

УДК 619:616.98-076:579:843.95:636.4

БОЙКО П. К., д-р вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: pkboyko@ukr.net,

ПАЛАМАРЧУК А. М.*, e-mail: arseniypalam@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГІЧНИХ ОЗНАК, ТИНКТОРІАЛЬНИХ І БІОХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ ТА ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ ПАСТЕРЕЛ

*В статті наведено результати порівняльного вивчення морфологічних ознак, тинкторіальних, культуральних і біохімічних властивостей та приналежність до серологічних груп польових ізолятів пастерел і музейних штамів *Pasteurella multocida* та *Pasteurella haemolytica*.*

*Встановлено, що на основі вивчення культуральних та біохімічних властивостей можна диференціювати ізоляти *P. multocida* від *P. haemolytica*.*

Приналежність ізолятів пастерел до тієї чи іншої серогрупи за відсутності типоспецифічних пастерельозних сироваток можна достовірно провести з допомогою модифікованого КАМП-тесту та реакції флокуляції з акрифлавіном.

Ключові слова: пастерели, ізоляти, серогрупи.

Вступ. Пастерельоз кролів спричиняється *P. multocida* – мікроорганізмом із роду *Pasteurella*. Це грамнегативна бактерія, яка в мазках-відбитках має добре виражену капсулу й біполярне зафарбування [1, 2].

За капсульним антигеном розрізняють 5 серологічних груп *P. multocida*, зокрема: А, В, D, Е та F [3]. Пастерели, що відносяться до серогруп А і D, є збудниками пастерельозу різних видів тварин та мають панзоотичне розповсюдження. Пастерели серогруп В і Е викликають геморагічну септицемію великої рогатої худоби й диких жуйних тварин і поширені переважно у країнах із тропічним кліматом [4]. Пастерел серогрупи F було виділено від індички в США у 1987 році; пастерели цієї групи виділяють, як правило, від птахів у Північній Америці, рідше – в інших частинах світу [5].

Аналіз спеціальної літератури та складу вакцин, що зареєстровані на ринку ветеринарних імунобіологічних засобів, свідчать про те, що основними імуногенними вакцин проти пастерельозу кролів є пастерели серогруп А і D.

Проте, визначальним у конструюванні вакцин проти пастерельозу є підбір штамів за характеристиками, що підтверджують їхню типовість, високу антигенність й імуногенність.

Мета роботи. Дати порівняльну характеристику низки польових ізолятів пастерел, які можна було б використовувати як виробничі – для конструювання вакцин проти пастерельозу кролів та як контрольні – для вивчення протективної активності сконструйованих вакцинних препаратів.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для наших досліджень слугували польові ізоляти пастерел, виділених нами з патологічного матеріалу

* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук **Бойко П.К.**

від кролів (всього 30 ізолятів). З них вибрано три найбільш типові ізоляти. Для порівняльної характеристики були взяті музейні штами *P. multocida* і *P. haemolytica*. У роботі використано мікроскопічні та культурально-біохімічні методи досліджень [6].

Культуральні властивості пастерел вивчали після посіву на м'ясо-пептонний бульйон (МПБ), м'ясо-пептонний агар (МПА), кров'яний м'ясо-пептонний агар (КМПА), агари Мак-Конкі й Хотінгера. Культивування проводили за $37 \pm 0,3^\circ\text{C}$ протягом 24 год.

Морфологічні ознаки і тинкторіальні властивості вивчали у мазках за допомогою: а) звичайної світлової мікроскопії, які фіксували на полум'ї і фарбували за Грамом і Гінсом; б) фазово-контрастної мікроскопії – препарат «роздушена крапля».

Із біохімічних показників визначали здатність утворювати індол та уреазу, наявність орнітиндекарбоксілази, а також цукролітичну активність до глюкози, лактози, сахарози, мальтози і маніту на середовищі Гісса з вказаними цукрами. Утворення індолу визначали за допомогою індикаторних папірців, просочених розчином щавлевої кислоти [7].

Приналежність пастерел до серогруп визначали двома методами – з допомогою модифікованого КАМП-тесту та реакцією флокуляції з водним розчином акрифлавіну.

Постановку КАМП-тесту з використанням агару Хотінгера і β -гемолітичного *Staphylococcus aureus* проводили в наступному порядку. Досліджувану 18-годинну бульйону культуру пастерел бактеріологічною петлею висівали на чашку Петрі з агаром Хотінгера. Посів проводили паралельними штрихами на відстані 7–10 мм один від одного, не відриваючи петлі від поверхні агару. Потім, бактеріологічною петлею одним рухом за діаметром чашки, перпендикулярно до нанесених штрихів пастерел, висівали добову бульйону культуру *S. aureus*. Чашки з посівами інкубували 18–24 год за 37°C і оцінювали результат. Штами, які в зоні росту стафілокока (до 5 мм) утворювали дрібніші колонії, ніж колонії, що розташовані віддаленіше від цієї зони, відносили до серогрупи А. Крім того, колонії *P. multocida* серогрупи А, що росли поблизу стафілокока, мали інше забарвлення, порівнянно з віддаленими колоніями.

Розмір колоній пастерел серогруп В та D є незмінним як у безпосередній близькості до зони росту *S. aureus*, так і на значній віддалі.

Як додатковий метод визначення серогрупи пастерел була проведена реакція флокуляції з акрифлавіном за наступною методикою.

5 см³ досліджуваної 18-годинної бульйонної культури пастерел центрифугували за 3000 об./хв протягом 15 хв. Надосадову рідину зливали, осад струшували в залишку (0,5 см³) надосадової рідини до стану гомогенної суспензії. До останньої додавали 0,5 см³ свіжого водного розчину акрифлавіну 1:1000 і ретельно перемішували. Пастерели серогрупи D впродовж 10–15 хв після додавання розчину акрифлавіну утворювали флокулят у вигляді крупних пластівців, що не розбивалися після струшування. Слід відзначити, що

подібний флокулят можуть утворювати дисоційовані культури пастерел інших серогруп, але в цьому випадку флокулят легко розбивається на дрібні пластівці.

Пастерели серогруп В і F дають негативну реакцію флокуляції.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати посівів на МПБ, МПА, КМПА та агар Мак-Конкі вказані в табл. 1.

Таблиця 1

Особливості росту музейних штамів і польових ізолятів пастерел на основних живильних середовищах

Вид та умовне позначення штаму	МПА		МПБ		КМПА	Мак-Конкі
	Форма колоній	Прозорість колоній	Каламуть	Осад	Гемоліз	Ріст
Музейний штам <i>P. haemolytica</i>	Круглі, опуклі, з рівними краями	Напівпрозорі	Рівномірні	Відсутній	Навколо колоній наявний β-гемоліз	+
Музейний штам <i>P. multocida</i>	Круглі, опуклі, з рівними краями	Напівпрозорі	Рівномірні	Слизовий осад, що піднімається у вигляді косички	Відсутній	–
Польові ізоляти № 1, № 2, № 3	Круглі, опуклі, з рівними краями	Напівпрозорі	Рівномірні	Слизовий осад, що піднімається у вигляді косички	Відсутній	–

З отриманих результатів видно, що на МПА як музейні штами, так і польові ізоляти пастерел утворювали однакові колонії округлої форми, опуклі з рівними краями, напівпрозорого кольору, що мають вигляд дрібних крапель роси. Ріст *P. multocida* на МПБ характеризується утворенням рівномірної каламуті та слизистого осаду, який після струшування піднімався у вигляді косички, тоді як *P. haemolytica* осаду не утворювала.

На КМПА усі пастерели утворювали дрібні росинчасті колонії, проте гемоліз спричиняла лише *P. haemolytica*. На агарі Мак-Конкі *P. haemolytica* проростала, а *P. multocida* на цьому середовищі не росла. Використання КМПА і агару Мак-Конкі є недорогим і надійним критерієм диференціації цих двох видів пастерел.

Серед досліджених 30 ізолятів пастерел, виділених від кролів із різною патологією, ми не ідентифікували жодного ізоляту як *P. haemolytica*, що свідчить про те, що останній є рідкісним патогеном для кролів.

Морфологічно музейні штами і польові ізоляти пастерел мали однакові тинкторіальні властивості (грамнегативні, мали виражене біполярне зафарбування, навіть, у разі фарбування мазків за Грамом), подібну будову – дрібні поліморфні біполярно зафарбовані овоїди, з ледь помітною (у музейних штамів) і добре вираженою (у польових ізолятів) капсулою (фарбування за Гінсом). Окрім того у свіжовиділених ізолятів капсулу добре видно, навіть, за умови фарбування мазків за Грамом та у препаратах «роздушена крапля».

Таким чином, наявність капсули та ступінь її вираженості може бути свідченням вірулентності виділених пастерел.

Наступним етапом наших досліджень було вивчення біохімічних властивостей музейних штамів та польових ізолятів пастерел (табл. 2).

Таблиця 2

Біохімічні властивості музейних штамів та польових ізолятів пастерел

Вид та умовне позначення штаму	Ознака							
	Індол	Уреаза	Орнітин декарбоксилаза	Ферментація з утворенням кислоти (через 24–48 год.)				
				Глюкоза	Лактоза	Сахароза	Мальтоза	Маніт
Музейний штам <i>P. haemolytica</i>	–	–	–	+	+	+	+	+
Музейний штам <i>P. multocida</i>	+	–	+	+	–	+	–	+
Польовий ізолят № 1	+	–	+	+	–	+	–	+
Польовий ізолят № 2	+	–	+	+	–	+	–	+
Польовий ізолят № 3	+	–	+	+	–	+	+	+

Як видно з результатів наведених у табл. 2, польові ізоляти та музейний штам *P. multocida* мали однакові біохімічні властивості (утворювали індол, володіли орнітиндекарбоксилазною активністю, не мали уреаз, зброджували з утворенням кислоти глюкозу, сахарозу і маніт та не зброджували мальтозу за винятком ізоляту № 3). Можна припустити, що збродження мальтози пастерелами є лабільною біохімічною властивістю, що слід мати на увазі, ідентифікуючи польові ізоляти пастерел за біохімічними, особливо цукролітичними властивостями.

Музейний штам *P. haemolytica* мав суттєві відмінності від музейного штаму та польових ізолятів *P. multocida* за біохімічними властивостями, що дозволяє диференціювати ці два види пастерел.

Приналежність польових ізолятів *P. multocida* до певних серогруп проводили за допомогою модифікованого КАМП-тесту і реакції флокуляції з акрифлавіном.

За результатами модифікованого КАМП-тесту з використанням агару Хотінгера та гемолітичного *S. aureus* встановлено, що колонії ізолятів № 1 і № 2, які виростили в безпосередній зоні росту *S. aureus*, були значно меншими, мали більш щільну консистенцію (були непрозорими), ніж ті, що виростили на віддалі від зони росту стафілокока. Колонії ізоляту № 3 мали однаковий діаметр незалежно від відстані до зони росту стафілокока. Таким чином, за результатами цього тесту ми вважаємо, що пастерели ізолятів № 1 і № 2 відносяться до серогрупи А.

У разі змішування суспензії бульйонної культури пастерел ізоляту № 3 з акрифлавіном утворювався флокулят у вигляді крупних пластівців, що не розбивалися після струшування, тоді як пастерели ізолятів № 1 і № 2 не давали

позитивної реакції флокуляції з розчином акрифлавіну. Це й було підставою для віднесення ізоляту № 3 до *P. multocida* серогрупи D.

Отримані результати дають нам можливість стверджувати, що типізація пастерел з допомогою модифікованого КАМП-тесту та реакції флокуляції з акрифлавіном є достовірною, значно дешевшою і, безперечно, більш доступною у виконанні в умовах рутинних досліджень діагностичних лабораторій. Такої думки щодо первинної типізації ізолятів пастерел дотримуються й інші дослідники [8].

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. За морфологічними ознаками та тинкторіальними властивостями пастерели музейних штамів *P. haemolytica* і *P. multocida* та польових ізолятів цього роду не мають відмінностей за винятком наявності й величини капсули, що може бути пов'язано з вірулентністю ізолятів пастерел.

2. За наявністю гемолізу на КМПА, ростом колоній на агарі Мак-Конкі, утворенням осаду на МПБ, відсутністю орнітин декарбоксилази та ферментації лактози можна досить легко диференціювати ізоляти *P. haemolytica* від *P. multocida*.

3. За відсутності типоспецифічних аглютинуючих пастерельозних сироваток, можна провести достовірну типізацію пастерел з допомогою модифікованого КАМП-тесту та реакції флокуляції з акрифлавіном.

4. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення вірулентних, антигенних та імуногенних властивостей у відібраних нами польових ізолятів пастерел.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Горбань М. І. Епізоотологія з мікробіологією / М. І. Горбань. – К.: Вища школа, 1989. – 94 с.
2. Adlam C. Pasteurella and pasteurellosis / C. Adlam, J. M. Rutter // Academic Press. – 1989. – № 16. – 341 p.
3. Harper M. Pasteurella multocida pathogenesis: 125 years after Pasteur / M. Harper, J. D. Boyce // Federation of European Microbiological Societies. – 2006. – № 265. – P. 1–10.
4. Townsend K.M. Genetic organization of Pasteurella multocida cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system / K. M. Townsend, J. D. Boyce // Clin Microbiol. – 2001. – № 39. – P. 924–929.
5. Jonas M. Characterization of nine Pasteurella multocida isolates from avian cholera outbreaks in Indonesia / M. Jonas, T.Y. Morishita // Avian Diseases. – 2001. – № 45. – P. 34–42.
6. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Д. И. Скородумов, В. В. Субботин, М. А. Сидоров и др. – М.: Изографъ, 2005. – 656 с.
7. Антонов В. Я. Лабораторные исследования в ветеринарии / В. Я. Антонов, П. Н. Блинов. – М.: Колос, 1974 – 320 с.
8. Henrik C. Classification of Pasteurella species B as Pasteurella oralis sp. nov. / C. Henrik, F. Mads // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012. – № 62. – P. 1396–1401.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ, ТИНКТОРИАЛЬНЫХ И БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ И ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ ПАСТЕРЕЛЛ / Бойко П. К., Паламарчук А. Н.

*В статье приведены результаты сравнительного изучения морфологических признаков, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств и принадлежность к серологическим группам полевых изолятов пастерелл и музейных штаммов *P. multocida* и *P. haemolytica*.*

*Установлено, что на основе изучения культуральных и биохимических свойств можно дифференцировать *P. multocida* от *P. haemolytica*.*

Принадлежность изолятов пастерелл к той или иной серогруппы при отсутствии типоспецифических пастерельозных сывороток можно достоверно провести с помощью модифицированного КАМП-теста и реакции флокуляции с акрифлавином.

Ключевые слова: пастереллы, изоляты, серогруппы.

COMPARATIVE OF ANALYSIS MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS, TINCTORIAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PASTEURELLA MUSEUM STRAINS AND FIELD ISOLATES / Boyko P. K., Palamarchyk A. M.

Introduction. *The comparative study of morphological, tinctorial, culture and biochemical properties and affiliation with serological groups of the Pasteurella field isolates and *P. multocida* and *P. haemolytica* museum strains.*

*It was established, that by studying of cultural and biochemical properties, *P. multocida* can be different from *P. haemolytica*.*

The goal of the work. *To give the comparative characteristic of a number of Pasteurella field isolates, which could be used as productive strains for constructing vaccines against pasteurellosis of rabbits and controls for studying protective activities of the constructed vaccine preparations.*

Materials and methods. *30 field isolates of Pasteurella were isolated from pathological material of rabbits. For comparative characteristics of *P. multocida* and *P. haemolytica* museum strains have been taken. In our work we used microscopic and culturally-biochemical research methods.*

Cultural properties of Pasteurella were studied in beef-extract broth (BEB), beef-extract agar (BEA), blood beef-extract agar (BBEA), McConkey agar and Hottinger's agar. Cultivation was carried out at $37 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ within 24 hours.

Morphological characteristics and tinctorial properties were studied in preparations: a) for conventional light microscopy that were fixe on the flame and stained by Gram and Gins; b) for phase-contrast microscopy - preparation called «flatten drop»

From biochemical values we determined the ability to form indole and urease, the presence of ornithine decarboxylase and saccharolytic activity to glucose, lactose, sucrose, maltose and mannitol on Hissa medium with the mentioned sugars.

Belonging Pasteurella to serogroups was determined by two methods - with modified Campo test and flocculation reaction with aqueous solution of acriflavin.

Results of research and discussion. *In the BEA as museum strains so field isolates formed same rounded, convex, smooth and translucent colonies that look like drops of dew. The growth of *P. multocida* in BEB is characterized by formation of uniform turbidity and mucous sludge, which rises then of shaking as braids, while *P. haemolytica* did not forms a sludge.*

*In BBEA Pasteurella formed small dewy colonies, but only *P. haemolytica*, that grows on McConkey agar, causes hemolysis, while *P. multocida* does not grow in this medium. The use of BBEA and McConkey agar is an inexpensive and reliable criterion for differentiating these two Pasteurella strains.*

Field isolates and *P. multocida* museum strain had the same biochemical properties: produced indole, had an ornithine decarboxylase activity, had not urease, fermenting acids with glucose, sucrose and mannitol, did not fermentate maltose, except the isolate №3.

As a result of CAMP tests we considered, that the *Pasteurella* isolates №1 and №2 belong to serogroup A.

By results of mixing suspension with acriflavin, isolate №3 was designate as *P. multocida* serogroup D.

Conclusions and prospects for further research.

1. According to morphological characteristics and tinctorial properties *P. haemolytica* and *P. multocida* museum strains as well as *Pasteurella* field isolates didn't have any differences, except of the capsule presence and size of the, which may be associated with virulence of *Pasteurella* isolates.

2. It is possible to out an accurate *Pasteurella* typing us the modified CAMP test and flocculation reaction with acriflavin, when type-specific agglutinating sera are not available.

3. Further studies will be directed to investigate virulent, antigenic and immunogenic properties of *Pasteurella* field isolates.

Keywords: *Pasteurella*, isolates, serogroups.

REFERENCES

1. Gorban, M.I. (1989). *Epizootologija z mikrobiologijeju [Epizootology with microbiology]*. Kiev: Vishha shkola [in Ukrainian].
2. Adlam, C. & Rutter, J.M. (1989). *Pasteurella* and pasteurellosis. *Academic Press*, 16, 141–147.
3. Harper, M. & Boyce, M. (2006). *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *Federation of European Microbiological Societies*, 265, 1–10.
4. Townsend, K.M. & Boyce, J.D. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Clin Microbiol*, 39, 924–929.
5. Jonas, M. & Morishita, T.Y. (2001). Characterization of nine *Pasteurella multocida* isolates from avian cholera outbreaks in Indonesia. *Avian Diseases*, 45, 34–42.
6. Skorodumov, D.I. (2005). *Mikrobiologicheskaja diagnostika bakterialnyh boleznej zhivotnyh [Microbiological diagnosis of bacterial diseases of animals]*. Moscow: Izograf [in Russian].
7. Antonov, V.Ja. & Blinov, P.N. (1974). *Laboratornye issledovanija v veterinarii [Laboratory studies in veterinary medicine]*. Moscow: Kolos [in Russian].
8. Henrik, C. & Mads, C. (2012). Classification of *Pasteurella* species B as *Pasteurella oralis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 1396–1401.