

ЭПИЗООТИЧЕСКИЙ ШТАММ *PASTEURELLA MULTOCIDA SUBS. SEPTICA* № 15

Сосницкий А.И., д.вет.н., доцент

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск

Аннотация. При возникновении эмерджентной формы септического пастереллеза у кроликов удалось изолировать чистую культуру возбудителя, которую идентифицировали как *P. multocida subs. septica*, по капсульному антигену серовар В. Бактерии обладали типичными для подвида свойствами, были высоковирулентными и дозозависимыми для белых мышей и кроликов, умеренно вирулентными и дозозависимыми для морских свинок и непатогенными для 90-120 суточных цыплят, даже при заражении сверхбольшими дозами, содержащими 95 Ig НВЧ или $3,2 \times 10^{10}$ ж.м.к.

Ключевые слова: эпизоотическая культура, *P. multocida subs. septica*, скрининг характеристик, вирулентность, патогенность, дозозависимость.

Актуальность проблемы. Пастереллез (Pasteurellosis) – зоонозные контагиозные инфекционные заболевания млекопитающих животных и птиц, вызываемые бактериальными прокариотами вида *Pasteurella multocida*, которые в зависимости от подвидовой принадлежности и типа эпизоотического процесса индуцируют септический или пульмональный пастереллез. Возбудителем септицемии является *P. multocida* серовары В, Е, F, – пульмонального формы – *P. multocida* серовары А и D [1,2,5].

Инфекционная патология, обусловленная *P. multocida* характеризуется полиморбидным симптомокомплексом, высокой летальностью, тенденцией к стационарности и широкому носительству, регистрируется в большинстве стран мира, протекает в молниеносной, острой, подострой и хронической формах по классическому или факторному типу эпизоотического процесса [1,4,6].

Лабораторная диагностика пастереллезозов сложна и требует квалифицированной и осторожной интерпретации полученных результатов, так как возбудитель обладает антигенной неоднородностью, непостоянной ферментативной активностью и вызывает инфекционную патологию со сложными мультивариантным патогенезом. При лабораторной индикации и идентификации возбудителя, изучении биологических свойств полевого изолята на лабораторных животных, необходимо учитывать вариабельность антигенных и вирулентных свойств, а также подвиговую принадлежность, так как бактерии *P. multocida* гетерогенны и индуцируют различные исходы инфекционного процесса в биопробе на лабораторных животных при рутинных методах исследования [3,4,6,1,2].

Цель исследования. Изучить морфо-тинкториальные, культуральные, биохимические и биологические свойства по официальным методикам полевого изолята эмерджентного варианта возбудителя пастереллеза *P. multocida subs. septica* штамм № 15, изолированного от кролика при классическом течении эпизоотического процесса, согласно классификации Дж. Картера, соотнесенного по капсульному антигену (К-Аг) к серовару В.

Материал и методы исследования. Культивирование возбудителя проводили общепринятыми методами в МПБ или на МПА на ОПХ (основе перевара Хоттингера) при 37-38 °С в течение суток.

Титрование *P. multocida subs. septica* штамм № 15 осуществляли посевом последовательных десятикратных разведений бульонной культуры в объеме 0,1 см³ в 4 пенициллиновых флакончиках, содержащих по 1,0 см³ МПБ на ОПХ.

Результат учитывали в альтернативной форме – бульон мутный или прозрачный. Количество пенициллиновых флакончиков с положительными и отрицательными результатами роста бульонной культуры выражали в виде десятичных логарифмов.

Накопление возбудителя определяли по методу Спирмена-Кербера в изложении И.П. Ашмарина [1962] применительно к процедуре титрования бактерий и выражали количественно в НВЧ (наиболее вероятное число). Расчет производили по формуле: $\text{IgP}_i = \text{IgD} + d \times (\sum L_i + 0,5)$.

Вычисление доверительного интервала I_p средней арифметической производили с помощью формулы: $I_p = \pm t_p \cdot \delta / \sqrt{n} = \pm t_p \cdot m$, при этом t_p принимали равным 0,6 при уровне значимости $\alpha \leq 5\%$ ($P \leq 0,05$).

Оценку существенности различий единичных результатов x_1 и x_2 проводили при уровне значимости $\alpha \leq 5\%$ ($P \leq 0,05$) по формуле: $|x_1 - x_2| > 2\sqrt{\delta_1^2 + \delta_2^2}$.

Результаты исследования. Лабораторные исследования проводили в лаборатории бактериологии Днепропетровской ГЛВМ по стандартным методикам индикации и идентификации культур *P. multocida*. Изоляцию возбудителя септической формы пастереллеза от кроликов провели рутинными бактериологическими методами. Инфекционная патология носила энзоотический характер, характеризовалось 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, которую идентифицировали как *P. multocida subs. septica* и депонировали под № 15

Морфо-тинкториальные свойства P. multocida subs. septica штамм № 15

В препаратах-мазках из суточных культур с МПБ и МПА, при окраске по Граму, возбудитель был представлен мелкими коккобактериями розово-красного цвета, расположенными одиночно, попарно, короткими цепочками или беспорядочными скоплениями. При окраске по Бури-Гинсу выявлялась непрокрасившаяся капсула. В препарата-отпечатках из положительного пастереллезного материала при окраске по Романовскому-Гимза или Михину находили полиморфные, крупные, биполярно окрашенные пастереллы.

Культуральные свойства P. multocida subs. septica штамм № 15

Возбудитель относится к факультативно-анаэробным мезофильным быстрорастущим бактериальным прокариотам, в лабораторных субкультурах хорошо культивируется при 37-38 °С на МПБ и МПА в S-форме, на 5 % кровяном МПА – в M-форме. Элективными средами являются МПБ на ОПХ и 5 % кровяной МПА.

В МПБ к концу первых суток культивирования появляется слабое помутнение (опалесценция) с дальнейшим усилением мутности, при покачивании возникает феномен «муаровые волны». Через 3-5 суток роста выпадает слизистый осадок, который при встряхивании поднимается в виде «слизистой косички», бульон остается прозрачным.

Интенсивность роста и динамику накопления возбудителя во времени изучали при стационарном термостатировании при 37-38 °С посевного инокулюма (1,0 см³ 12-ти часовой бульонной культуры на 0,25 дм³ среды выращивания) в МПБ на ОПХ с содержанием 170-180 мг% аминного азота при pH=7,4.

Для *P. multocida subs. septica* штамм № 15 экспоненциальная фаза размножения началась через 3 ч адаптации при накоплении 6,8 lg НВЧ/см³ и продолжалась до 7 ч ($\Delta=4$ ч) с тах накоплением 9,75 lg НВЧ/см³. С 7 ч по 21 ч культивирования ($\Delta=14$ ч), пастереллы находились в стационарной фазе развития и сохраняли динамическое равновесие с концентрацией вегетоспособных клеток 9,75 lg НВЧ/см³. С 24 ч культура переходила в фазу отрицательного логарифмического роста, снижение концентрации жизнеспособных клеток продолжалось до 34 ч и стабилизировалось на уровне 4, 75 lg НВЧ/см³.

Время жизненного цикла одной генерации (g) *P. multocida subs. septica* штамм № 15 составляет $\Sigma g (P_{7ч} - P_{3ч}) = (9,75 \text{ lg} - 6,8 \text{ lg}) / 0,3 \text{ lg} = 9,55 \text{ g} / 4 \text{ ч} = 2,4 \text{ g} / 1 \text{ ч}$ или 60 мин / 2,4 g = 25мин / 1 g.

Биохимические свойства P. multocida subs. septica штамм № 15

Пастереллы эпизоотического штамма ферментировали глюкозу, сахарозу, декстрозу, фруктозу, галактозу и маннит с образованием К без Г; - не сбразивали ксилозу, трегалозу, сорбит, дульцит (что характерно для серовара В), а также 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. Не росли на агаре Мак-Конки и не вызывали гемолиз.

Биологические свойства P. multocida subs. septica штамм № 15

Патогенность изучали на нелинейных белых мышах, живой массой 18-20 г, при подкожном заражении 0,3 см³ суточной бульонной культурой с накоплением возбудителя 9,0 lg НВЧ/см³, по 6 мышей на одну заражающую дозу. При введении культуры в разведении 10⁻⁸ все мыши погибли через 8-12 ч; 10⁻⁷ – через 7-12 ч; 10⁻⁶ – через 6-9 ч. Заражение в разведении с 10⁻⁵ по 10⁰ привело к гибели всех мышей в узком временном промежутке 4-6 ч.

Секционная картина у павших мышей была однотипной и характеризовалась отсутствием патогномических пастереллезных изменений, кровоизлияний не было. У некоторых мышей были незначительные изменения в печени (желтое окрашивание, дряблая консистенция органа). Легкие светлые, воздушные. В грудной и брюшной полостях находилось небольшое количество трупосуда.

Пастереллезный сепсис, индуцированный у мышей полевым изолятом характеризовался сильнейшим угнетением, скоротечностью и поголовной летальностью (100 %). В препаратах-мазках из крови сердца, печени и селезенки при окраске по Романовскому-Гимза обнаружили огромное количество (сепсис) полиморфных, крупных, напоминающих английскую булавку, биполярно окрашенных пастерелл. Из биоматериала реизолировали исходную культуру возбудителя.

Патогенность изучали на 90-120-ти суточных цыплятах белой яйценоской породы при заражении в грудные мышцы суточной бульонной культурой с накоплением $9,5 \text{ lg HBЧ/см}^3$ или $3,2 \times 10^9$ ж.м.к./см³. Подобрали 3 группы цыплят по 6 голов в каждой. Цыплятам первой группы ввели по $1,0 \text{ см}^3$ бульонной культуры возбудителя, второй – по $5,0 \text{ см}^3$, третьей – по $10,0 \text{ см}^3$. За цыплятами наблюдали 21 сутки. В течение всего опыта цыплята оставались здоровы, принимали корм и воду, были активны и подвижны, отклонений в общем состоянии организма не было. Затем цыплят убили и сделали высевы из печени, селезенки, трубчатой кости и крови сердца на МПБ и МПА на ОПХ. Рост пастерелл отсутствовал.

Вирулентность определяли на белых мышах, кроликах и морских свинках. Величину LD_{50} рассчитывали по значениям L_i , устанавливали разведения соответствующие значениям DLM (doses letalys minima – минимальная летальная доза) и DCL (doses certa letalys – несомненная летальная доза). Перед заражением установили накопление возбудителя в МПБ на ОПХ культуральным методом, $P=1,3 \times 10^9$ ж.м.к./см³. На каждую заражающую дозу использовали по 6 биообъектов. Получили следующие расчетные значения доверительного интервала количественного значения LD_{50} с уровнем значимости оценок $\alpha \leq 0,05$ %.

Для белых мышей $LD_{50}=1,6 < 6,8 < 26,3$ ж.м.к.; $DLM=10^{-8}$; $DCL=10^{-8}$

Для кроликов $LD_{50}=1,6 < 6,8 < 26,3$ 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.;
 $DLM=10^{-4}$; $DCL=10^{-2}$

При серотипизации с референс-сыворотками по капсульному антигену в РНГА по Картеру и в биопробе, по нашей методике установили, что эпизоотический изолят *P. multocida* принадлежит к серовару В.

Резюме. Эпизоотический изолят *P. multocida subs. septica* штамм № 15 является дозозависимым и высоковирулентным возбудителем для белых мышей и кроликов, показатели DLM и DCL совпадают. Морские свинки значительно более устойчивы к заражению, возбудитель был умеренно вирулентным и дозозависимым, показатели DLM и DCL не совпадают. Цыплята проявили высокую конституциональную резистентность к заражению пастереллами серовара В.

Выводы

1. Культура *P. multocida subs. septica* штамм № 15 обладает типичными для подвида свойствами, является быстрорастущей ($g=25$ мин) и патогенной для белых мышей, кроликов, морских свинок и апатогенной для 90-120 суточных цыплят при внутримышечном заражении даже сверхбольшими дозами возбудителя, содержащими 95 lg HBЧ или $3,2 \times 10^{10}$ ж.м.к.

2. Для белых мышей и кроликов, культура *P. multocida subs. septica* штамм № 15 является высоковирулентной и дозозависимой, LD_{50} составляет 1,6 – 26 ж.м.к., а показатели DLM и DCL – совпадают между собой.

3. Морские свинки значительно более устойчивы к заражению культурой *P. multocida subs. septica* штамм № 15, возбудитель проявил умеренную вирулентность и оказался дозозависимым, LD_{50} составляет $1,6 \times 10^5$ – $2,6 \times 10^6$ ж.м.к., а показатели DLM и DCL – не совпадают между собой. Для морских свинок DLM превосходит на 4 lg, а DCL – на 6 lg соответствующие показатели для белых мышей и кроликов.

Литература

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

2. Джупина, С.И. Рациональная эпизоотологическая классификация инфекционных болезней сельскохозяйственных животных [Текст] / С.И. Джупина // Вестн. РАСХН. – 2001. – № 2. – С. 71–75.

3. Стегний, Б.Т. Методологические аспекты количественного определения *Pasteurella multocida* в суспензии [Текст] / Б.Т. Стегний, А.И. Сосницкий // Вет. медицина: міжвід. темат. наук. зб. - Х., 2008. - Вип. 91. - С. 454–457.

4. Brothers, M.C. Membrane interaction of *Pasteurella multocida* toxin involves sphingomyelin [Text] / M.C. 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. – V. 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.

ЕПІЗООТИЧНИЙ ШТАМ PASTEURELLA MULTOCIDA SUBS. SEPTICA № 15

Сосницький О.І., докт. вет. наук, доцент

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ

Анотація. При виникненні емерджентної форми септичного пастерельозу у кролів вдалося ізолювати чисту культуру збудника, яку ідентифікували як *P. multocida subs. septica*, за капсульним антигеном серовар В. Бактерії володіли типовими для підвиду властивостями, були високовірулентними і дозанезалежними для білих мишей і кролів, середньовірулентними і дозалежними для морських свинок, непатогенними для 90-120 добових курчат, навіть при зараженні занадто великими дозами, дорівнюючих 95 Іг НВЧ, що відповідає $3,2 \times 10^{10}$ ж.м.к.

Ключові слова: епізоотична культура, *P. multocida subs. septica*, скринінг властивостей, вірулентність, патогенність, дозанезалежність.

EPIZOOTIC STRAIN PASTEURELLA MULTOCIDA SUBS. SEPTICA №15

Sosnitskiy A.I., doctor. vet. sciences, ass. professor

Dnepropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnepropetrovsk

Summary. When an emergent form of septic pasteurellosis in rabbits failed to isolate a pure culture of the pathogen, which identified as *P. multocida subs. septica*, for capsular antigen serovar B. Bacteria possess typical subspecies properties of highly and were dose independent for white mice and rabbits, and middle virulent and dose dependent for guinea pigs, nonpathogenic for 90-120 day-old chicks, even when infected extra-large doses, amounting to 95 Іg microwave, corresponding to $3,2 \times 10^{10}$ I.m.c.

Key words: epizootic culture, *P. multocida subs. septica*, screening properties, virulence, pathogenicity, dose independent.