

УДК 619:616.9-085:616.98:579.843.98П:636.92

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭМЕРДЖЕНТНОГО ВОЗБУДИТЕЛЯ
P. MULTOCIDA SUBS. SEPTICA, ИЗОЛИРОВАННОГО ОТ КРОЛИКА****Назарец А.С., Сосницкий А.И.**Днепропетровский государственный агроэкономический университет,
г. Днепропетровск, Украина, e-mail: saidgaeu@mail.ru**Мандыгра Н.С.**

НААН Украины, г. Киев, Украина

Пастереллез кроликов актуальная и важная проблема для ветеринарной инфектологии, так как патология приводит к значительному отходу животных. Пастереллы являются мультипатогенными и поливалентными бактериями, с переменными биологическими свойствами, что необходимо учитывать при компоновке антигенного спектра вакцинного препарата. Поэтому целью исследования был поиск вирулентных и иммуногенных эпизоотических культур и изучение их биологических свойств. В работе использовали официальные методики бактериологического исследования на пастереллез, серотипизацию провели с референс-сыворотками в РНГА, показатели вирулентности рассчитывали по Керберу и выражали в ж.м.к. В результате бактериологического исследования патматериала от кроликов, павших с симптомокомплексом септицемии, изолировали *P. multocida subs. septica*. Инфекционная патология кроликов носила энзоотический характер, с симптомокомплексом септицемии и поголовной гибелью всех заболевших. Энзоотический процесс протекал по классическому типу, все инфекционные события были ярко выражены и имели максимальное качественное и количественное показатели, поэтому были использованы рутинные методы изоляции, направленные на выявление номинального возбудителя с каноническими свойствами, вирулентного и иммуногенного.

Пастереллы серовара В были высоковирулентны для белых мышей и кроликов, слабовирулентны для морских свинок и апатогенны для цыплят. Полевая культура будет использована для создания убитой вакцины.

Ключевые слова: *P. multocida subs. septica*, биологические свойства возбудителя, показатели вирулентности, лабораторные животные.

Pasteurella multocida – поливалентный возбудитель с мультипотентной патогенностью для млекопитающих животных и птиц, и в зависимости от подвиговой принадлежности, заражающей дозы и вирулентности штамма способен индуцировать эпизоотический процесс по классическому и факторному типу (с эстафетной и безэстафетной передачей возбудителя). Кролики высокочувствительны к пастереллам, среди них патология широко распространена и сопровождается значительным отходом заболевших животных [1, 5, 6].

Пастереллез для кроликов – чрезвычайно опасная и коварная контагиозная инфекционная патология, протекающая как по классическому, так и по факторному типу эпизоотического процесса, что в совокупности с различными биологическими свойствами подтипов пастерелл и антигенной поливалентностью полевых вариантов возбудителя приводит к лабильности симптомокомплекса заболевания и сложному патогенезу, что обуславливает методологические трудности лабораторной диагностики, санации и специфической профилактики инфекции [1, 2, 5].

Меры борьбы с пастереллезом кроликов основываются преимущественно на специфической профилактике заболевания, для чего необходимы эффективные вакцины. Биопрепараты изготовленные из референтных штаммов, изолированных в географически отдаленных регионах и многократно пассажированные при длительном хранении в депозитарии, нередко слабоиммуногенны и не обеспечивают надежный иммунитет. Поэтому поиск вирулентных и высокоиммуногенных эпизоотических изолятов возбудителя является актуальной научно-прикладной задачей [3, 4, 6].

Цель работы. Индикация и идентификация возбудителя, индуцировавшего эмерджентную инфекционную патологию у кроликов и изучение биологических свойств эпизоотической культуры.

Материалы и методы. Изоляцию возбудителя проводили традиционными бактериологическими методами: посевом патматериала на простые среды (МПБ и МПА), приготовленные на ОПХ (на основе перевара Хоттингера) и культивированием при 37–38 °С в течение 3–5 суток.

Мазки культур красили по Граму и Бурри-Гинсу; мазки-отпечатки из патматериала – по Михину и Романовскому-Гимза.

Биохимические свойства определяли по официальным методикам.

Патогенность и вирулентность изучали на лабораторных животных: белых мышках живой массой 16–18 г, кроликах – 1,5–2,0 кг, морских свинок – 250–280 г и 90–120-суточных цыплятах. Мышей заражали подкожно, остальных – внутримышечно. Количественные значения вирулентности рассчитывали по Спирмену-Керберу и выражали в ж.м.к.

Серовариантную принадлежность изолята устанавливали в РНГА по Картеру с референс-сыворотками.

Результаты исследований. Изоляцию возбудителя септической формы пастереллеза от кроликов провели стандартными бактериологическими методами. Инфекционная патология носила энзоотический характер, характеризовалась

сверхострым течением и высокой летальностью. Энзоотии кроликов предшествовал массовый падеж среди серых домовых мышей. От одного из заболевших кроликов в агональном состоянии удалось изолировать чистую культуру возбудителя.

Морфо-тинкториальные свойства. В препаратах-мазках из суточных культур при окраске по Граму пастереллы имели вид мелких Г-коккобактерий, расположенных одиночно, попарно или короткими цепочками, при окраске по Бури-Гинсу обнаруживалась крупная, не прокрасившаяся капсула.

В препаратах-отпечатках из внутренних органов животных, павших от пастереллезного сепсиса при окраске по Михину или Романовскому-Гимза выявлялись полиморфные крупные биполярные капсульные палочки в большом количестве (картина сепсиса).

Культуральные свойства. Изолированные пастереллы эпизоотического варианта были быстрорастущими факультативно-анаэробными мезофильными микроорганизмами. Элективной питательной средой являлись МПБ и МПА на ОПХ, на которых возбудитель давал рост в S-форме, или кровяные среды, где регистрировали рост в M-форме без зоны гемолиза.

На агаре Хоттингера в первые сутки изолированный штамм пастерелл формировал мелкие прозрачные «росинчатые» колонии, которые флуоресцировали при боковом освещении. При дальнейшем культивировании колонии увеличивались в размерах и мутнели при старении.

В бульоне Хоттингера эпизоотический штамм в первые сутки вызывал слабую опалесценцию, при встряхивании наблюдали «муаровые волны». Через 3–4 суток выпадал слизистый осадок, который при встряхивании поднимался в виде «косички».

На кровяном агаре культура формировала слизистые непрозрачные массивные колонии зеленовато-коричневого цвета, без зоны гемолиза.

На агаре Мак-Конки пастереллы не росли.

Биохимические свойства. Пастереллы эпизоотической культуры ферментировали глюкозу, сахарозу, декстрозу, фруктозу, галактозу и маннит с образованием К без Г; – не сбраживали ксилозу, трегалозу, сорбит, дульцит, лактозу, мальтозу, рамнозу, арабинозу и рафинозу; – не сворачивали молоко, не расплавляли желатин, выделяли сероводород и индол; восстанавливали нитраты до нитратов, давали негативную реакцию с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра.

Биологические свойства. Перед биопробой установили концентрацию пастерелл в питательном бульоне культуральным методом, $P = 1,74 \times 10^9$ ж.м.к./см³. На каждую заражающую дозу брали по 6 биообъектов. Получили следующие количественные значения доверительного интервала (I) показателей вирулентности с уровнем значимости оценок $\alpha \leq 0,05$ %.

Для белых мышей $LD_{50} = 1,4 < 6,6 < 22,4$ ж.м.к.; DLM = 10^{-8} ; DCL = 10^{-8}

Для кроликов $LD_{50} = 1,4 < 6,6 < 22,4$ ж.м.к.; DLM = 10^{-8} ; DCL = 10^{-8}

Для морских свинок $LD_{50} = 1,6 \times 10^5 < 6,3 \times 10^5 < 2,6 \times 10^6$ ж.м.к.; DLM = 10^{-4} ; DCL = 10^{-2}

Для цыплят культура была апатогенной в дозе 5,0 см³ при внутримышечном введении, что соответствовало $8,5 \times 10^9 \approx 9,0 \times 10^9$ ж.м.к.

При серотипизации с референс-сыворотками по капсульному антигену в РНГА по Картеру установили, что изолят принадлежит к серовару В.

Следовательно, выделенный в очаге инфекции изолят *P. multocida subs. septica* является дозозависимым и высоковирулентным возбудителем для белых мышей и кроликов, показатели DLM и DCL совпадают. Морские свинки оказались слабочувствительными к возбудителю, были значительно устойчивее к заражению и показали высокую резистентность к инфекции. В отношении их пастереллы были патогенными, но умеренно вирулентными, летальные дозы для морских свинок при сравнении с мышинными и кроличьими отличались на 4 порядка в сторону увеличения, при этом показатели DLM и DCL не совпадали между собой. Для морских свинок DLM превосходила на 4 lg, а DCL – на 6 lg, соответствующие показатели для белых мышей и кроликов.

Культура была депонирована в коллекции живых культур кафедры и проведена процедура патентования и оформления нормативно-технической документации. *P. multocida subs. septica* будет использована для создания инактивированной вакцины против пастереллеза, как один из сероваров поливалентного возбудителя. Необходимо изучить иммуногенные потенции эпизоотического изолята, разработать режимы инактивации и суспензионного культивирования и провести соответствующие испытания биопрепарата.

Выводы. 1. В агональном состоянии у половозрелого кролика из крови и внутренних органов был изолирован возбудитель септицемии, идентифицированный согласно определителю нетривиальных бактерий траста Берджи [2001] как *P. multocida subs. septica*, а в РНГА с референс-сывороткой пастереллы по К-антигену отнесли к серовару.

2. Эпизоотическая культура *P. multocida subs. septica* обладала типичными для вида морфо-тинкториальными, культуральными, биохимическими свойствами, была патогенной и высоко вирулентной для белых мышей и кроликов, умеренно патогенной и слабо вирулентной для морских свинок и апатогенной для цыплят.

Список литературы

1. Джупина, С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней сельскохозяйственных животных [Текст] / С.И. Джупина // Вестн. РАСХН. – 2001. – № 2. – С. 71-75.
2. Стегний, Б.Т. Методологические аспекты количественного определения *Pasteurella multocida* в суспензии [Текст] / Б.Т. Стегний, А.И. Сосницкий // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. - X., 2008. - Вип. 91. - С. 454–457.
3. Al-Hasani, K. Identification of novel immunogens in *P. multocida* [Text] / K. Al-Hasani // Microb. Cell. Fact. – 2007. – Vol. 18. – P. 3-6.
4. Brothers, M.C. Membrane interaction of *Pasteurella multocida* toxin involves sphingomyelin [Text] / MC Brothers, M. Ho, R. Maharjan [et al.] // FEBS J. – 2011. – Vol. 278 (23) – P. 4633-4648.

5. Haemorrhagic septicemia / OIE Manual of Diagnostic and Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Fifth Edition, 2004. – Vol. 1. – P. 537-548.
6. Miyoshi, S. Pasteurella multocida pneumonia: zoonotic transmission confirmed by molecular epidemiological analysis [Text] / S. Miyoshi, H. Hamada, A. Miyoshi e.a. // Geriatr Gerontol Int. – 2012. - № 12 (1). – P. 159-163.

**BIOLOGICAL PROPERTIES EMERGENT PATHOGEN
P. MULTOCIDA SUBS. SEPTICA, ISOLATED FROM RABBIT**

Nazaretz A.S., Sosnitsky A.I.

Dnepropetrovsk State University of Agro-Economic, Dnepropetrovsk, Ukraine

Mandyhra M.S.

NAAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

Pasteurellosis in rabbits urgent and important issue for veterinary since pathology leads to a significant animal waste. Pasteurella are multipathogenic and polyvalent bacteria with variable biological properties that need to be considered when building an antigenic spectrum vaccine preparation. Therefore, the aim of the study was to find virulence and immunogenicity of epizootic cultures and the study of their biological properties. We used official methods of bacteriological research on pasteurellosis, serotyping conducted with reference sera in RPGA, indicators of virulence was calculated by Kerber and expressed v.m.c. As a result of bacteriological research pathological material from rabbits died from septicemia symptom, isolated P. multocida subs. septica. Infectious pathology in rabbits wore enzootic, with symptom of septicemia and death of all-embracing patients. Epizootic process was the classical type, all infectious events were pronounced and had a maximum qualitative and quantitative indicators have been used so routine isolation techniques aimed at identifying the nominal exciter with canonical properties, virulence and immunogenicity.

Pasteurella serovar B were highly virulent for white mice and rabbits, guinea pigs virulence and apathogenic for chickens. Field crops will be used to create a killed vaccine.

Keywords: *P. multocida subs. septica*, biological properties of pathogen virulence indicators, laboratory animals.

УДК 636.09:616.233-002:578.834:636.5

**ПАТОГЕННІСТЬ ІЗОЛЯТУ Б-5 ВІРУСУ ІНФЕКЦІЙНОГО
БРОНХІТУ КУРЕЙ ДЛЯ КУРЧАТ РІЗНОГО ВІКУ**

Немашкало А.Ю., Попова Г.А., Постоєнко В.О.

Інститут ветеринарної медицини НААН, м. Київ, Україна, e-mail: nemashkalo_a@mail.ua

Досліджено патогенну дію польового ізоляту Б-5 вірусу інфекційного бронхіту курей на курчатах 1-тижневого та 1-місячного віку. Показано, що у заражених курчат відмічали клінічні зміни з боку органів дихання, такі як чхання, фиркання та диспное. Циліарна активність війчастого епітелію трахеї знижувалась, показник циліостазу був на рівні 27–40 балів. На підставі клінічних ознак і дослідження циліарної активності зроблено висновок, що виділений ізолят патогенний для курчат.

Ключові слова: інфекційний бронхіт курей, вірус інфекційного бронхіту, циліарна активність, циліостаз, патогенність.

Інфекційний бронхіт курей (ІБК) – гостре висококонтагіозне вірусне захворювання, яке проявляється у курчат респіраторним або уремичним синдромом, у курей – враженням гермінативних органів, що призводить до тривалого зниження несучості та суттєвого погіршення якості яєць. До вірусу ІБК сприйнятливі всі вікові групи курей, але найбільш чутливі курчата 7–45-добового віку та доросла птиця в репродуктивний період. Захворювання може спричинити загибель курчат до 30–60-добового віку та значні втрати у виробництві за рахунок зниження якості продукції в уражених стадах курей м'ясного і яєчного напрямів. Основним джерелом поширення інфекційного бронхіту є хворі та перехворілі курчата і кури, які виділяють вірус у зовнішнє середовище та є вірусноносіями до 105 діб після одужання [1, 2].

ІБК широко розповсюджений у світі та постійно персистує завдяки інтенсивному розвитку птахівничої галузі. Застосування живих вакцин може бути причиною появи і розповсюдження вірусу ІБК у промислових господарствах різних регіонів серед щепленого поголів'я. Його мінливість здійснюється за рахунок змін геному (результат накопичення поодиноких мутацій і рекомбінацій з появою та співіснуванням багатьох нових серотипів і варіантів. Відсутність або низький перехресний захист від щеплення існуючими вакцинами призводить до великих труднощів у профілактиці та контролі, тому це захворювання є однією з найсерйозніших проблем у промисловому птахівництві [3]. У зв'язку з цим, виникає необхідність: проведення постійного моніторингу циркулюючих серед щепленого поголів'я серотипів вірусу ІБК; виділення польових ізолятів; ідентифікація останніх; вивчення імунобіологічних і молекулярно-генетичних властивостей для підвищення ефективності профілактики та контролю цього вкрай розповсюдженого інфекційного захворювання. Вірус інфекційного бронхіту (ВІБ) був і залишається однією з основних причин величезних економічних збитків промислового птахівництва всього світу [4].