

Розділ 3. Ветеринарна мікробіологія та вірусологія

До антибіотиків нітрофуранової групи чутливість штаму в S-формі проявлялася наступним чином: штам був слабо чутливим до фузі діну та фуразолідону (13-14 мм), чутливим до фурадоніну (24 мм), високочутливим до фурагіну (30 мм). У R-формі спостерігалось зниження різного ступеня рівню чутливості штаму до фузидину, фурадоніну та фурагіну, незначне підвищення рівню чутливості до фуразолідону.

У групі азолів штам проявляв чутливість у S-формі до флуконазолу, ітраконазолу, клотримазолу (18-26 мм), був нечутливим до кетоконазолу. У R-формі штам виявився нечутливим до антибіотиків зазначеної групи (флуконазол – 9 мм).

Висновки. Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено:

– у процесі S-R- дисоціації культури *P. multocida* «Смол» одночасно відбулися наступні зміни біологічних властивостей: морфологія колоній відповідала R-формі; ферментативна активність культури знизилася до мінімального рівня; високовірулентна культура повністю втратила вірулентність та патогенні властивості, спостерігалися зміни чутливості культури до антибактеріальних засобів;

– зміни чутливості культури до антибактеріальних засобів були неоднозначними:

- у більшості випадків спостерігалось її зниження різною мірою ступеню;
- у окремих випадках чутливість культури R-формі підвищувалася;
- до антибіотиків фторхинолонового ряду чутливість культури в R-формі підвищилася;
- до окремих антибіотиків проявлялася нечутливість штаму в S-формі та чутливість в R-формі.

Перспективи подальших досліджень: У системі підтримання виробничих штамів мікроорганізмів необхідними є умови, що забезпечують зберігання штамів в стабільній S-формі та запобігають виникненню дисоціацій.

Подальші дослідження механізму зміни біологічних властивостей бактеріальних клітин в процесі S-R-дисоціації необхідно проводити на молекулярно-генетичному рівні.

Список літератури

1. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. – С. 131-150. 2. Вплив факторів зовнішнього середовища на виживання збудника пастерельозу / Т.І. Тарасюк, Л.К. Волинець, В.І. Москалюк [та ін.] // Вісник Сумського Державного аграрного університету. – 1999. – Вип. 4. – С. 181-182. 3. Кисленко, В.Н. Практикум по ветеринарній микробиології та іммунології. – М.: Колос. – 2005. 4. Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Медгиз, 1962. – 15 с.

STUDY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF STRAIN *PASTEURELLA MULTOCIDA* «SMOL» WITH THE SR-DISSOCIATION

Vygovska L.M.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains, Kyiv

The article presents the results of the study of biological properties of strains of Pasteurella multocida «SMOL», pathogenic for rabbits from a collection of SSCIBS. Comparative characteristics of cultural-morphological, biochemical, pathogenic properties and resistance to antibacterial drugs in culture-S and-R form are presented in the article.

УДК 619:579.843.95:579.221.23

КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПАСТЕРЕЛЛ

Гадзевич Д.В., Горбенко А.В., Гадзевич О.В.,

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Тарвидс Ю.В.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Пастереллез (*Pasteurellosis*) – контагиозное инфекционное заболевание, характеризующееся явлениями септицемии и восполительно-геморрагическими процессами во внутренних органах, на серозных и слизистых оболочках. Лабораторная диагностика основывается на выделении культуры возбудителя и изучении его свойств [1].

К пастереллезу восприимчивы все виды домашних и диких млекопитающих животных и птиц. Болеет пастереллезом и человек. Среди кур и кроликов болезнь обычно проявляется эпизоотией. У других видов животных тоже нередки эпизоотические вспышки болезни [1, 2, 3]. Чаще возбудителем инфекции является *Pasteurella multocida* – небольшая, грамотрицательная, неподвижная и не образующая спор бактерия, располагающаяся изолированно, парами и реже – в виде цепочек. Величина и форма микроба варьируют в зависимости от происхождения штамма. Пастереллы являются факультативными аэробами, хорошо растущими на обычных питательных средах при 37 °С. Возбудитель пастереллеза имеет феномен диссоциации, т.е. разъединение популяции бактерий и возникновения S- и R-форм. Между этими формами существует переходная M-форма, эти формы легко выявляются при культивировании пастерелл на твердых питательных средах [1].

Согласно литературным данным пастереллы являются микроорганизмами малоактивными в ферментативном отношении, кроме того, многие авторы отмечают, что биохимические свойства у них не стабильны [2, 4]. Поэтому целью проведенных исследований было сравнить биохимическую активность пастерелл различных серологических групп, а также S- и R-форм бактерий.

Материалы и методы. Пастереллы выделяли из патологического материала (крови, печени, легких, селезенки, почек, лимфоузлов и костного мозга), отобранного от сельскохозяйственных животных принадлежащих хозяйствам разных форм собственности. Для посева использовали простые и дифференциально-диагностические питательные среды. Родовую и видовую принадлежность микроорганизмов устанавливали по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и серологическим свойствам [1]. В процессе работы было выделено из патологического материала 30 изолятов пастерелл. Патогенность выделенных культур микроорганизмов определяли биологической пробой на белых мышах, которых заражали внутрибрюшинно по 0,2 см³ суточной бульонной культурой пастерелл. Из патологического материала от павших мышей делали высевы на питательные среды, и при изоляции пастерелл биопробу считали положительной.

Результаты исследований. Были изучены морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические свойства изолированных пастерелл. Результаты исследований показали, что все выделенные изоляты способны расти на простых

питательных средах, однако медленно (36-48 часов) и в небольших концентрациях ($5,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^8$ КОЕ). Эти обстоятельства значительно затрудняют их первичное выделение в виду наличия в патологическом материале сопутствующей микрофлоры с более выраженной ростовой и антагонистической активностью.

В жидких питательных средах рост пастерелл сопровождался равномерным помутнением среды, с последующим образованием осадка, который при встряхивании пробирки поднимался косичкой. При окраске по Романовскому-Гимзе все изоляты пастерелл обладали биполярностью. Морфологически изолированные пастереллы были переменными (от выраженной ововидной формы при первичном выделении до крупных палочек в процессе хранения и наоборот). Особо заметна была их переменность при хранении в лабораторных условиях на искусственных питательных средах.

Изолированные пастереллы отличались между собой по характеру роста на плотных питательных средах. По росту на МПА различали мелкие прозрачные S-колонии, большие мукоидные M-колонии и шероховатые R-колонии.

R-колонии выделяли в большинстве случаев при хронической форме пастереллеза, или в ассоциации с другими патогенами, где число сочленов ассоциаций было больше трех. В 3 из 6 случаев R-формы были выделены из лимфатических узлов. Кроме того, многие изоляты пастерелл, которые имели при первичной изоляции из патологического материала S-форму, через 8-10 пассажей на питательных средах переходили в R-формы.

В таблице 1 приведены данные о некоторых биохимических свойствах выделенных изолятов *Pasteurella multocida*. Все исследованные изоляты имели типичные для пастерелл культурально-морфологические свойства и были патогенными для белых мышей. В отношении сорбита, ксилозы, мальтозы, арабинозы пастереллы проявляли биохимическую переменность. А в отношении глюкозы, сахарозы, галактозы, монозы, манита их биохимическая активность была стабильно положительной, в отношении лактозы, дульцита, рафинозы, салицина, рамнозы стабильно отрицательной. В 100 % случаях изоляты пастерелл образовывали индол.

Таблица 1 – Биохимические свойства бактерий рода *Pasteurella*

Свойства	<i>P. multocida</i> серовариант А	<i>P. multocida</i> серовариант В	<i>P. multocida</i> серовариант D
Ферментация углеводов многоатомных спиртов с образованием кислоты			
глюкоза	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
сорбит	+ (60 %)	- (70 %)	+ (80 %)
сахароза	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
галактоза	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
маноза	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
манит	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)
лактоза	- (100 %)	- (100 %)	- (100 %)
дульцит	- (100 %)	- (100 %)	- (100 %)
рафиноза	- (100 %)	- (100 %)	- (100 %)
ксилоза	- (60 %)	- (100 %)	- (80 %)
мальтоза	- (80 %)	- (100 %)	- (100 %)
арабиноза	- (60 %)	- (100 %)	- (60 %)
салицин	- (100 %)	- (100 %)	- (100 %)
рамноза	- (100 %)	- (100 %)	- (100 %)
Образование газа			
сероводород	+ (100 %)	+ (80 %)	+ (60 %)
индол	+ (100 %)	+ (100 %)	+ (100 %)

Как видно из таблицы 2 из легких во всех случаях, а из сердца в 77 % случаях, изолировали пастереллы в S-форме.

Таблица 2 – Закономерность выделения S- M- и R-форм пастерелл с различных органов

Культурально-морфологические особенности пастерелл	Откуда выделены микроорганизмы	Выделенные изоляты	
		количество	процент
S-формы	легкие, сердце	23	77 %
M-формы	лимфатические узлы, сердце, печень	5	17 %
R-формы	лимфатические узлы, печень	2	7 %

В виду того, что пастереллы легко переходят в M и R-формы, возникла необходимость изучить, как изменяется биохимическая активность разных форм пастерелл (таблица 3).

Таблица 3 – Патогенность и биохимические свойства бактерий рода *Pasteurella* в зависимости от культурально-морфологических характеристик бактерий

Свойства	S-формы	M-формы	R-формы
1	2	3	4
Ферментация углеводов многоатомных спиртов с образованием кислоты			
глюкоза	+ (100%)	+ (100%)	+ (100%)
сорбит	+ (100%)	+ (100%)	+ (60%)
сахароза	+ (100%)	+ (100%)	+ (40%)

1	2	3	4
галактоза	+ (100%)	+ (100%)	+ (60%)
маноза	+ (100%)	+ (100%)	+ (100%)
манит	+ (100%)	+ (100%)	+ (40%)
лактоза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
дульцит	- (100%)	- (100%)	- (100%)
рафиноза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
ксилоза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
мальтоза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
арабиноза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
салицин	- (100%)	- (100%)	- (100%)
рамноза	- (100%)	- (100%)	- (100%)
Образование газа			
сероводород	+ (100%)	+ (80%)	- (100%)
индол	+ (100%)	+ (100%)	- (100%)
Вирулентность (белые мыши в/б доза 10×10^6 КОЕ)	+ (100%)	+ (40%)	- (100%)
Вирулентность (белые мыши в/б доза 10×10^9 КОЕ)	+ (100%)	+ (100%)	+ (40%)

Пастереллы R-форм в отличие от **S-форм** в 100 % случаях не образовывали сероводород и утратили способность к индо-лообразованию, в отношении манита, галактозы, сахарозы и сорбита исследуемые измененные формы пастерелл проявляли переменную активность. В отношении лактозы, дульцита, рафинозы, салицина, рамнозы диссоциированные формы пастерелл были стабильно отрицательными. Таким образом, в процессе диссоциации одновременно с изменением морфологии колоний меняются биохимические и патогенные свойства бактерий.

Было установлено, что для большинства вирулентных бактерий характерен рост в виде S-форм колоний.

При внутрибрюшинном заражении белых мышей (в дозе – 10×10^6 КОЕ) S-формами бактерий наблюдали гибели животных в 100 % случаев, M-формам наблюдали гибель животных в 40 % случаев, а R-формы были не патогенными для лабораторных животных.

Кроме того, если M-формы в 50 % случаях могли переходить в исходную форму, то трансформацию R- в S-форму в 37 % случаях мы не наблюдали. В 67 % случаях после многократного пассажирования через организм восприимчивого животного (белые мыши) был возможен обратный переход в S-форму, однако в дальнейшем при культивировании на искусственных питательных средах во втором пассаже снова наблюдали переход в диссоциированные формы пастерелл.

Таким образом, для поддержания биологической активности и сохранения первоначальных свойств пастерелл в лабораторных условиях необходимо после трехкратного пассажирования через питательные среды реизолировать изоляты пастерелл на лабораторных животных.

Способность пастерелл к диссоциации и образованию M- и -R-форм во многих случаях усложняет бактериологическую диагностику. Также эти формы микроорганизма нецелесообразно использовать для изготовления биологических препаратов в виду изменения их биологических свойств.

Выводы. 1. Установлено, что пастереллы на искусственных питательных средах растут медленно (36-48 часов) и в небольших концентрациях (5×10^6 – 1×10^8 КОЕ). Что затрудняет их первичное выделение в виду наличия в патологическом материале сопутствующей микрофлоры с более выраженной ростовой и антагонистической активностью.

2. Исследования показали, что биохимическая активность *P. multocida* серовариантов А, В и D в отношении глюкозы, сахарозы, галактозы, монозы, манита стабильно положительна, а в отношении лактозы, дульцита, рафинозы, салицина, рамнозы стабильно отрицательна. К другим сахарам и многоатомным спиртам реакция была переменной.

3. Способность пастерелл к диссоциации и образованию R-форм во многих случаях усложняет бактериологическую диагностику.

Список литературы

1. Алешкевич В.Н., Трофимов Ф.Е. Лабораторная диагностика пастереллезов с.-х. животных: Учеб.-метод. пособие. – Витебск, 1995. – С.4-10.
2. Мишанин, Ю.Ф. Справочник по инфекционным болезням животных. – Ростов-на-Дону: Изд. центр «Март», 2002. – 576 с.
3. Покровский, В.И. Медицинская микробиология / В.И. Покровский, О.К. Подеев. – М: ГОЭТАР. Медицина. – 1999. – 120 с.
4. Hunt M.L., Adier B., Townsend K.M. The molecular biology of *Pasteurella multocida* // Vet. Microbiol. – 2000. – V.72. – P. 3-25.

CULTURAL-MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL FEATURES OF PASTEURELLA

Gadzevych D.V., Gorbenko A.V., Gadzevych O.V.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv,

Tarvids Yu.V.

Kharkov State Zooveterinary Academy

Data about cultural-morphological and biochemical properties of Pasteurella multocida of serotypes A, B and D, their pathogenicity and ability to form the dissociated forms are presented in the article.