PED as contagiousness PEDV for newborn piglets and mortality to 5-day-old strive for 100%. Clinical manifestations and pathological changes described under the diarrheal syndrome, pathognomic symptoms - watery diarrhea. The pathogenesis of epidemic diarrhea in neonatal piglets included non-immune total desquamation of secretory epithelium of the distal small intestine villi of the mucous membranes, as a consequence there: a vast field with inflammatory neuro-humoral negative pressure from the type of positive feedback with dehydration, intoxication microbial origin and nutritional dystonia.

In the sera of adult animals from free herds in a month after symptoms have diarrhea syndrome with symptoms of gastroenteritis were detected by ELISA IgG antibodies to antigens PEDV. After involvement in the enzootic neonatal piglets, they have registered a typical symptom and mass deaths in this and manifested their bioindicator function in relation to an emergent virus. In the faeces of diseased animals, regardless of age, pathogen infection was recorded regularly by PCR-RT.

Intestinal flora was nonpathogenic transient putrid microflora of different taxonomic subordination, with a high enzymatic activity. Physiologically useful probiotic microflora resident was absent. Intestinal microbiota putrid transient, with a high enzymatic activity during the tumultuous life activity highlighting the huge amount of toxic metabolic products, has a negative impact on the whole body of pigs and exacerbate the underlying disease. It should be noted the complete absence of physiologically positive probiotic microbiota that requires logical in targeted therapeutic correction of intestinal microbiocenosis officinal biochemicals probiotics. Lack of lactogenic immunity in neonatal pigs is the cause of acute inflammatory and degenerative processes in the mucosa of the small and large intestine, which is accompanied by the loss of the mucous layer of the intestinal tube, and the impossibility of functioning of the digestive system, which together with other factors, pathologic process leads fatal.

Highly and biosafety methods and specific immunization therapy is not developed, and existing biologics do not ensure eradication of the pathogen and protection against expansion PEDV susceptibility cohort animals, so the development of epizootic PED is difficult to control the process. Practically: universal death of neonatal piglets and no etiopathogenic correction infection, uncontrollability expansion of the pathogen in pigs, resulting in huge economic losses in the industrial pig farming, which gives grounds to classify PED to emergent and especially dangerous infections in swine.

Keywords: PED emergent pathology, enzootic, neonatal piglets bioindicators PEDV, diarrheal syndrome, watery diarrhea, intestinal microflora, PCR-RT, ELISA