

ISSN 2409-9023 (Online)
bulletin-biosafety.com

Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC

Detection, control of distribution and evaluation of the effectiveness of curative and preventive measures against swine salmonellosis using ELISA

K. O. Krutiy, D. M. Masiuk, A. V. Kokarev, S. H. Kolyada, Yu. V. Hustova, N. Yu. Neverkovets

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Article info
Received 15.10.2017
Received in revised form 21.10.2017
Accepted 30.10.2017
Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University,
Sergii Efremov Str., 25,
Dnipro, 49600, Ukraine
Tel.+38056-236-17-14
E-mail:
plppm@ua.fm

Salmonellosis, an infectious disease caused by bacteria of the genus Salmonella and inflicts substantial economic losses pig farms. The aim of the work was to determine the distribution of salmonella among pigs on the farm and to establish the effectiveness of treatment and prevention measures using ELISA. For serological tests by random sampling, serum received from pigs before and after medical and preventive measures at 25, 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151 and 165 days of life. From each age group, blood was taken from five animals. The scheme of medical and preventive measures, ELISA and preventive measures used on the farm was developed taking into account the results of the initial serological study. ELISA research was carried out at the Scientific research centre of biosafety and environmental control resources of the agroindustrial complex of the Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University at the BioTek EL×800 (USA) analyzer-photometer using the Swine Salmonella test ("IDEXX" USA). Specific antibodies to the antigen LPS Salmonella sp. serogroup B, C1 and D found in a titer 1:20. According to the instruction, the sample is positive when the value of S/P is greater than or equal to 10%. Variational statistical processing of the results was carried out using a statistical package (StatSoft Inc. USA). To compare the results, Student's criterion was used. Selected parameters listed below in the text, with the following notation: M – arithmetic mean of S/P, m – mean square deviation. The difference is statistically significant at $p < 0.05$ and lower. The results of the study of blood samples from animals to the treatment-preventative measures indicate circulation in a herd of eukaryotes of the genus Salmonella. It was determined that the investigated farm is seropositive for salmonellosis, the prevalence of which among the pig population is 85%. It has been determined that passive immunity in piglets to Salmonella antigens stay during the first 39 days of life, after which a "serological window" is formed from 53 to 67 days, which promotes the activation of infection in older animals. It was established that the realization of treatment and prophylactic measures for salmonellosis, formed on the basis of the results of serological monitoring, contributes to decrease the prevalence of the disease in the herd in 5,3 times.

Key words: salmonella; swine; seraprevalence; antibody; medical and preventive measures; ELISA

Выявление, контроль распространения и оенка эффективности лечебно-профилактических мероприятий при сальмонеллезе у свиней методом ELISA

К. А. Крутий, Д. Н. Масюк, А. В. Кокарев, С. Г. Коляда, Ю. В. Густова, Н. Ю. Неверковец

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, Днепр, Украина

Сальмонеллез, это инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Salmonella* что, наносит значительный экономический ущерб свиноводческим хозяйствам. Целью работы было определить распространение сальмонеллеза среди свиней в хозяйстве и установить эффективность проведения лечебно-профилактических

Citation:
Krutiy K. O., Masiuk D. M., Kokarev A. V., Kolyada S. H., Hustova Yu. V., Neverkovets N. Yu. (2017). Detection, control of distribution and evaluation of the effectiveness of curative and preventive measures against swine salmonellosis using ELISA. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC, 5(4), 25–30.*

мероприятий, используя ELISA. Для проведения серологических исследований методом случайной бесповторной выборки получили сыворотку крови от свиней до и после проведения лечебно-профилактических мероприятий на 25, 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151 и 165 сутки жизни. С каждой возрастной группы кровь отбирали от 5 животных. Схему лечебно-профилактических мероприятий, которую использовали в хозяйстве разрабатывали с учетом полученных результатов первичного серологического исследования. ELISA исследования проводили в НИЦ биобезопасности и экологического контроля ресурсов АПК Днепропетровского государственного аграрно-экономического университета на анализатор-фотометре BioTek EL×800 (США) с использованием тест-системы "*Swine Salmonella*" ("IDEXX" США). Специфические антитела к антигену *LPS Salmonella sp*. серогруппы B, C1 и D выявляли в титре 1:20. Согласно инструкции к набору, пробы считали положительным при значении показателя S/P больше или равно 10%. Вариационную статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью статистического пакета (StatSoft Inc. USA). Для сравнения результатов использовали критерий Стьюдента. Выборочные параметры, указанные ниже по тексту, имеют следующие обозначения: M - среднее арифметическое показателя S/P, m - среднее квадратическое отклонение. Разницу считают статистически достоверной при $p < 0,05$ и ниже. Результаты исследования образцов крови от животных до проведения мероприятий, указывают на циркуляцию в стаде эукариот рода *Salmonella*. Установлено, что исследуемое хозяйство является серопозитивным за сальмонеллезом, распространенность которого среди свинопоголовья составляет 85%. Определено, что пассивный иммунитет у поросят к антигенам *Salmonella sp*. сохраняется в течение первых 39 суток жизни, после чего с 53 по 67 сутки образуется "серологическое окно", которое способствует активации инфекции у животных старших возрастных групп. Установлено, что проведение лечебно-профилактических мероприятий против сальмонеллеза, сформированных с учетом результатов серологического мониторинга, способствует снижению распространенности заболевания в стаде в 5,3 раза.

Ключевые слова: сальмонелла; свиньи; серопревалентность; антитела; лечебно-профилактические мероприятия; ELISA

Виявлення, контроль поширення та оцінка ефективності лікувально-профілактичних заходів за сальмонельозу свиней методом ELISA

К. О. Крутій, Д. М. Масюк, А. В. Кокарєв, С. Г. Коляда, Ю. В. Густова, Н. Ю. Неверковець

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпро, Україна

Сальмонельоз, це інфекційне захворювання, що викликається бактеріями роду *Salmonella* та наносить значні економічні збитки свинарським господарствам. Метою роботи було визначити поширення сальмонельозу серед свиней у господарстві та встановити ефективність проведення лікувально-профілактичних заходів, використовуючи ELISA. Для проведення серологічних досліджень методом випадкової бесповторної вибірки отримали сироватку крові від свиней до та після проведення лікувально-профілактичних заходів на 25, 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151 та 165 добу життя. З кожної вікової групи, кров відбирали від 5 тварин. ELISA дослідження проводили на аналізаторі–фотометрі BioTek EL×800 (США) із використанням тест-системи "*Swine Salmonella*" ("IDEXX" США). Результати дослідження зразків крові від тварин до проведення заходів, вказують на циркуляцію у стаді еукаріот роду *Salmonella.* З'ясовано, що досліджуване господарство є серопозитивним за сальмонельозом, поширеність якого серед свинопоголів'я складає 85 %. Визначено, що пасивний імунітет у поросят до антигенів *Salmonella sp.* зберігається упродовж перших 39 діб життя, після чого з 53 по 67 добу утворюється "серологічне вікно", яке сприяє активації інфекції у тварин старших вікових груп. Встановлено, що проведення лікувально-профілактичних заходів за сальмонельозу, сформованих з урахуванням результатів серологічного моніторингу, сприяє зниженню розповсюдженості захворювання в стаді у 5,3 рази.

Ключові слова: сальмонела; свині; серопревалентність; антитіла; лікувально-профілактичні заходи; ELISA

Вступ

Сальмонельоз – інфекційне захворювання, що викликається грамнегативними бактеріями роду *Salmonella,* яких, залежно від антигенної структури, налічують декілька тисяч сероварів (Leyman, 2012). Найбільш розповсюдженими серед свиней є *S. choleraesuis, S. typhimurium, S. typhisuis, S. dublin* і *S. Enteritidis* (Ajshpur, 2014; Evangelopoulou et al., 2015). У інфікованих тварин ці мікроорганізми викликають респіраторну та кишкову патології, які, у більшості випадків, мають хронічний перебіг, що обумовлює тривалу екскрецію збудника в зовнішнє середовище і сприяє його подальшому розповсюдженню серед тварин (Ajshpur, 2014; Neverkovets et al., 2017). Все це сприяє формуванню значних економічних збитків від зниження продуктивності, загибелі свиней, тощо (Chmyr, 2016)

На теперішній час найбільш розповсюдженими методами контролю сальмонельозу свиней є специфічна імунопрофілактика та метафілактика. Суть першої полягає у формуванні групового імунітету до збуднику захворювання (Pimenov et al., 2016; Matiasovic et al., 2013), а іншої – у попередженні розвитку бактеріальних інфекцій шляхом профілактичного застосування антибактеріальних препаратів (Jurchenko, 2013; Verbrugghe et al.,

2011). Все це сприяє експансії захворювання з хронічним перебігом, утворенню атипових за морфологічними і культуральними властивостями форм збудника, що ускладнює діагностику, лікування і профілактику сальмонельозу у свиней (Evangelopoulou et al., 2015; Neverkovets et al., 2017).

На сьогодні, згідно ветеринарного законодавства, для діагностики сальмонельозу свиней в Україні використовують лише метод класичної бактеріології з типізацією у реакції аглютинації з О- та Н- аглютинуючими сироватками (ДСТУ 4769:2007). Згідно з сучасними рекомендаціями Міжнародного Епізоотичного Бюро (МЕБ) основними діагностичними інструментами сальмонельозу є імуномагнітна сепарація (IMS), полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) та імуноферментний аналіз (ELISA) (OIE, 2008).

ELISA тест є одним із найрозповсюдженіших методів лабораторної діагностики інфекційних хвороб тварин у всьому світі. Його використовують для індикації антигенів або специфічних до них імуноглобулінів. Цей метод базується на специфічній взаємодії комплексу антиген-антитіло та дозволяє виявити інфікованих тварин або реконвалесцентів, встановити серологічний профіль тварин, визначити рівень серопревалентності інфекції, тощо (Trangadia et al, 2009). Метод ELISA широко використовують у ветеринарній медицині з метою діагностики та контролю ефективності вакцинації інфекційних хвороб тварин (Feng et al., 2016), та майже не застосовують для контроля серопревалентності тварин у стаді за лікувально-профілактичних заходів без застосування специфічної імунопрофілактики.

Мета роботи – визначити серологічний профіль свиней на свинокомплексі за сальмонельозом та встановити серопревалентність інфекції до і після проведення лікувально-профілактичних заходів, за допомогою ELISA.

Матеріал і методи досліджень

Для проведення серологічних досліджень методом випадкової бесповторної вибірки отримали сироватку крові від свиней до та після проведення лікувально-профілактичних заходів на 25, 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151 та 165 добу життя. З кожної вікової групи кров відбирали від 5 тварин.

ELISA дослідження проводили в Науково-дослідному центрі біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету на аналізаторі–фотометрі BioTek EL×800 (США) із використанням тест-системи "Swine Salmonella" ("IDEXX" США). Специфічні антитіла до антигену LPS *Salmonella sp.* серогруп B, C1 та D виявляли у титрі 1:20. Згідно інструкції до набору, зразок вважали позитивним при значенні показнику S/P, який є більшим або дорівнює 10 %.

Схему лікувально-профілактичних заходів, яку використовували у господарстві розробляли з урахуванням отриманих результатів первинного серологічного дослідження.

Варіаційну статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою статистичного пакета (StatSoft Inc. USA). Для порівняння результатів використовували критерій Стьюдента. Вибіркові параметри, що вказані нижче по тексту, мають наступні позначення: M – середнє арифметичне показнику S/P, m – середнє квадратичне відхилення. Різницю вважають статистично достовірною при $p < 0,05$ та нижче.

Результати та їх обговорення

Отримані результати характеризують серологічний профіль свиней на свинокомплексі за сальмонельозом та відображають рівень серопревалентності інфекції до і після проведення лікувально профілактичних заходів.

Дослідження сироваток крові від свиней методом ELISA вказує на циркуляцію у стаді еукаріот роду *Salmonella* (рис. 1). Встановлено, що поросята всіх груп містять специфічні антитіла до антигенів збудника сальмонельозу свиней (*Salmonella sp.*). Це вказує на позитивний імунний статус стада за вище зазначеним захворюванням.

Аналізуючи результати ІФА досліджень встановлено, що всі зразки від поросят 25 денного віку та 80 % зразків від поросят 39 денного віку є серопозитивними, що, імовірно, обумовлено антитілами колострального походження (Proux et al., 2000). Відсутність вакцинації маточного поголів'я проти сальмонельозу, на тлі наявності специфічних молозивних антитіл у підсисних поросят, вказує на контакт свиноматок із антигенами *Salmonella sp* (Matiasovic et al., 2013).

Порівнюючи значення показнику S/P між групами поросят 25, 39 і 53 діб життя відзначається поступове зниження з віком рівня імунітету (таблиця), що ймовірно обумовлено природнім катаболізмом колостральних антитіл (Wittmann and Jakubik, 1979).

Досліджуючи зразки крові від поросят старших груп встановлено, що 80 % тварин 53 денного віку та 60 % – 67 денного віку не мають антитіл до збуднику сальмонельозу. Це вказує на формування "серологічного вікна" (window period), яке обумовлює виникнення ризику інфікування тварин еукаріотами роду *Salmonella* (Vitral et al, 2005).

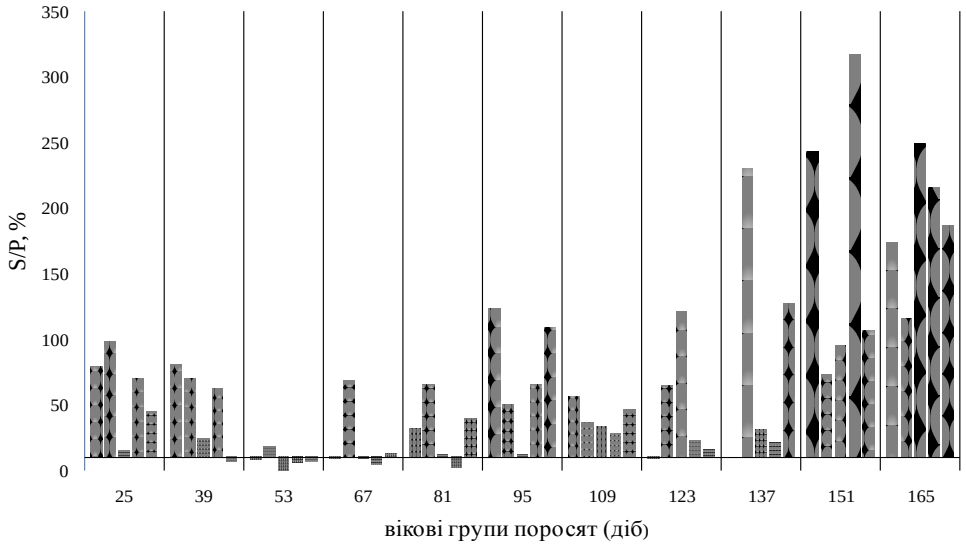


Рис. 1. Рівень специфічних антитіл до антигену LPS *Salmonella sp.* серогруп B, C1 та D у сироватці крові свиней різних вікових груп до проведення лікувально-профілактичних заходів

Таблиця

Динаміка рівня специфічних антитіл до збуднику сальмонельозу у крові свиней різних вікових груп, %, M±m, n=5

Вікова група (діб)	S/P до лікування	CV	S/P після лікування	CV
25	61,40 ± 14,40	52	3,06 ± 1,95**	131
39	48,73 ± 14,26	65	1,08 ± 0,08*	17
53	7,91 ± 2,98	84	4,59 ± 3,69	139
67	20,91 ± 12,00	128	0,40 ± 0,25	137
81	29,82 ± 11,14	84	7,27 ± 3,72	114
95	71,73 ± 20,22	63	1,50 ± 0,31**	47
109	40,36 ± 5,11	28	5,13 ± 3,26***	130
123	46,91 ± 21,10	101	4,14 ± 0,83	45
137	83,82 ± 42,22	113	7,88 ± 5,50	156
151	167,09 ± 48,06	64	25,46 ± 10,55*	93
165	188,45 ± 22,33	26	9,75 ± 5,41**	124

*Примітка: * – p≤ 0,05; ** – p ≤ 0,01 відносно тварин до лікування*

Починаючи з 67 доби життя відбувається збільшення ступеню розповсюдження сальмонельозу серед свиней. Серед поросят цієї групи виявлено 40 % імунних тварин, а у групі 81 денного віку – 80 %. Починаючи з 95 доби життя серопревалентність серед поголів'я складає 100 %, що вказує на активацію інфекції (Vitral et al, 2005), яка може відбуватись у наслідок розвитку імуносупресії на тлі технологічних та антропогенних стресів (Yefimov et al., 2016).

Ці зміни супроводжуються поступовим збільшенням імуноглобулінів, на що вказує зростання показнику S/P. Слід відзначити, що у тварин 165 денного віку, на тлі високого рівня специфічних антитіл реєструється низьке значення CV, що може вказувати на активацію у стаді епізоотичного штаму збудника (Leerdam and Kuhne (2009).

Таким чином, серопревалентність за сальмонельозом серед свиней становить більш ніж 85 %. Зниження колострального імунітету формує "серологічне вікно" у віці 53-67 діб, після чого реєструється сероконверсія специфічних антитіл, яка відбувається упродовж відгодівельного періоду.

За результатами серологічного моніторингу у господарстві розроблено та впроваджено комплекс лікувально-профілактичних заходів, що включав у себе тотальну дезінфекцію, дератизацію та дезінсекцію (Andres et al., 2015). Хворих свиноматок і поросят поміщали в карантин та лікували. З метою пригнічення бактеріальної інфекції застосовували метафілактичні заходи. До

основного раціону свиней всіх вікових груп додавали комплекс вітамінів та органічних кислот (Devi et al, 2016). Ретроспективні дослідження проводили через 3 місяці після лікувально-профілактичних заходів.

Отримані результати серологічного дослідження вказують на високу ефективність проведених заходів, але не забезпечують повної ерадикації збудника сальмонельозу зі стада. Встановлено, що майже 16 % тварин мають специфічні антитіла до антигенів роду *Salmonella* (рис. 2).

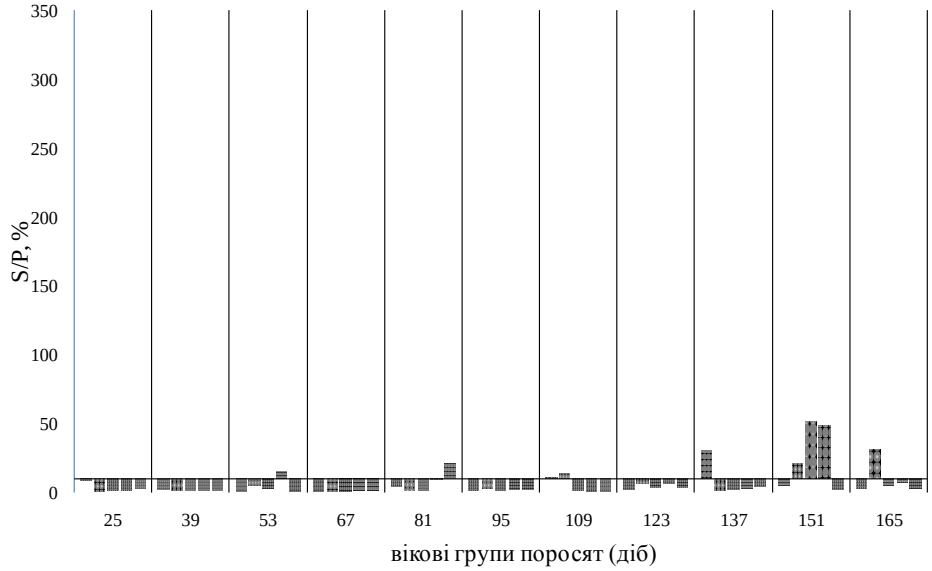


Рис. 2. Рівень специфічних антитіл до антигену LPS *Salmonella sp.* серогруп B, C1 та D у сироватці крові свиней різних вікових груп після проведення лікувально-профілактичних заходів

Слід відзначити, що майже всі тварини з 25 по 137, а також на 165 добу життя є серонегативними, про що свідчить рівень показнику S/P (меньше 10 %). У зразках крові від поросят на 151 добу життя серопревалентність складає 60 %. Виявлені позитивно реагуючі тварини мають низький рівень специфічних антитіл, відносно свиней до лікувально-профілактичних заходів, що може вказувати на спорадичні випадки сальмонельозу серед тварин цих вікових груп переважно латентного перебігу (Hansen et al., 2006). Такі поодинокі прояви захворювання можуть реєструватися протягом року у тварин в наслідок інфікування та/або бактеріоносійства збудником сальмонельозу (Ajshpur, 2014).

Таким чином, серопревалентність за сальмонельозом серед свиней після проведення лікувально-профілактичних заходів зменшилась майже на 70 % і становить 16 %, що вказує на високу ефективність застосованої лікувально-профілактичної схеми ерадикації сальмонельозу, сформованої з урахуванням результатів серологічного моніторингу.

Висновки

З'ясовано, що досліджуване господарство є серопозитивним за сальмонельозом, поширеність якого серед свинопоголів'я складає 85 %.

Пасивний імунітет у поросят до антигенів *Salmonella sp* зберігається упродовж перших 39 діб життя, після чого з 53 по 67 добу утворюється "серологічне вікно", яке сприяє активації інфекції у тварин старших вікових груп.

Встановлено, що проведення лікувально-профілактичних заходів за сальмонельозу, розроблених із урахуванням результатів серологічного моніторингу, сприяє зниженню розповсюдженості захворювання в стаді у 5,3 рази.

References

Ajshpur, O. (2014). Sal'monel'oz svynej. Legeneva forma sal'monel'ozu [Salmonella pigs. The pulmonary form of salmonellosis]. *Veterynarna biotehnologija*, 24, 3–10.

Andres, V. M., & Davies, R. H. (2015). Biosecurity Measures to Control Salmonella and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 317–335.

Chmyr S. (2016). Oblik vtrat vid padezhu svynej vnaslidok epizootii'. (Accounting for losses due to epizootics of pigs.) *Molodyj vchenyj*, 10(37), 424–429.

Devi, S. M., Lee, K. Y., & Kim, I. H. (2016). Analysis of the effect of dietary protected organic acid blend on lactating sows and their piglets. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 45(2), 39–47.

Evangelopoulou, G., Kritas, S., Christodoulopoulos, G., & Burriel, A. R. (2015). The commercial impact of pig Salmonella spp. infections in border-free markets during an economic recession. *Veterinary World*, 8(3), 257–272.

Feng, H., Segalés, J., Fraile, L., López-Soria, S., & Sibila, M. (2016). Effect of high and low levels of maternally derived antibodies on porcine circovirus type 2 (PCV2) infection dynamics and production parameters in PCV2 vaccinated pigs under field conditions. *Vaccine*, 34(27), 3044–3050.

Hansen, K. R., Nielsen, L. R., & Lind, P. (2006). Use of IgG avidity ELISA to differentiate acute from persistent infection with Salmonella Dublin in cattle. *Journal of Applied Microbiology*, 100(1), 144–152.

Jurchenko, O. (2013) Golovne pro antybiotyky. (The main thing about antibiotics.) *Prybutkove svynarstvo*, 3(15), 78–84 (in Ukrainian).

Leerdam, B. & Kuhne, P. (2009). Interpretacija rezul'tatov ELISA dlja virusa infekcionnogo bronhita (IBV) [Interpretation of ELISA Results for Infectious Bronchitis Virus (IBV)]. *Informacionnyj bjuleten' Poultry focus*, 5, 46–54.

Leyman, B. (2012) Optimizing vaccination of pigs against Salmonella Typhimurium. *Thesis of Doctor in Veterinary Sciences (PhD)*. Ghent University.

Matiasovic, J., Kudlackova, H., Babickova, K., Stepanova, H., Volf, J., Rychlik, I., … Faldyna, M. (2013). Impact of maternally-derived antibodies against Salmonella enterica serovar Typhimurium on the bacterial load in suckling piglets. *The Veterinary Journal*, 196(1), 114–115.

Neverkovec', N., Masjuk, D., Sosnyc'kyj, O., Kokarjev, A., & Koljada, S. (2017). Dosvid vykorystannja klasychnyh ta suchasnyh metodiv diagnostyky dlja ocinky statusu svynopogoliv`ja shhodo sal'monel'ozu. (Experience of the use of classical and modern diagnostic methods for assessing the status of pork colonies in relation to salmonella) *Korma i fakty*, 4(80), 28–30 (in Ukrainian).;

OIE. (2008). Terrestrial Manual. Salmonellosis, 2.9.9., 1267 – 1283

Pimenov, N. V., Laishevtcev, A. I., & Kolesnikova, Y. N. (2016). Prophylaxis of salmonellosis of farm animals and poultry: the main directions and means. *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 60(12), 247–254.

Proux, K., Houdayer, C., Humbert, F., Cariolet, R., Rose, V., Eveno, E., & Madec, F. (2000). Development of a complete ELISA using Salmonella lipopolysaccharides of various serogroups allowing to detect all infected pigs. *Veterinary Research*, 31(5), 481–490.

Trangadia, B., Rana, S. K., Mukherjee, F., & Srinivasan, V. A. (2009). Prevalence of brucellosis and infectious bovine rhinotracheitis in organized dairy farms in India. *Tropical Animal Health and Production*, 42(2), 203–207.

Verbrugghe, E., Boyen, F., Gaastra, W., Bekhuis, L., Leyman, B., Van Parys, A., … Pasmans, F. (2012). The complex interplay between stress and bacterial infections in animals. *Veterinary Microbiology*, 155(2-4), 115–127.

Vitral, C. L., Pinto, M. A., Lewis-Ximenez, L. L., Khudyakov, Y. E., Santos, D. R. dos, & Gaspar, A. M. C. (2005). Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(2), 117–122.

Wittmann, G., & Jakubik, J. (1979). Colostral immunity in piglets from sows vaccinated with inactivated Aujeszky disease virus vaccine. *Archives of Virology*, 60(1), 33–42.

Yefimov, V, Kostiushkevych, K, & Rakytianskyi, V. (2016). Effect of feeding treated peat asa supplement on the parameters of cellular immunity, antioxidant status and performance of piglets in early post-weaning period. *HVM Bioflux*, 8(3), 133-136.

Bakteriolohichne doslidzhennya patolohichnoho materialu vid tvaryn. Metody vyyavlennya sal'monel. (2009). *DSTU 4769:2007. Nationalnyi standart Ukrainy.* Kyiv Derzhspozhyvstandart Ukrainy