

УДК 619:616.98:579.843.98П:636.92  
© 2018

**О.І. СОСНИЦЬКИЙ,**  
доктор ветеринарних наук

**А.О. СОСНИЦЬКА,**  
студентка магістратури

Дніпровський державний  
аграрно-економічний університет,  
Україна  
E-mail: saidgaeu2@gmail.com  
вул. Сергія Єфремова, 25, м. Дніпро

ІЗОЛЯЦІЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ  
ЕПІЗООТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ  
*PASTEURELLA MULTOCIDA*  
SUBSPECIO *GALLICIDA*  
ШТАМ SA-18

*Встановлено, що етіофактором інфекційної патології у 3-місячних курчат віварію, яка перебігала за класичним типом епізоотичного процесу без естафетної передачі збудника, є P. multocida. Захворювання характеризувалося септичним патогенезом, гострим проявом з летальним наслідком, без патогномонічних постморбідних змін. Від одного зі захворілих курчат в агональному стані, з діагностичною метою, відібрано стандартний патологічний матеріал. Під час бактеріологічного дослідження ізольовано епізоотичний варіант пастерел, ідентифікований за комплексом ознак як P. multocida sb. gallicida штам SA-18, який індукував летальний пастерельоз у курчат. Культура збудника була патогенною й високовірулентною для лабораторних тварин, володіла характерними для виду і підвиду кардинальними біологічними властивостями і при цьому давала високий врожай прокаріот за стаціонарного культивування на загальноприйнятих поживних середовищах. Ізольована культура за сукупністю біологічних властивостей виявилася перспективною моделлю для створення інактивованого бактерину в складі полівалентної протипастерельозної вакцини, адаптованої для всього антигенного спектра польового збудника, циркулюючого в нативних умовах.*

**Ключові слова:** епізоотична культура, *P. multocida sb. gallicida*, ідентифікація, кардинальні характеристики, патогенність, вірулентність, сепсис.

**Постановка проблеми.** Пастерельоз (Pasteurellosis) – зоонозна контагіозна інфекційна патологія ссавців і птиці, що викликається прокаріотами виду *P. multocida*, які, з огляду на таксономічну характеристику збудника і тип інфекційного процесу (класичний або факторний), у сприятливому макроорганізмі індукують септичний або пульмональний патогенез захворювання. Крім септичного і респіраторного синдромів, реєструються: пневмоентерит, діарейний синдром, нервова форма, набряки, артрити, мастити, аборти,

раньові ускладнення, лімфангіти, лімфаденіти та ін. Хворіє на пастерельоз і людина. Зараження найчастіше відбувається трансмісивним шляхом, у період інтенсивного льоту кровосисних комах (гедзі, кровосисні мухи) [1, 3, 4, 10].

Розрізняють 5 серологічних варіантів *P. multocida* за капсульним антигеном (*A, B, D, E, F*) і 16 сероваріантів за О-антигеном (1–16). Культури *P. multocida* сероварів *A* і *D* виступають етіофактором інфекційної патології з респіраторним синдромом – домінант-

ними збудниками пульмональних ендогенних пастерельозів у молодняку сільськогосподарських тварин, виникаючих за факторним типом епізоотичного процесу. Культури *P. multocida* сероварів *B* і *E* є збудниками інфекції з облигатним септичним компонентом у патогенезі захворювання – геморагічної септицемії, перебігаючої за класичним типом епізоотичного процесу. *P. multocida* серовар *E* ізолюють тільки від буйволів в Африці. *P. multocida* серовар *F* індукує емерджентний пастерельоз у кролів у Західній Європі [3, 4, 7, 13].

Пастерельоз, як біологічний феномен, являє собою типовий інфекційний паразитоценоз класичного або факторного типу. У першому випадку макроорганізм еволюційно не адаптований до збудника, що призводить до гострого антагонізму з фатальними наслідками, у другому – інфекційна патологія розвивається в разі зниження імунобіологічної реактивності макроорганізму під дією зовнішніх або/і внутрішніх чинників, тобто несприятливих факторів технологічного та біологічного походження. При цьому пастерельоз виникає як мультифакторна патологія, викликана полівалентним в антигенному відношенні збудником у мікробіальній асоціації, з широким колом чутливих хазяїв. Залежно від об'єкта інфікування, заражаючої дози, вірулентності польового штаму та імунореактивності макроорганізму формується поліморбідний симптомокомплекс захворювання [1, 3–5, 9–11].

Для епізоотичного процесу пастерельозу характерний феномен біологічного поліпаразитизму в складі мікробіального паразитоценозу, що відбувається на популяційному рівні між генетично гетерогенними сукупностями збудника і сприятливих організмів. Патогенез пастерельозної інфекції детермінується біологічною сутністю інфекційного процесу, індукованого як природними, нативними факторами, так і соціально-економічними й технологічними антропогенними умовами функціонування біологічних систем в екологічній ніші існування. При цьому паразитологічне співвідношення між потенційно-патогенним збудником і популяцією чутливих тварин детерміно-

вані корелятивними зовнішніми і внутрішніми чинниками в об'єкті поліпаразитизму [1, 6, 10, 12–14].

Домінантним фактором інфекційного процесу виступає специфічний збудник. *P. multocida* є прискіпливим об'єктом інфектологів поширеним прокаріотом, спричиняє інфекційну патологію. Проте профілактичні біопрепарати потребують перманентного вдосконалення в плані валідації антигенної спорідненості польових ізолятів і виробничих штамів. Нагальною проблемою є недостатня імуногенність ретроспективних референтних культур, оскільки для пастерел характерна відсутність лінійної кореляції між вірулентністю і імуногенністю [10–14]. Епізоотичні культури пастерел, як гетерогенна генетична видова структура паразитарного прокаріоту, за розвитку інфекційного процесу в чутливому макроорганізмі піддається селективному впливу імунобіологічного пресингу лімфоїдної системи, антибіотикотерапії і резидентного інфекційного мікробіоценозу. Як наслідок, культуральну домінантність при ізоляції отримують сапрофітизовані клони з високими вегетативними потенціями і ферментативними здібностями [3–5, 7, 9, 10, 12–14]. Адаптація до умов існування у внутрішньому середовищі макроорганізму генетично гетерогенних варіантів польового збудника призводить до розщеплення фенотипових ознак, і за висівів у термінальний період патогенезу на штучних живильних середовищах найчастіше виділяються селективні варіанти з репресованою системою тканьового тропізму та інвазивності. Такі клони мають знижену біологічну цінність і меншу імуногенність [1, 3, 4, 6, 9–14].

Для отримання біологічно цінного, високоімуногенного штамного біоматеріалу необхідно ізолювати збудник у гострому періоді інфекційної патології за наявності патогномонічного симптомокомплексу захворювання.

**Мета роботи** – дослідити морфо-тинкторіальні, культуральні, біохімічні і біологічні властивості епізоотичної культури *P. multocida* sb. *gallicida* штам SA-18, ізолю-

ваної в період пастерельозного сепсису, від 3-місячного курчати.

**Матеріал та методи.** Ізоляцію і культивування пастерел проводили за загальноприйнятими методами на МПБ, МПА і кров'яному МПБ за 37–38 °С протягом 3–4 діб. Визначення морфо-тинкторіальних, культуральних і біохімічних властивостей проводили за методами лабораторних досліджень на пастерельоз [7, 8].

Накопичення збудника в живильних середовищах визначали культуральним методом на МПА і титруванням на МПБ [11].

За культуральним методом посіви десятикратних розведень суспензії пастерел проводили на МПА, а після інкубації підраховували ізольовані колонії, обчислювали концентрацію бактерій у вихідній зависі [7, 8].

Для квантально-альтернативного титрування висівали 0,1 см<sup>3</sup> десятикратно розведеної бульонної культури в 4 пробірки з 1,0 см<sup>3</sup> МПБ. Результат реєстрували в альтернативній формі – бульон каламутний або прозорий, виражали у вигляді десяткових логарифмів. Розрахунки проводили за формулою [2]

$$\lg P_t = \lg D + d \times (\sum L_i + 0,5).$$

Термін однієї генерації (g) пастерел визначали за методом Н.П Єлінова [5]

$$\sum g = (P_t - P_0).$$

Біологічне дослідження проводили на безпородних нелінійних рандомізованих лабораторних тваринах живою масою: білих мишах 18–20 г; мурчаках – 220–250 г; кроликах – 2,0–2,5 кг і 3-місячних курчатах. Білих мишей заражали підшкірно, кроликів і курчат – внутрішньом'язево. LD<sub>50</sub> розраховували за формулою І.П. Ашмаріна [2]

$$\lg LD_{50} = \lg D - d \times (\sum L_i - 0,5).$$

Отримані кількісні експериментальні показники обробляли на РС за допомогою пакета прикладних програм “Statistica” з рівнем значущості кінцевих результатів не нижче P≤0,05.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Ізоляцію специфічного бактеріального збудника від курчати 3-місячного віку здійснювали за загальними методами лабораторного дослідження. Курчат утримували в металевих клітках по 2 голови. Хвороба

виникла раптово, одне курча загинуло зі симптомами пневмоентериту. Інше, хворе, знаходилося в стані глибокої депресії. Його евтаназували, розтяли. З внутрішніх органів і крові серця зробили висіви на МПБ, МПА і кров'яний МПА та культивували за температури 37,5 °С у термостаті.

Одночасно з печинки та крові серця зробили мазки-відбитки, які зафіксували в спирті і пофарбували за Романовським-Гімза. У світлопольному мікроскопі під масляною імерсією в мазках спостерігали велику кількість біполярних паличок різної величини, що нагадували англійську булавку. Це дало підставу для попереднього діагнозу – септична форма пастерельозу.

Культуральні властивості збудника: прокаріоти були швидкорозростаючими факультативно-анаеробними мезофільними мікроорганізмами, в МПБ і на МПА зростали в S-формі, на кров'яному МПА – у M-формі.

У МПБ бактерії в першу добу культивування викликали незначне помутніння – “опалесценцію”, на другу–третю добу помутніння ставало більш помітним, у разі струшування спостерігався феномен “муарові хвилі”; на третю–четверту добу випадав слизуватий осад, за струшування якого підіймалася тонка “косичка”.

Накопичення бактеріальної маси сягало максимального значення в стаціонарних умовах культивування до 16–18 год. Фаза адаптації субкультур становила від 3 до 8 год і переходила в експоненціальний період росту, який тривав 7–9 год, і залежав від різних чинників, потім переходив у стаціонарну фазу і фазу відмирання культури. Після закінчення експоненціальної стадії росту максимальне накопичення культури досягало від 1,2 до 2,3–3,2×10<sup>9</sup> КУО/см<sup>3</sup>.

Для кількісної характеристики бульонної культури збудника, за стаціонарних умов культивування, через кожну годину в перші 36 год вирощування в термостаті і востаннє через 48 год відбирали зразки бульонної культури і титрували квантально-альтернативним методом. У результаті отримали послідовні дані накопичення бактеріальної культури в МПБ.

Для адаптованої субкультури *P. multocida* sb. *gallicida* штаму SA-18 експоненціальне розмноження продовжувалося до 8 год культивування, і накопичення досягло максимуму в  $9,5 \pm 0,1$  Іг/см<sup>3</sup>, або  $3,2 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup>. Із 8-ї по 21 год культивування пастерели знаходилися в стаціонарній фазі розвитку, далі прокаріоти переходили у фазу негативного логарифмічного розвитку і з 33-ї год наставала стабілізація концентрації пастерел на рівні  $3,8 \pm 0,25$  Іг/см<sup>3</sup>, або  $\sim 5,1 \times 10^3$  КУО/см<sup>3</sup>.

Термін життєвого циклу однієї генерації (g) *P. multocida* sb. *gallicida* штаму SA-18 відповідає такому розрахунку:

$$\Sigma g (P_{8\text{год}} - P_{3\text{год}}) = (9,5 \text{ Іг} - 6,5 \text{ Іг}) / 0,3 \text{ Іг} = 10 \text{ г} / 5 \text{ год} = 30 \text{ хв} / 1 \text{ г}.$$

На МПА мікроби в першу добу культивування формували дрібні прозорі “росинчасті” колонії, що флуоресціювали за косого освітлення, у подальшому колонії збільшувалися в розмірі і мутніли зі старінням.

На кров'яному МПА прокаріоти зростали у вигляді слизуватих непрозорих зеленувато-коричневих колоній без зони гемолізу.

Морфо-тинкторіальні властивості ізольованих бактерій: у препаратах-мазках з добових культур, пофарбованих за Грамом, прокаріоти мали вигляд дрібних коко-бактерій рожево-червоного кольору, розташованих поодинокі або парно, безсистемними скупченнями, інколи зустрічалися короткі ланцюжки. Під час фарбування за Бурі-Гінсом на фоні світло-червоного кольору скельця з'являлася доволі крупна капсула, що не фарбувалася, з розташованою всередині паличкоподібною клітиною мікроорганізму.

Біохімічні властивості віділених культур: прокаріоти ферментували глюкозу, сахарозу і маніт до утворення кислоти без газу; не ферментували ксилозу, декстрозу, трегалозу, сорбіт, дульцит, мальтозу; не згортали молоко, не розплавляли желатин; виділяли сірководень та індол, відновлювали нітрати до нітритів, реакції з метиловим червоним і Фогеса-Проскауера були негативні.

Патогенність вивчали на білих мишах за підшкірного зараження  $0,3$  см<sup>3</sup> добової бу-

льонної культури з накопиченням збудника  $9,1$  Іг НВЧ/см<sup>3</sup>, у суцільному виді і в розведеннях з кроком 10. Кожною заражаючою дозою інфікували 4-х білих мишей. До 6-го розведення усі миші загинули від сепсису через 8–12 год до 24–28 год, у розведенні  $10^{-8}$  миші загинули через 2 доби, у розведенні  $10^{-9}$  миші вижили.

Бактеріальний сепсис, індукований у білих мишей польовим ізолятом збудника, проявлявся важкою депресією, повною відмовою від корму, швидкоплинною загибеллю. Загинули всі інфіковані миші до зараження в розведенні  $10^{-9}$ . У препаратах-відбитках з крові серця, печінки і селезінки, пофарбованих за Романовським-Гімза, реєстрували велику кількість (сепсис) поліморфних біполярних паличок, які на вигляд нагадували англійську булавку.

За підшкірного зараження мурчаків, кроликів і внутрішньом'язового інфікування курчат по 2 біооб'єкти однодобовою культурою збудника в об'ємі  $0,5$  см<sup>3</sup> при накопиченні  $2,4 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> отримали летальний результат для всіх лабораторних тварин. Кролики і курчата загинули через 28–36 год після зараження з картиною гострого сепсису в стані важкої депресії. Мурчаки загинули через 3 доби зі симптомокомплексом пневмоентериту і сепсису.

Кількісні характеристики вірулентності польового збудника для лабораторних тварин встановили за методом Спірмена-Кербера-Ашмаріна. Розрахункові значення LD<sub>50</sub> з вірогідністю  $P \leq 0,05$  дорівнювали відповідно: для білих мишей –  $167 \pm 9$  КУО; для мурчаків –  $363 \pm 12$  КУО; для кролів –  $187 \pm 7$  КУО; для курчат –  $212 \pm 8$  КУО.

За сукупністю кардинальних біологічних ознак, відповідно до визначника бактерій Берджи, ізольована епізоотична культура бактеріального збудника летального септичного процесу в курчати 3-місячного віку ідентифікована як *P. multocida* sb. *gallicida* і депонована як штаму SA-18. Пастерели володіли патогенними властивостями, їх антигенний спектр валідован епізоотичним варіантам збудника, штаму перспективен для біотехнологічних розробок специфічних біопрепаратів.

## Висновки

1. Прокаріоти епізоотичної культури *P. multocida* sb. *gallicida* штаму SA-18 володіють типовими для виду морфо-тинкторіальними, культуральними, біохімічними характеристиками, патогенні і високовірулентні в біопробі для лабораторних тварин.

2. За кількісними показниками вірулентності *P. multocida* sb. *gallicida* штаму SA-18 відноситься до збудників, які викликають інфекційну патологію в білих мишей, мур-

чаків, кролів та курчат за класичним типом епізоотичного процесу без естафетної передачі прокаріот, у експериментального зараження.

3. Накопичення *P. multocida* sb. *gallicida* штаму SA-18 у стаціонарних умовах культивування в МПБ при 37–38 °C сягає до 9,5 lg НВЧ/см<sup>3</sup> в стаціонарний період, а термін однієї генерації прокаріот в експоненціальній фазі росту дорівнює 30 хв.

## Бібліографія

1. Апатенко В.М. Проблема мажорного патогена в екології паразитоценозов на прикладі *P. multocida* / В.М. Апатенко, А.И. Сосницький, В.П. Заболотная // *Болезни диких животных: тр. междунар. науч.-практ. конф. (Покров, 28–30 сент. 2004 г.)*. – Покров, 2004. – С. 215–222.

2. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Изд-во мед. лит-ры, 1962. – 182 с.

3. Джупина С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней сельскохозяйственных животных / С.И. Джупина // *Вестник РАСХН*. – 2001. – № 2. – С. 71–75.

4. Джупина С.И. Факторные инфекции – современная проблема в эпизоотологии / С.И. Джупина // *Аграрний вісник Причорномор'я*. – Одеса: АТЗТ ІРЕНТ, 2009. – Вип. 21 – С. 24–31.

5. Елинов Н.П. Общие закономерности строения и развития микробов-продуцентов биологически активных веществ / Н.П. Елинов. – Л.: Медицина, 1977. – 288 с.

6. Інфекційні та інвазійні хвороби кролів / [Л.Є Корнієнко, О.Б. Домбровський, С.І Пономар та ін.]. – Біла Церква, 2003. – 288 с.

7. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных / [А.А. Шевченко, Л.В. Шевченко, О.Ю. Черных и др.]. – Краснодар, 2009. – 575 с.

8. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / [В.В. Влізла, Р.С. Федорук, І.Б. Ратич

та ін.]; за ред. В.В. Влізла. – Львів: СПОЛОМ, 2012. – 764 с.

9. Патент на корисну модель № 7439 UA, МПК 7A61K 39/00. Епізоотичний штаму № 12 *Pasteurella multocida* серовар А для виготовлення вакцини проти факторного (ендогенного) пастерельозу телят і поросят, емульсійної інактивованої / Б.Т. Стегний, В.П. Заболотня, О.І. Сосницький; заявник та патентовласник Нац. наук. центр “Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини”. – № 2004120400; заявл. 17.02.04; опубл. 15.06.05, Бюл. № 6. – 4 с.

10. Паразитоценозы животных: учебное пособие / [А.Ф. Руденко, А.И. Сосницький, А.А. Руденко и др.]. – Луганск: Элтон-2, 2014. – 590 с.

11. Стегний Б.Т. Методологические аспекты количественного определения *Pasteurella multocida* в суспензии / Б.Т. Стегний, А.И. Сосницький // *Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб.* – Харків, 2008. – Вип. 91. – С. 454–457.

12. Brothers M.C. Membrane interaction of *Pasteurella multocida* toxin involves sphingomyelin / M.C. Brothers, M. Ho, R. Maharjan [et al.] // *FEBS J.* – 2011. – Vol. 278(23) – P. 4633–4648.

13. Haemorrhagic septicemia / OIE Manual of Diagnostic and Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Fifth Edition, 2004. – Vol. 1. – P. 537–548.

14. *Pasteurella multocida* pneumonia: zoonotic transmission confirmed by molecular epidemiological analysis / S. Miyoshi, H. Hamada, A. Miyoshi et al. // *Geriatr. Gerontol. Int.* – 2012. – № 12(1). – P. 159–163.