

УДК 619:576.851.45:636.21

ТРАНСФОРМАЦИЯ *P. MULTOCIDA* В НЕКУЛЬТИВИРУЕМОЕ СОСТОЯНИЕ**СОСНИЦКИЙ А. И., д. вет. н., доцент***Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет,
г. Днепропетровск
epizooddau@mail.ru*

Инфекционные патологии с респираторным синдромом у молодняка сельскохозяйственных животных в теоретическом и практическом аспекте представляют не решенную инфекционно-биологическую проблему ветеринарной медицины. Причинные факторы пульмонального поражения носят мультикомплексный характер, тесно переплетены и сложно взаимоскоррелированы. В основе возникновения и развития респираторной патологии лежат иммунобиологическая некомпетентность макроорганизма в элиминации перманентных и динамичных микробиоассоциаций, обуславливающих сверхсильный геннобиотический прессинг иммунной системы, и в целом развитие декомпенсированных иммунопатофизиологических изменений на уровне генетического гомеостаза внутренней среды организма. Немотивированные и нефизиологические ятрогенные точечные воздействия на подчиненные, вторичные эффекторы полиэтиологической структуры паразитоценологических ассоциаций микробных патогенов на поздних стадиях патогенеза респираторного синдрома, индуцирующих неспецифические, оппортунистические инфекции выхода преимущественно пиогенного характера в пульмональной ткани, являются некурабельными и неэффективными. Мажорные бактериальные патогены респираторного паразитоценоза на популяционном уровне при этом частично повреждаются и трансформируются в НКС и продолжают участвовать в процессинге респираторного инфекционогенеза и индуцируют дальнейшее развитие патогенеза бронхо-легочных заболеваний с диссиминацией последовательно сменяющихся сочленов ассоциации возбудителей разного таксономического подчинения

Телята, респираторный синдром, *P. multocida*, НКС, элективно-селективные методы, ложноотрицательный бакдиагноз

Постановка проблемы. Инфекционная патология с респираторным синдромом факторного типа у молодняка сельскохозяйственных животных распространена повсеместно и является доминирующей патологией в структуре канонических заболеваний, обусловленных иммунобиологической некомпетентностью макроорганизма и индуцированной биологической агрессивностью “микробов-выхода” [1, 2, 6].

В стационарных условиях содержания телят, одним из мажорных сочленов респираторного микробного паразитоценоза, по патогенности и глубине повреждающего воздействия, является *P. multocida*, индуцирующая эндогенный пульмональный пастереллез факторного типа без эстафетной передачи возбудителя. Симптомкомплекс респираторной инфек-

ции варьирует от легких форм, ринит-конъюнктивит до несовместимых с жизнью пневмоний, острых и хронических [1,2,3].

Инфекционные патологии дыхательной системы относятся к полиэтиологическим заболеванием и возникают под влиянием неблагоприятных факторов внешней среды на основе иммунной недостаточности лимфоидной системы и ступенчатой ротации сочленов микробиоценоза слизистых оболочек в процессе селекции и экспрессии вирулентных клонов в сообществе микробов-оппортунистов [1,4,5].

При колонизации внутренней среды макроорганизма, под воздействием иммунобиологического прессинга адаптивно-протективных механизмов воспалительно-некротических процессов в локусах пораженных тканей и воздействия экзогенных лекарственных антимик-

робных средств, особенно при нерегулярном и нефизиологическом их применении, бактериальный возбудитель претерпевает биохимические изменения, адекватные воздействию среды обитания и в результате адаптогенеза снижает биохимическую активность внутриклеточных ферментативных систем до апоптозного состояния, переходя в покоящуюся стадию жизненного цикла. Бактерии в стадии физиологического покоя находятся в некультивируемом состоянии (НКС), что имеет важное диагностическое значение, так как в НКС бактерии не изолируются рутинными способами и возникает ситуация ложноотрицательного бактериологического диагноза. Бактерии в НКС жизнеспособны, реверсильны и для их культуральной индикации необходимы неординарные селективно-селективные методы детекции [1, 3, 4, 6].

Целью работы было изучение этиопатогенеза респираторного синдрома факторного типа у телят и особенностей биологии мажорного патогена *P. multocida* в номинальном и трансформированном виде (НКС).

Материалы и методы. Морфотинкториальные свойства бактериальных возбудителей респираторного синдрома изучали при окраске мазков по Граму, Романовскому-Гимза и Бурри-Гинсу в светлопольном микроскопе в масляно-иммерсионной системе при рабочем увеличении 7×90 .

Культивирование пастерелл проводили общепринятыми методами в МПБ или на МПА на ОПХ (основе перевара Хоттингера) и кровяных средах, с добавлением 5% дефибрированной крови при $37-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течении 24-48 ч.

Биохимическую активность ферментативных систем изолированных микроорганизмов тестировали культуральным методом, посевом возбудителя в дифференциально-диагностические среды биофабричного производства с набором субстратных компонентов и индикаторов, согласно инструкции.

Серодиагностику респираторных вирусозов проводили с помощью индикации специфических постморбидных антител в серологических реакциях, которые ставили согласно официальных наставлений: парагрипп-3 диагностировали в РЗГА; инфекционный ринготрахе-

ит – в РА, хламидиоз – в РСК, серовариантность пастерелл определяли в РНГА по Картеру.

Полученные количественные показатели обработаны на РС с помощью пакета статистических программ “Statistica” и программы Excel 2000, для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Стьюдента и Фишера.

Результаты исследований. Была сформирована рандомизированная группа телят-аналогов в двух недельном возрасте из 30 голов. За телятами установили клинико-эпизоотологическое наблюдение до 4-х месячного возраста. Провели перманентный серологический мониторинг динамики антителогенеза к антигенам вируса ПГ-3 (ВПГ-3) в РЗГА, ИРТ в РА, хламидий в РСК и К-АГ *P. multocida* в РНГА. Сыворотку крови отбирали у всех наблюдаемых телят в двух недельном возрасте, затем в одно-, двух-, трех- и четырехмесячном возрасте и исследовали в соответствующих серореакциях. Телят, павших или вынужденно убитых по причине некурабельных бронхопневмоний, исследовали патологоанатомически и бактериологически.

Телята рождались в коровнике, в отдельно отведенном для растела станке и поступали в профилакторий, где содержались первые 10-12 дней в индивидуальных клетках. Затем до месячного возраста, небольшими группами по 8-16 голов, – в небольших станках. В месячном возрасте телят переводили в общий телятник, секцию молочного выкармливания.

Через 3-5 дней, после поступления в новое помещение, развилась энзоотия ПГ-3, которая продолжалась первые две недели пребывания телят в новом микробном окружении телятника. Затем наступила ремиссия по ПГ-3, но у части телят (№№ 8050, 8072, 9878) парагриппозная инфекция без стадии выздоровления осложнилась тяжелой пневмонией.

Животные пали в течение неполных 2-х недель после начала пульмональной патологии. На вскрытии у теленка № 8050 была диагностирована лобарная катарально-геморрагическая пневмония, а у телят № 8072 и 9078 – катарально-фибринозная некротизирующая бронхопневмония. Обширных отеков подкожной клетчатки и множественных точеч-

ных кровоизлияний в ней не было, кровь не свернулась.

Теленок № 8050 пал на 5 день болезни, в следствие очень тяжелого течения катарально-геморрагической пневмонии. Клинически пневмония протекала остро, с выраженными септическими явлениями в патогенезе заболевания, с высокой температурой тела, полным отказом от корма, глубокой депрессией, адинамией, временами наблюдался «потрясающий озноб», животное слабо реагировало на окружающую обстановку. Антибиотикотерапия не проводилась. Из легких, регионарных лимфоузлов, печени, селезенки, крови сердца и трубчатой кости была изолирована чистая культура *P. multocida* серовар *B*, которая была депонирована в лаборатории болезни молодняка ИЭКВМ и запатентована как эпизоотический штамм №31 *P. multocida* серовар *B*.

Телята № 8072, 9878 пали на 11 и 12 день с начала заболевания от крупозной пневмонии в 2-х месячном возрасте. Симптомокомплекс пульмональной патологии развивался у них одинаково, но теленок № 8072 подвергался бессистемному лечению пенициллином, иногда в смеси со стрептомицином, также применили аутогемотерапию внутримышечно, инъекции кофеина и глюкозы подкожно. Теленок № 9878 не получал никакого лечения. Терапевтическое вмешательство не оказало положительного воздействия на больного и бронхопневмония у телят прогрессировала примерно с одинаковой интенсивностью, что привело животных к гибели.

На вскрытии была установлена катарально-фибринозная бронхопневмония обширных участков легких в очень тяжелой форме в стадии красной гепатизации. Подобный патпроцесс был однозначно несовместим с жизнью и нефизиологическая, несвоевременная, односторонняя этиотропная нерегулярная антибиотикотерапия не могла дать положительного результата. Более того, инъекции антибиотиков имели негативные последствия для результатов бактериологической диагностики. У теленка №8072 из патматериала рутинными методами выделили ассоциацию непатогенной банальной микрофлоры из кишечной палочки, мышшиной клебсиеллы пневмонии, сапрофит-

ного стафилококка, а так же микро- и диплококков и недифференцированных коккобактерий. Судя по результатам серомониторинга у теленка № 8072 этиологическим фактором бронхопневмонии могла быть только *P. multocida* серовара *A*, так в 2-х недельном и месячном возрасте преобладали инфекционные титры к серовару *A*, а именно: к К-АГ серовара *A* титр АТ 1:16; – к серовару *D* титр АТ 1:4; – к серовару *B* титр АТ 1:8. Этиофактором ОРВИ был ВПГ-3, о чем свидетельствует резкое снижение колостральных титров в месячном возрасте, с 1:128 в 2-х недельном возрасте до 1:16 в месячном, АТ к АГ вируса ИРТ нет, титры АТ к АГ хламидий сомнительные. Следовательно, мы получили классический вариант ложноотрицательного бактериологического диагноза на пульмональный пастереллез при типичном этиопатогенезе заболевания вирус-бактериальной ассоциированной этиологии, по причине некультивируемого состояния (НКС) бактериального возбудителя, обусловленного применением антибиотиков.

Для выделения из патматериала пастерелл в НКС применили элективные методы изоляции, направленные на репарацию номинального физиологического состояния бактериальных клеток. Биологические ткани, содержащие наибольшее количество возбудителя, такие как регионарные патпроцессу лимфоузлы и воспаленные пульмональные ткани (на границе здоровой и пораженной областей), растирали в ступке с истолченным стеклом и физраствором, фильтровали через ватно-марлевый фильтр, концентрировали баксуспензию центрифугированием при 5000 об/мин в течение 20 мин и внутрибрюшинно заражали осадком белых мышей, живой массой 18-20 г. Павших в течении недели мышей вскрывали и из крови сердца делали высевы на кровяные среды. Таким способом удалось реабилитировать физиологические потенции вегетативной способности возбудителя к колониальному росту, сначала на обогащенных кровью, а затем в субкультуре – и на простых средах. Изолированная культура была патогенна для белых мышей и при идентификации отнесена к *P. multocida* серовар *A*.

Теленок № 9878 не подвергался лечению и пал на 12 день заболевания крупозной пневмо-

нией, т.е. болел на один день дольше, чем телянок № 8078. На вскрытии так же была диагностирована крупозная пневмония в очень тяжелой форме, в виде обширных участков легких в стадии красной гепатизации. Из пораженных тканей легкого и регионарных лимфоузлов была изолирована чистая культура *P. multocida* серовар *A*. Пульмональный пастереллез возник в результате переболевания ОРВИ парагриппозной этиологии, так как в месячном возрасте зарегистрировали резкое падение колостральных титров к АГ ВПГ-3, с 1:128 в 2-х недельном возрасте до 1:16 в месячном. Титров к АГ вируса ИРТ не было, а титры к АГ хламидий были сомнительными.

Изолированная культура *P. multocida* серовара *A* была депонирована в лаборатории болезни молодняка ИЭКВМ и запатентована как эпизоотический штамм №12 *P. multocida* серовара *A*.

Остальные четверо телят № 9120, 9870, 9185, 8990 из заболевших в месячном возрасте бронхопневмонией, индуцированной ОРВИ, были вынужденно убиты после 2-3 недель подострого течения пульмонального процесса и безуспешного лечения, в связи неудовлетворительным общим состоянием и неблагоприятным прогнозом в отношении их жизни и дальнейшего хозяйственного использования. На секции у всех убитых телят была установлена фибринозно-некротизирующая лобарная бронхопневмония, истощение и токсико-дегенеративные процессы перерождения в паренхиматозных органах. Пульмональный патологический процесс имел тенденцию к генерализации, носил общеорганизменный дистрофический характер и выраженную склонность к злокачественному течению патогенеза пневмонии. Прогностически чрезвычайно неблагоприятная биологическая ситуация для макроорганизма, несовместимая с дальнейшей жизнью, и имеющая неоспоримое и однозначное направление инфекционных событий к фатальному исходу в смерть. Ввиду сложившихся неудовлетворительных обстоятельств течения болезни и безнадежности терапевтических вмешательств, было принято решение убить телят с диагностической целью, и для предотвращения неоправданного падежа. За 5 дней до забоя были прекращены инъекции антибио-

тиков, что практически не повлияло на ход болезненных процессов. Телята были убиты в агональном состоянии, когда полностью был исчерпан лимит надежды на улучшение их состояния. Был отобран стандартный патматериал и рутинными методами провели бактериологический анализ.

У телят № 9120 и 9870 удалось изолировать патогенные культуры *P. multocida* серовара *A* с вирулентностью для белых мышей в 10^{-6} . У телят № 9185 и 8990 из пораженных тканей легких выделили Г- и Г+ неспецифический непатогенные микроорганизмы, из регионарных узлов посева были безрезультатными. Поэтому патматериал от этих телят был исследован повторно по шадящей технологии с использованием элективных способов концентрации и посева бактериальной суспензии из патматериала. Повторили все манипуляции предпосевной подготовки и посева, как с патматериалом от теленка № 8072. В результате из патматериала теленка № 9185 удалось изолировать еще одну культуру *P. multocida*, которая была идентифицирована как серовар *D*.

Из стандартного патматериала от теленка № 8990 при повторном бакисследовании элективным способом, как и рутинными методами, не удалось выделить возбудитель пульмональной патологии. При анализе ретроспективных данных серомониторинга динамики антителогенеза против АГ основных сочленов респираторного микробиопаразитоценоза логично вытекает вывод о пастереллезном возбудителе пневмонии серовара *A*, индуцировавшего воспаление легких непосредственно после переболевания ОРВИ симультанной этиологии, опосредованной ВПГ-3 и хламидиями. Так, в месячном возрасте титры АТ к К-АГ пастерелл сероваров *A*, *D* и *B* были 1:8, 1:4 и 1:8; к АГ ВПГ-3 1:64; к вирусу ИРТ антител не было а к АГ хламидий титры АТ были сомнительными. Через месяц титры АТ к К-АГ серовара *A* выросли до 1:16, а К-АГ сероваров *B* и *D* не изменились.

Исходя из предположения о пастереллезной этиологии возбудителя пульмональной патологии попытались изолировать этиологический агент из носовой слизи теленка № 8990, так как в этом биосубстрате пастереллы не подвергались ингибирующему воздейст-

вию антибактериальної терапії. Носове відділяємо збирали стерильними тампонами в пробирки з МПБ, куди для подавлення супутньої сапрофітної мікрофлори додали кристалл-фіолет в концентрації, індиферентної для пастерелл. Сутки інкубували посіви при 37-38° С і зате́м в об'ємі 1,0 см³ МПБ внутрібрюшинно заразили білих мишей, живо́ю масою 18-20 г. Павших мишей вскривали і з крові серця делали висіви на прості сре́ди з кров'ю. Таки́м спосо́бом уда́лось ізолювати патогенну культуру, ідентифіковану як *P. multocida* серова́р А.

Висно́ви. 1. У теля́т епізоотиче́ский проце́с пу́льмона́льного пастерелле́за факторного

типа без естафетної передачі возбудителя здійснюється не то́лько но́мінальної фо́рмою *P. multocida*, но і трансформованими бактеріями в некультивованому стана́нні (НКС), не виявляе́мими о́бщеприйня́тими ме́тодами лабо́раторної діагностики.

2. Для індикації бактеріального возбудителя в трансформованому стана́нні (НКС), з пони́женими фізіологіческими потенціями, необхідно застосовувати целе́направле́ний бактеріологіче́ский по́иск пастерелл і совме́стно з ру́тинними, офіціна́льними ме́тодами діагностики іспо́льзовати електи́вні спосо́би ізоляції *P. multocida*.

ЛІТЕРАТУРА

1. Апатенко В. М. Проблема мажорного патогена в екології паразитоценозів на при́ме́ре *P. multocida* [Текст] / В. М. Апатенко, А.І. Сосницький, В. П. Заболотная // *Болезни диких животных: тр. междунар. науч.-практ. конф.* (Покров, 28–30 сент. 2004 г.). – Покров, 2004. – С. 215–222.
2. Джу́пина С. І. Раціона́льна епізоотологі́ческа́я класифіка́ція інфекціо́нних бо́лезней се́льськогосподарських живо́тних [Текст] / С. І. Джу́пина // *Вестн. РАСХН.* – 2001. – № 2. – С. 71–75.
3. Сте́гний Б. Т. Ме́тодологі́ческие а́спекты ко́личественно́го о́преде́лення *Pasteurella multocida* в суспензии [Текст] / Б. Т. Сте́гний, А. І. Сосницький // *Вет. медицина: між-*
4. Brothers M. C. Membrane interaction of *Pasteurella multocida* toxin involves sphingomyelin [Text] / M. C. Brothers, M. Ho, R. Mahajan [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 [et. al.] // *Geriatr Gerontol Int.* – 2012. – № 12(1). – P. 159–163.

ТРАНСФОРМАЦІЯ *P. MULTOCIDA* В НЕКУЛЬТИВУЮЧІЙ СТАН

Сосницький О. І.

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ

Інфекційні патології з респіраторним синдромом у молодняка сільськогосподарських тварин в теоретичному і практичному аспекті являють невирішену інфекційно-біологічну проблему ветеринарної медицини. Причинні фактори пу́льмона́льного ураження носять му́льтикомплесний характер, тісно переплетені та сло́жнокореговані. В осно́ві виникнення і розвитку респіраторної патології ле́жить імунобіологі́чна некомпетентність макроорганізму в елімінації перманентних і динамічних мікробіоасоціацій, опосередкуючих свeрхсильний генобіотичний пресинг імуноної системи, і в цілому розвиток декомпенсованих імунопатофізіологічних змін на рівні генетичного гомеостазу внутрішньої середовища організму. Немотивовані і нефізіологічні ятрогенні точкові втручання на підлеглих, вторинні ефектори поліетіологічної структури паразитоценотичних

асоціації мікробіальних патогенів на пізніх стадіях патогенезу респіраторного синдрому, індукуючих неспецифічні, опортуністичні інфекції виходу переважно піогенного характеру в пульмональній тканині є некурабельними і неефективними. Мажорні бактеріальні патогени респіраторного паразитоценозу на популяційному рівні при цьому частково пошкоджуються і трансформуються в НКС та продовжують діяти на початкових етапах респіраторного інфекціогенезу і індукувати подальший розвиток патогенезу бронхо-легеневих захворювань з дисимінацією послідовно змінюючих сочленів асоціації збудників різного таксономічного підпорядкування

Телята, респіраторний синдром, *P. multocida*, НКС, елективно-селективні методи, хибно-негативний бакдіагноз

TRANSFORMATION OF *P. MULTOCIDA* IN UNCULTIVATED STATE

A. Sosnitskiy

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipropetrovsk, Ukraine

Infectious diseases with respiratory syndrome in young farm animals in the theoretical and practical aspects are the unsolved infectious and biological problem of veterinary medicine. Causal factors of pulmonary lesions have multicomplex nature, they are intertwined and difficult corrected. At the heart of the emergence and development of respiratory disease are immune biological incompetence of the macroorganism in the elimination of permanent and dynamic microbial associations causing super strong genebiotic pressure of immune system and the overall development of decompensated immunopathological and physiological changes at the level of genetic homeostasis of the internal environment. Unmotivated and non-physiological iatrogenic pointlike influence on subordinates, secondary effectors of polyetiological structure parasitecenosis associations microbial pathogens at the late stages of the pathogenesis of respiratory syndrome inducing nonspecific opportunist mostly pyogenic infections of exit character in pulmonary tissue are incurable and ineffective. Major bacterial pathogens of respiratory parasitocenoses at the population level at the same time partially damaged and transformed into NCC and continue to participate in the early stages of respiratory infection genesis and induce further development of the pathogenesis of bronchopulmonary diseases with dissemination sequentially changing the members of association of pathogens taxonomic subordination.

Bacterial pathogens were transformed into non-traditional non-canonical form, adaptogenic are important for the conservation of the microbial population in the traumatic effects of aggressive chemical substances and controlled adequate inhibition of biochemical activity of microbes transformants avoid damaging action of endogenous and exogenous humoral adverse effects on the population of the pathogen, since there is conservation of genetic potential bacteria, sufficient to restore the disturbed dynamics of generation ecotope, when removing the sub-lethal effects of external and out of post-traumatic recessive physiological state if it enters the favorable growing conditions. These ecotopes, optimal for parasitic intracellular microbes, are internal environment the most sensitive animals or elective-selective culture medium. Therefore, to indicate the UCS pasteurell of bacteriological negative biomaterials needs gentle treatment of material processing and the use of elective procedures insulation

Calves, respiratory syndrome, *P. multocida*, UCS, elective-selective method, false negative bacteriological diagnosis
