

ІЗОЛЯЦІЯ ЕПІЗООТИЧНИХ КУЛЬТУР *PASTEURELLA MULTOCIDA* ВІД КРОЛІВ ІЗ СИНДРОМОМ ПНЕВМОЕНТЕРИТУ ТА ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЗБУДНИКА

Сюсюк В. В., Бібен І. А.

Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
Дніпро, Україна, e-mail: bibenvet@ukr.net

Пастерельозні інфекції кролів представляють нагальну проблему забезпечення біобезпечності і інфекційного благополуччя кролепоголів'я. Бактеріологічний моніторинг біологічних властивостей та встановлення вірулентності епізоотичних культур пастерел, ізольованих від кролів з синдромом пневмоентериту пастерельозної етіології залишається важливою задачею в процесі розробки методології профілактики і боротьби з летальною інфектопатологією. У зв'язку з цим метою наших досліджень було провести бактеріологічний моніторинг інфектопатології з синдромом пневмоентериту серед кролів, які утримуються невеликими партіями в індивідуальних господарствах без офіційного ветеринарного супроводу. У результаті проведених досліджень за комплексом визначених бактеріологічних ознак, а саме — морфо-тинкторіальних, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей епізоотичні культури бактеріальних прокаріот, ізольованих від загинувших кролів з ознаками гострого пневмоентериту, були ідентифіковані як *P. multocida* ssp. *gallicida*. При цьому відмічено, що ензоотичні спалахи гострого пастерельозу з синдромом пневмоентериту серед кролів індивідуального сектору утримання виникали на тлі температурного стрес-фактору літньої спеки та були індуковані реактивацією латентного мікробіоносійства на нещепленому поголів'ї. Вивчення ізольованих культур дає можливість сканувати і проводити бактеріологічний моніторинг біологічних властивостей епізоотичних варіантів збудника і використовувати найбільш імуногенні штами для створення адекватних за антигенним складом профілактичних біопрепаратів

Ключові слова: *Pasteurella multocida* ssp. *gallicida*, персистенція, латентний мікробізм, вірулентність

Кролі як представники свійських хутрових тварин, досить економічно ефективні при розведенні невеликими партіями в індивідуальних або присадибних господарствах для внутрішнього споживання. Такий спосіб утримання тварин формує особливі умови епізоотичного процесу на невеличкому поголів'ї без регулярного офіційного ветеринарно-санітарного супроводу. Господарі відгодовують невеличкі групи тварин, які утримуються в неізольованих умовах, відкритих для циркуляції різноманітних мікробіонтів, в тому числі з патогенними потенціями вірус-бактеріальної природи. Епізоотичні події приймають неконтрольований характер, циркуляція мікроорганізмів серед чутливих тварин перебігає за нативними закономірностями і це досить часто може призводити до алярмістких результатів по відношенню до життя і здоров'я тварин та економічним збиткам в господарстві [2, 4–6].

Кролі, як багатоклітинний макроорганізм з еукаріотичною організацією генетичного біоматеріалу в штучних умовах існування при порушенні фундаментальних епізоотичних принципів недопущення і протидії проникненню та подальшій циркуляції інвазивних мікробіонтів з генетично обумовленими патогенними потенціями, стають вразливою мішенню для інфектопатогенів і розвитку локальних або ензоотичних вірус-бактеріальних зоонозів, одним з яких є пастерельозна інфекція, індукована активізацією латентного мікробіому несприятливими факторами зовнішнього середовища біогенного- і абіогенного походження [1, 5, 9].

P. multocida — це поліморбідний збудник з полівалентним антигенним складом капсульної субстанції і цитоплазматичних макромолекул, що формують різноманітні підвидові варіації з неоднорідним біологічним потенціалом в індукції інфектопатології на різних біомішенях з принципово різними стратегіями виживання прокаріотів в еукаріотичних макроорганізмах в залежності від підвидової приналежності, біоактивності пастерел і резистентності чутливих тварин на індивідуальному і колективному рівнях [1, 2, 5, 6, 8].

В організмі кролів пастерели знаходять сприятливі умови для свого існування, і в процесі довготривалого коєволюційного розвитку склалися умови для пастереленосінства на період тривалого терміну з періодичною реактивацією і стимуляцією інфекційного процесу під дією стрес-факторів зовнішнього або внутрішнього середовища макроорганізму. Довготривале збереження пастерел зі зниженою біоактивністю — це найбільш ефективна стратегія виживання збудника в чутливому організмі з можливістю диссимиляції в навколишньому середовищі і інфікуванням наступних учасників епізоотичного ланцюга. Таким адаптаційним біомеханізмом найбільшою мірою володіють пастерели з капсульним антигеном типу А, що відносяться до *P. multocida* ssp. *gallicida* [3, 7, 8, 10].

Прокаріотичні збудники, для яких одним з головних механізмів виживання при циркуляції в генетично різномірних екологічних нішах макроорганізмів чутливих тварин з імунним і неімунним фоном колективного імунного статусу дуже важливим є зменшення біоактивності і збереження тривалий термін у внутрішньому середовищі внутрішньоклітинно з подальшою реактивацією і активною репродукцією батьківського потомства, що на рівні макроорганізму проявляється як гострий спалах пастерельозного пневмоентериту ензоотичного характеру з високою летальністю [1, 2, 5, 6, 10].

Мета роботи: провести бактеріологічний моніторинг інфектопатології з синдромом пневмоентериту серед кролів, які утримуються невеликими партіями в індивідуальних господарствах без офіційного ветеринарного супроводу.

Матеріали та методи. Бактеріологічні дослідження патматеріалу від хворих тварин проводили в навчально-науковій лабораторії і віварії кафедри інфекційних хвороб тварин факультету ветеринарної медицини Дніпровського державного аграрно-економічного університету (ІХТ ФВМ ДДАЕУ).

Виділення пастерел з патматеріалу (селезінка, печінка, легені, лімфовузли брижі) здійснювали загальноприйнятими офіційними методами, робили висіви на прості середовища — МПБ і МПА та культивували в аеробних умовах за 37–38 °С 24–48 год.

Морфо-тинкторіальні властивості сканували в мазках, пофарбованих за Грамом і Романовським–Гимза. Ферментативну активність добових культур визначали на диференціально-діагностичних середовищах з індикаторами.

Для проведення біологічних досліджень на лабораторних тваринах накопичували бактеріальну масу прокаріот на кров'яному агарі, а для титрування бактеріальної суспензії на фізрозчині використовували метод квантально-альтернативного визначення кількості прокаріот за модифікованою формулою Кербера–Ашмаріна. Метод визначення концентрації пастерел в бактеріальній суспензії складається з культивування в 4 пробірках з наповненням по 1,0 см³ МПБ по 0,1 см³ послідовних десятикратних розведень добової бульйонної культури збудника. Культивування розтитрованих посівів проводили в стаціонарних умовах 24 год за 37–38 °С. Результат культивування враховували в альтернативній формі — бульйон каламутний або прозорий, і виражали у вигляді ж. м. к./см³ [9].

Біологічне дослідження патогенності і вірулентності виконували на безпородних нелінійних рандомізованих лабораторних тваринах, таких як: білі миші, живою масою 18–20 г; мурчаки — 240–260 г; кролики — 2,0–2,5 кг і 90–120-добових курчатах. Білих мишей інфікували підшкірно в ділянці спини, решту — внутрішньом'язево, кролів і мурчаків у стегно, курчат — у грудні м'язи. В якості показника вірулентності використовували LD₅₀, що розраховували за формулою Ашмаріна [8, 9]. Виражали кількісне значення LD₅₀ у ж. м. к. (живі мікробні клітини).

Статистичну обробку експериментальних кількісних даних проводили за допомогою програми Microsoft Excel з рівнем значущості кінцевих результатів не нижче $P \leq 0,05$.

Результати та обговорення. У ветеринарну клініку при факультеті ветеринарної медицини Дніпровського ДАЕУ звернулись двоє місцевих жителів Дніпровського району з проханням встановити причину загибелі кролів в їхніх індивідуальних присадибних господарствах. Домоволодіння знаходились на невеликій відстані одне від одного, однак прямих контактів не було. Кролів утримували у дерев'яних клітках на власному подвір'ї, годування відходами і зеленою масою з огорожу. Вирощували невелику кількість тварин для власних потреб, приблизно по три десятки кролів, різного віку, щеплення не робили. Захворювання виникло спонтанно, після дуже жаркого періоду літньої спеки. Спочатку пало по три статевозрілих тварини без превентивних ознак захворювання, потім з'явилися клінічні признаки, які можна

звести до синдрому пневмоентериту, загибель продовжувалась, симптоми наростали і це приймало вигляд ензоотії інфектопатології. Господарі прийняли рішення вимушено забити решту поголів'я, а для встановлення діагнозу звернулись до ветеринарних спеціалістів. В навчально-наукову лабораторію кафедри ІХТ ФВМ ДДАЕУ поступив патматеріал для бактеріологічного дослідження від загиблих тварин цих двох індивідуальних господарств.

На підставі повного комплексу бактеріологічного дослідження було ізольовано і ідентифіковано дві епізоотичні монокультури *P. multocida* ssp. *gallicida* в чистому виді, які зареєстрували за № 10 і № 17 та вивчили їх біологічні властивості.

Морфо-тинкторіальні, культуральні і біохімічні властивості у двох культур пастерел повністю збігались, тому їх описали в узагальненому вигляді, але кількісні показники вірулентності відрізнялись.

Ізольовані прокаріоти були представлені грам-негативними, нерухомими, безспоровими маленькими коко- або овоїдної форми бактеріями, завдовжки 1–2 мкм, діаметром 0,3–1,0 мкм. Розташовувались поодинокі, парами або короткими ланцюжками (рис. 1). В мазках-відбитках з патматеріалу пофарбованих за методом Романовського–Гимзе збудник фарбувався біполярно, пастерели нагадували англійську булавку і проявляли виражений поліморфізм, при цьому капсула фарбувалась метахроматично.

В МПБ ізольовані пастерели за першу добу (24 год) за 37–38 °С в аеробних умовах стаціонарного культивування визивали незначне, ледь помітне помутніння — «опалесценцію», через 2–3 доби (48–72 год) помутніння ставало більш помітним і при струшуванні реєстрували феномен «муарові хвилі»; далі на 4–5-ту добу (96–120 год) випадав слизуватий осад, при струшуванні якого піднімалася стійка тоненька скручена «коса» придонної бактеріальної маси бактерій, тобто це проявлялось явище культуральної дисоціації — перехід S-форми колоній в R-форму, що є характерним для швидкозростаючих збудників, індукторів гострих інфектопатологій.

На МПА пастерели в першу добу культивування формували дуже дрібні, «росинчасті», прозорі, гладенькі, злегка випуклі з рівними краями колонії в S-форми. При роздивлянні яких в світлі, що проходить при косо (під кутом 30°) виникає феномен флуоресценції, тобто слабкого світіння з блакитним відтінком. На 3–5-ту добу (72–120 год) культивування колонії значно збільшувались в розмірах до 1–3 мм, мутніли і ставали сірувато-білими. За рясного посіву бульйонної культури на МПА при подальших пересівах на поверхні агару утворювався суцільний бактеріальний газон мікроорганізмів, у вигляді ніжної тонкої світло-сірої бакмаси пастерел (рис. 2).

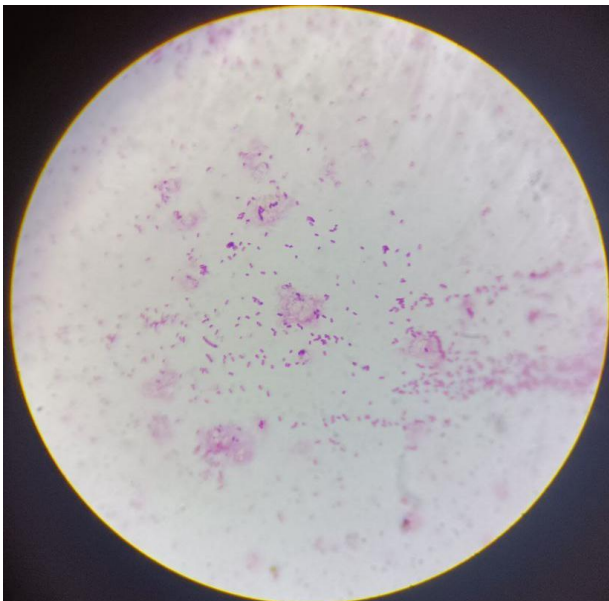


Рис. 1. Мікроскопія *P. multocida* ssp. *gallicida*, фарбування за Грамом.



Рис. 2. Ріст субкультури *P. multocida* ssp. *gallicida* у S-формі на 5-ту добу культивування (бактеріальний газон).

На кров'яному 5 % МПА пастерели формували колонії в М-формі у вигляді слизуватих непрозорих зеленувато-коричневих великих плям без зони гемолізу з дуже поліморфним збудником і вираженою капсулою.

Епізоотичні культури пастерел зброджували з утворенням кислоти без газу наступні цукри — глюкозу, сахарозу, декстрозу, фруктозу, галактозу, маніт, ксилозу, а також сорбіт і дульцит (що є характерною біохімічною ознакою саме для *P. multocida* ssp. *gallicida*); не ферментували мальтозу, трегалозу; проявляли каталазо- і оксидазопозитивність; молоко не згортали; желатин не розріджували; виділяли сірководень та індол; не володіли уреазною активністю; відновляли нітрати до нітритів; продукували орнітіндекарбоксилазу; реакції з метиловим червоним і Фогеса—Проскауера були негативні; не потребували NAD та X-факторів для бактеріального росту; на агарі Мак-Конкі не росли і не володіли гемолітичною активністю на кров'яних середовищах.

За біологічного дослідження на лабораторних тваринах ізольовані культури пастерел проявили виражену патогенність відносно всіх видів використаних тварин. При встановленні ступеня патогенності, тобто кількісних показників вірулентності, підшкірно заразили мурчаків та кроликів і внутрішньом'язево курчат добовою культурою збудника у дозі $0,5 \text{ см}^3$ за концентрацією $2,1\text{--}2,3 \times 10^9$ ж. м. к./ см^3 . Кролики та курчата загинули через 32–38 год після зараження з клінічною картиною гострого сепсису. Мурчаки загинули на 4-ту добу із синдромом пневмоентериту. Кількісні показники вірулентності епізоотичних культур пастерел розраховували за методом Кербера—Ашмаріна і після перерахунку виразили у вигляді ж. м. к.

Розрахункові показники вірулентності для епізоотичної культури пастерел № 10 становили:

LD₅₀ для білих мишей живою масою 18–20 г відповідала 158 ± 7 ж. м. к.;

LD₅₀ для мурчаків живою масою 220–250 г відповідала 382 ± 11 ж. м. к.;

LD₅₀ для кролів живою масою 2,0–2,5 кг відповідала 176 ± 8 ж. м. к.;

LD₅₀ для курчат 90–120-добового віку відповідала 201 ± 7 ж. м. к.

Розрахункові показники вірулентності для епізоотичної культури пастерел № 17 становили:

LD₅₀ для білих мишей живою масою 18–20 г відповідала 188 ± 11 ж. м. к.;

LD₅₀ для мурчаків живою масою 220–250 г відповідала 423 ± 13 ж. м. к.;

LD₅₀ для кролів живою масою 2,0–2,5 кг відповідала 204 ± 8 ж. м. к.;

LD₅₀ для курчат 90–120-добового віку відповідала 259 ± 9 ж. м. к.

Підвидову приналежність встановили за результатами біопроб на лабораторних тваринах згідно патенту України № 7439 UA, МПК 7A61K 39/00 за методикою кореляції *subspecio* з патогенністю культури пастерел. На підставі аналізу біологічних властивостей та комплексу кардинальних властивостей сканованих бактеріологічними методами епізоотичні культури віднесли до *P. multocida* ssp. *gallicida*.

Збудники гострого спалаху пастерельозу володіли типовими видовими властивостями і були виражено патогенними і досить високовірулентними по відношенню до класичних біомоделей за пастерельозу. Але бактерії були виділені від тварин в індивідуальних господарствах без заносу збудника ззовні, про що свідчить аналіз епізоотичної ситуації на місті. В такому випадку збудник персистував на неімунному поголів'ї кролів до моменту різкого зниження імунобіологічної резистентності тварин під дією екстремальних температурних факторів зовнішнього середовища. Для запобігання повторних спалахів ензоотій ендемічного пастерельозу рекомендується профілактичне щеплення тварин офіційними протипастерельозними біопрепаратами, а краще аутогенним бактерином на основі інактивованого високоімуногенного цільноклітинного антигенного комплексу з місцевих культур пастерел.

Висновки. 1. За комплексом сканованих бактеріологічних ознак, а саме морфотинкториальних, культуральних, біохімічних і біологічних властивостей, епізоотичні культури бактеріальних прокаріот, ізольованих від загинувших кролів з ознаками гострого пневмоентериту, були ідентифіковані як *P. multocida* ssp. *gallicida*.

2. Ензоотичні спалахи гострого пастерельозу з синдромом пневмоентериту серед кролів індивідуального сектору утримання виникали на тлі температурного стрес-фактору літньої спеки і були індуковані реактивацією латентного мікробоносіїства на нещепленому поголів'ї.

Перспективи подальших досліджень. Епізоотичні культури пастерел є носіями нативних біологічних властивостей збудника повністю аналогічних варіантам, які циркулюють в природі і

створюють епізоотичний ланцюг. Вивчення ізольованих культур дає можливість сканувати і проводити бактеріологічний моніторинг біологічних властивостей епізоотичних варіантів збудника і використовувати найбільш імуногенні штами для створення адекватних за антигенним складом профілактичних біопрепаратів.

Список літератури

1. D'Amico F., Messina D., Casalino G., Schiavitto M., Bove A., Romito D., D'Onghia F. P., Camarda A., Circella E. Characterisation of *Pasteurella multocida* strains from different lesions in rabbits. *Animals*. 2024. Vol. 14, No. 11. P. 1569. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani14111569>.
2. Casalino G., D'Amico F., Bozzo G., Dinardo F. R., Schiavitto M., Galantr D., Aceti A., Ceci E., Romito D., D'Onghia F. P., Dimuccio M. M., Camarda A., Circella E. In field evaluation of impact on clinical signs of an inactivated autogenous vaccine against *Pasteurella multocida* in rabbits. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*. 2024. Vol. 12, No. 1. P. 39–47. DOI: <https://doi.org/10.1080/23144599.2024.2348900>.
3. Circella E., Lucatello L., Montanucci L., Belloli C., Capolongo F. Simulation of a field condition to evaluate the risk of enrofloxacin-resistant *Pasteurella multocida* strain selection in food producing rabbits treated via drinking water. *Frontiers in Veterinary Science*. 2025. Vol. 12. P. 1474409. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1474409>.
4. Bogach M. V., Paliy A. P., Horobei O. O., Perotska L. V., Kushnir V. Y., Bohach D. M. Endoparasites of rabbits (*Oryctolagus cuniculus domesticus*) in Southern Ukraine. *Biosystems Diversity*. 2022. Vol. 30, No. 2. P. 173–178. DOI: <https://doi.org/10.15421/012218>.
5. Miyoshi S., Hamada H., Miyoshi A., Ito R., Hamaguchi N., Murakami S., Miyamoto H., Takeuchi T., Okura T., Higaki J. *Pasteurella multocida* pneumonia: Zoonotic transmission confirmed by molecular epidemiological analysis. *Geriatrics & Gerontology International*. 2011. Vol. 12, No. 1. P. 159–163. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2011.00721.x>.
6. Rudenko, A.F., Sosnitskiy, O.I., Rudenko, A.A. et al. Parasitocenoses of animals: a manual for agrarian establishments of 3-4 levels of accreditation in the specialty Veterinary medicine. Lugansk, Elton-2, 2014. 590 pp.
7. Стегній Б. Т., Заболотня В. П., Сосницький О. І. Епізоотичний штам № 12 *Pasteurella multocida* серовар А для виготовлення вакцини проти факторного (ендогенного) пастерельозу телят і поросят, емульсійної інактивованої: пат. на корисну модель № 7439 UA, МПК 7A61 К 39/00. № 20041210400; заявл. 17.12.04; опубл. 15.06.05, Бюл. № 6. 4 с.
8. Stegnyy, B. T., Sosnitskiy, O. I. (2008). Methodological aspects of quantitative determination of *Pasteurella multocida* in suspension. *Veterinary Medicine*. 2008. Iss. 91. P. 454-457.
9. Влізла В. В., Федорук Р. С., Ратич І. Б. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник / за ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом, 2012. 764 с.
10. Wei X.-Y., Zhang L., Zhang Y., Fu W.-Z., Zhong L.-G., Pan Y.-D., Sun J., Liao X.-P., Liu Y.-H., Zhou Y. Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of gamithromycin against rabbit pasteurellosis. *BMC Veterinary Research*. 2024. Vol. 20, No. 1. P. 147. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12917-024-03988-y>.

ISOLATION OF EPIZOOTIC CULTURES OF *PASTEURELLA MULTOCIDA* FROM RABBITS WITH PNEUMOENTERITIS SYNDROME AND STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE PATHOGEN

Syusyuk V. V., Biben I. A.

Dnipro State Agrarian and Economic University, Dnipro, Ukraine

Pasteurella infections pose an urgent biosafety and infectious health threat to rabbit populations. Bacteriological monitoring of biological properties and determination of the virulence of epizootic *Pasteurella* cultures isolated from rabbits with pneumoperitonitis syndrome of pasteurellosis etiology are important tasks in developing a methodology to prevent and control lethal infectopathology. Thus, our research aimed to conduct bacteriological monitoring of infectopathology with pneumoperitonitis syndrome among rabbits kept in small groups on unregulated farms. Studies on a complex of specific bacteriological characteristics — namely, morpho-tinctorial, cultural, biochemical, and biological properties — identified epizootic cultures of bacterial prokaryotes isolated from dead rabbits with signs of acute pneumoperitonitis as *Pasteurella multocida* ssp. *gallicida*. Enzoootic outbreaks of acute pasteurellosis with pneumoperitonitis syndrome were noted among rabbits in the individual sector against the background of summer heat, which induced the reactivation of latent microcarriers in the unvaccinated population. Studying isolated cultures allows for scanning and monitoring the biological properties of epizootic variants of the pathogen, as well as using the most immunogenic strains to create prophylactic biological products with an adequate antigenic composition

Keywords: *Pasteurella multocida* ssp. *gallicida*, persistence, latent microbism, virulence