

Етіопатогенетичні особливості формування мікробіоценозу за некробактеріозу тварин

Горбатюк О.І.*, Жовнір О.М., Андріяшук В.О., Рудой О.В., Мазигула Т.О.*

Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

У процесі філогенезу формується індигенна (автохтонна, резидентна) частина нормальної мікрофлори, яка створює нормо-біоценоз. Усі інші популяції мікробів, які входять до складу асоціацій, підпорядковані загальним екологічним закономірностям – формуванню симбіозу. Анаероби, у т.ч. і *F. necrophorum*, є переважно представниками нормальної мікрофлори у тварин, проте за зниження імунобіологічної реактивності організму, фузобактерії проникають через тканинні бар'єри у внутрішнє середовище, колонізують його та, в більшості випадків, разом з іншими асоціантами викликають інфекційний процес. Збудник некробактеріозу, багаторазово пасажуючись через організм сприйнятливих тварин, набуває високої вірулентності, викликає, в основному, хронічний перебіг захворювання та проявляється некрозами в різних органах і тканинах. Проте, спостерігається і гострий перебіг некробактеріозу, який часто закінчується загибеллю тварин [1–5].

Відомо, що *F. necrophorum* є представником облигатних анаеробів шлунково-кишкового тракту. Фузобактерії виділяються з організму постійно, як непатогенні мікроорганізми. Набута вірулентність *F. necrophorum* через пасажування на сприйнятливих тваринах, викликається факторами патогенності збудника – продукуванням токсинів і розвитку патологічного процесу, який поширюється на основу шкіри, далі по підшкірній клітковині в ділянку вінчика та в напрямку заплюсневого суглоба. Найчастіше фузобактерії є асоціантами *C. perfringens* та інших патогенів, що сприяє розвитку гнійно-некротичних пододерматитів і флегмон. Важливу роль у розвитку некробактеріозу відіграє не стільки конкретний збудник *F. necrophorum*, скільки асоціації різних патогенних мікроорганізмів, зокрема стафілококи, протей, ешерихії, сальмонели, спорові анаероби та інші патогени, які своїми токсинами підсилюють дію основного збудника та ускладнюють перебіг хвороби [6, 7]. Біоценотичні зв'язки *F. necrophorum* в мікробних асоціаціях проявляються явищами симбіозу та синергізму. Факультативні бактерії поглинають кисень, чим створюють умови для росту *F. necrophorum*, а його фактори патогенності, зокрема лейкотоксин, захищають інші мікроорганізми від фагоцитозу [8]. За літературними даними, у корів за гнійно-некротичних процесів у ділянці пальців, поряд із збудником *F. necrophorum*, було ідентифіковано 18 видів мікроорганізмів. Найчастіше зустрічалися стафілококи (87,2 %), мікрококи (74,6 %), ешерихії (32,6 %), протей (22,1 %), стрептококи (16,3 %) [9, 10].

При захворюваннях кінцівок уражений орган постійно має контакт із ґрунтом і іншими об'єктами навколишнього середовища, що призводить до його значної контамінації бактеріальною мікрофлорою та провокує розвиток патологічного процесу за одночасної асоціативної дії на організм двох, трьох чи кількох видів анаеробних і аеробних мікроорганізмів [11, 12].

Відомо про випадки тяжкого перебігу некробактеріозу у свиней, ускладненого бешихою та чумою, випадки одночасного перебігу некробактеріозу і пастерельозу та ряд інших випадків захворювання тварин на некробактеріоз, ускладнений асоціативною мікрофлорою.

Зважаючи на те, що в етіології некробактеріозу асоціативна мікрофлора суттєво ускладнює перебіг захворювання, а представники мікробних спільнот в організмі тварин підсилюють своїми ферментативними системами дію збудника некробактеріозу й тим самим впливають на зростання ступеню вірулентності останнього.

Отже, значення асоціацій із *F. necrophorum* у виникненні інфекційного процесу та вивчення їх впливу на перебіг захворювання у тварин є **актуальним**. Вивчення біоценозу надасть змогу поглибити знання стосовно особливостей патогенезу захворювання та створити ефективні лікувально-профілактичні засоби для боротьби з ускладненими формами перебігу некробактеріозу [13].

Мета роботи. Здійснити аналіз видового спектру мікроорганізмів за захворювання на некробактеріоз та його вплив на організм та характер перебігу захворювання у тварин за дії представників мікробних спільнот.

Матеріали та методи досліджень. Роботу виконано на базі лабораторії анаеробних інфекцій. Проведено бактеріологічні дослідження біоматеріалу від тварин, хворих на некробактеріоз, ізольовано та ідентифіковано збудник *F. necrophorum* та інші асоційовані з ним мікроорганізми за загальноприйнятими методиками [14, 15].

Для дослідження впливу окремих представників мікробних спільнот на розвиток і перебіг некробактеріозу було визначено ступінь вірулентності кожного виду збудника. Для постановки експерименту застосовували середню летальну дозу – LD₅₀, котра викликає смерть у 50,0 % тварин після інюкуляції культури збудника. З метою визначення LD₅₀ кожної дослідної культури асоціантів виготовляли ряд десятикратних розведень (10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷ і т.д.). Суспензію відповідної культури із кожного розведення інфікували по 4 гол. тварин. За закінчення експерименту окремо вважували кількість загиблих тварин для кожного виду збудника та його розведення. Визначення LD₅₀ проводили за формулою:

$$X = \frac{A - 50}{A - B},$$

де: А – кількість загиблих тварин (у %), які отримали розведення культури менше 50,0 %; В – кількість загиблих тварин (у %), які одержали високі розведення культури збудника – понад 50,0 %. Значення X додавали до логарифму розведення 50.

З метою вивчення порівняльного впливу виділених патогенних асоціантів із *F. necrophorum* та їх суміші на розвиток інфекційного процесу та перебіг некробактеріозу у тварин, було сформовано групи кролів за кількістю виділених ізолятів асоціантів із мікробних спільнот, утворених з *F. necrophorum*, включаючи й варіант їх асоціації. Усього в експерименті було використано 21 гол. кролів із середньою живою масою 2,5 ± 0,5 кг. Для інюкуляції монокультур асоціантів та їх суміші для кролів застосовано дозу 4 x LD₅₀. Тривалість експерименту складала 12 діб.

Статистичну обробку одержаних результатів: проводили за використання програми «Excel-97» для Windows із обчисленням середніх значень (М), середньоквадратичних відхилень (m). Критерій вірогідності визначали по Стьюденту із урахуванням порогу вірогідності (P<0,05; P<0,01) [16].

Результати досліджень та їх обговорення. Ретроспективний аналіз (2002–2012 рр.) результатів мікробіологічних досліджень, проведених на базі лабораторії анаеробних інфекцій показав, що захворювання тварин на некробактеріоз зустрічається в усіх регіонах України та реєструється, як змішана інфекція, що проявляється на фоні зниженої резистентності організму та за імунodefіциту В-клітинної ланки імунітету через вплив екзо- та ендогенних стресових факторів. Так, в одному із господарств Запорізької області спостерігали перебіг захворювання поросят віком 3–6 міс. із клінічними ознаками, характерними для сальмонельозу та некробактеріозу. При цьому, показники захворюваності молодняка свиней складала 35,5 %, загибелі – 26,8 %. За аналізом результатів бактеріологічних досліджень було підтверджено асоціативний перебіг некробактеріозу так, як виділено ізоляти *F. necrophorum* і *S. cholerae suis*, патогенні для білих мишей. Крім того, за результатами епізоотологічного моніторингу на той період найбільші по-

* Науковий консультант і керівник – Рижченко В.П., д. вет. наук, професор, член-кореспондент НААН України

казники підозри на захворюваність щодо некробактеріозу серед свиней зареєстровано в Луганській, Запорізькій, Кіровоградській, Київській, Донецькій, Полтавській і Харківській областях [17].

За останні 10 років за бактеріологічних досліджень було виділено ізоляти із біологічного матеріалу від тварин, які загинули із клінічними ознаками, характерними для некробактеріозу, та проведено їх ідентифікацію. Аналіз видового спектру мікроорганізмів, асоціантів *F. necrophorum*, показано в табл. 1.

За аналізом результатів досліджень видового спектру представників асоціацій встановлено, що окрім основного збудника *F. necrophorum*, було ізольовано асоціанти: *St. aureus*, *Cl. perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Diplococcus spp.*, *D. lanceolatus*, *Streptococcus spp.*, *E. coli*, *Clostridium spp.*, *S. Cholerae suis*, *En. aerogenes*, *Ps. aeruginosa*, *Pr. vulgaris*, *Pasteurella spp.*, *Kl. pneumoniae*, *Act. lignieresii*, *Citrobacter spp.*, *Str. zooeipidemicus*, *Micrococcus spp.*, *Str. faecalis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*.

Таблиця 1 – Асоціанти *F. necrophorum*, виділені з біоматеріалу від тварин, хворих на некробактеріоз

Вид біоматеріалу	Асоціанти <i>F. necrophorum</i>
Кінцівки	<i>Cl. perfringens</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Str. faecalis</i> , <i>D. lanceolatus</i>
Печінка	<i>E. coli</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>D. lanceolatus</i> , <i>Clostridium spp.</i> , <i>S. cholerae suis</i>
Легені	<i>Kl. pneumoniae</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>D. lanceolatus</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Серце	<i>E. coli</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>D. lanceolatus</i> , <i>Clostridium spp.</i>
Кишечник	<i>E. coli</i> , <i>S. typhi suis</i> , <i>Cl. perfringens</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>S. typhimurium</i>
Брижові лімфатичні вузли	<i>E. coli</i> , <i>S. typhisuis</i> , <i>Cl. perfringens</i> , <i>Staphylococcus spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>S. typhimurium</i>
Уражене вим'я	<i>Clostridium spp.</i> , <i>St. aureus</i> , <i>Staphylococcus spp.</i>
Ексудат матки	<i>E. coli</i> , <i>St. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Cl. perfringens</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Clostridium spp.</i>

Визначення видового спектру асоційованих мікроорганізмів у мікробіоценозах показали, що найчастіше *F. necrophorum* виділяли в спільнотах із *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Cl. perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Clostridium spp.* [18].

Слід звернути увагу на те, що результати моніторингу, проведені співробітниками лабораторії, показали, що за останній час у господарствах різних регіонів України зареєстровано випадки перебігу некробактеріозу, ускладненого сальмонельозною інфекцією, особливо серед свиней. Саме із біоматеріалу від свиней, поряд із збудником *F. necrophorum*, нами було ізольовано та ідентифіковано *S. typhisuis*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, що дало новий напрямок для розробки профілактичних засобів проти ускладненого перебігу некробактеріозу.

З метою підтвердження впливу мікробних асоціацій *F. necrophorum* і різних видів сальмонел на перебіг некробактеріозу, нами визначено LD₅₀ для білих. Так, LD₅₀ для *F. necrophorum* штам «Чернігівський» складало 3,5x10⁸ ± 0,01 м. т./см³; *S. enteritidis* штам «Чернігівський» – 2,3x10⁶ ± 0,02 м. т./см³; *S. dublin* штам «ДОН 515/146» – 3,2x10⁶ ± 0,03 м. т./см³; *S. typhisuis* штам «ЧК/144» – 1,7x10⁶ ± 0,03 м. т./см³; *S. typhimurium* штам «3–96/145» – 1,8x10⁶ ± 0,01 м. т./см³; *S. cholerae suis* штам «Запорізька-32» – 1,9x10⁶ ± 0,01 м. т./см³.

Нами вивчено характер впливу монокультур збудників та їх асоціації на розвиток інфекційного процесу при некробактеріозі на кролях (табл. 2). Аналіз результатів клінічних і бактеріологічних досліджень показав, що за однакової кількості введеного тваринам інфекційного матеріалу, у кролів, заражених асоціацією мікроорганізмів, розвиток захворювання та загибель наступала значно швидше в порівнянні із групами тварин, яким було інокульовано монокультури патогенів.

Таблиця 2 – Особливості перебігу захворювання за впливу монокультур *F. necrophorum*, асоціантів та їх суміші; (%; n=3)

Культури асоціантів	Результати клінічних досліджень після інокуляції монокультур та суміші <i>F. necrophorum</i> і асоціантів через, діб:																			
	початкові дані				3				7				9				12			
	Форми перебігу захворювання																			
	легка	середня	тяжка	загибель	легка	середня	тяжка	загибель	легка	середня	тяжка	загибель	легка	середня	тяжка	загибель	легка	середня	тяжка	загибель
<i>F. necrophorum</i> штам «Чернігівський»	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	33,3	66,7	-	-	-	66,7	33,3
<i>S. typhimurium</i> штам «3–96/145»	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	66,7	33,3	-	-	100,0	-	-	-	-	66,7	33,3
<i>S. dublin</i> штам «ДОН 515/146»	-	-	-	-	100,0	-	-	-	100,0	-	-	-	-	66,7	33,3	-	-	-	100,0	-
<i>S. typhisuis</i> штам «ЧК/144»	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	-	-	-	-	66,7	33,3	-	-	-	100,0	-
<i>S. enteritidis</i> штам «Чернігівський»	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	100,0	-	-	-	-	100,0	-
<i>S. cholerae suis</i> штам «Запорізький-32»	-	-	-	-	100,0	-	-	-	33,3	66,7	-	-	-	100,0	-	-	-	-	100,0	-
Асоціація патогенів: <i>F. necrophorum</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. typhisuis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. cholerae suis</i>	-	-	-	-	-	33,3	66,7	-	-	-	-	33,3	66,7	-	-	-	100,0	-	-	100,0

Зокрема, через 3 доби після зараження у кролів, яким було інокульовано монокультури *S. dublin*, *S. typhisuis* і *S. cholerae suis*, відмічалося легке пригнічення, зниження апетиту, місцева температура. На цей період 66,7 % тварин у групі, які були заражені сумішшю культур *F. necrophorum* і сальмонел, спостерігався тяжкий перебіг захворювання. У цій же групі через 7 діб після зараження загинуло 66,7 % тварин, а через 9 діб – спостерігалася повна загибель кролів. У групах тварин, яким було інокульовано монокультури збудників *F. necrophorum* та *S. typhimurium* відповідно, за закінчення експерименту (через 12 діб після зараження) загинуло всього 33,3 % поголів'я. У всіх останніх групах тварин перебіг захворювання характеризувався тяжкою формою без випадків загибелі тварин на момент закінчення експерименту.

Чистоту досліду було підтверджено реізолітованими та ідентифікованими вихідними культурами *F. necrophorum*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. typhisuis*, *S. enteritidis* і *S. cholerae suis*, виділених із біоматеріалу від тварин, які загинули під час експерименту та після евантазії хворих кролів за закінчення терміну досліду.

Висновки. 1. Особливістю епізоотичного процесу при захворюванні на некробактеріоз є його асоціативний перебіг.

2. Виявлено, що видовий спектр мікроорганізмів, асоційованих із *F. necrophorum*, представлений різними патогенами. Найчастіше асоціантами збудника некробактеріозу в мікробних спільнотах були *E. coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Cl. perfringens*, *Clostridium spp.* Асоціації *F. necrophorum* із представниками роду сальмонел зустрічаються рідше і, в основному, були ізолітовані із біоматеріалу від свиней – *S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, *S. typhisuis*.

3. Встановлено, що за однакової кількості введеного тваринам інфекційного матеріалу, у кролів, заражених асоціацією мікроорганізмів, розвиток захворювання та загибель наступала значно швидше в порівнянні із групами тварин, яким було інокульовано монокультури патогенів, що підтверджує синергетичні взаємовідносини асоціантів. Уже через 3 доби після зараження сумішшю культур асоціантів у 66,7 % тварин спостерігався тяжкий перебіг захворювання. Через 7 діб у групі загинуло 66,7 % поголів'я, через 9 діб загинули всі інфіковані кролі групи. У той час, за закінчення експерименту, у кролів, інфікованих відповідно монокультурами *F. necrophorum* і *S. typhimurium* було виявлено лише 33,3 % загибелі поголів'я в групах. У всіх інших групах, заражених відповідними монокультурами асоціантів, на момент закінчення терміну досліду спостерігався тяжкий перебіг захворювання.

Перспективи подальших досліджень. Порівняльний аналіз стосовно вивчення стану клітинної та гуморальної ланок імунітету за щеплення тварин експериментальними зразками моновакцин, виготовлених із культур виявлених асоціантів та зконструйованої асоційованої вакцини, до складу якої входять згадані патогени.

Список літератури

1. Beger, H. G. Bacterial contamination of pancreatic necrosis [Text] / H.G. Beger, R. Rilmer, M. Buchler // Gastroenterology. – 1986. – № 91 (2). – P. 433–438.
2. Панасюк, С.Д. Значение ассоциаций микроорганизмов в этиологии и профилактике инфекционных болезней конечностей крупного и мелкого рогатого скота (некробактериоз, копытная гниль) [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / С.Д. Панасюк. – М., 2007. – 51 с.
3. Улько, Л.Г. Асоційовані бактеріози кінцівок у корів (етіологія, удосконалення профілактики та засобів лікування) [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / Л. Улько. – Х., 2013. – 41 с.
4. Некробактеріоз свиней [Electronic resource]. – Access mode : http://vetlib.ru/infection_bolezni/pag. – Title from the screen.
5. Terhar, B.L. Fusobacterium necrophorum bacterin leukotoxoid effically in the control of naturally occurring hepatic abscesses in cattle [Text] / B.L. Terhar // Agri-Practice. – 1996. – Vol. 17, № 7. – P. 15–19.
6. Лопатин, С.В. Некробактериоз крупного рогатого скота [Текст] / С.В. Лопатин // Ветеринария с.-х. животных. – 2007. – № 12. – С. 9–15.
7. Новые препараты для профилактики и терапии инфекционных заболеваний конечностей у крупного и мелкого рогатого скота [Текст] / С.Д. Панасюк [и др.] // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний с.-х. животных : сб. науч. тр. – Ставрополь : ГСХА, 1996. – С. 24–26.
8. Соломаха, О.И. Некоторые морфологические особенности Fusobacterium necrophorum [Текст] / О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова // Аграр. Россия. – 2000. – № 3. – С. 59–61.
9. Сидорчук, А.А. Проблемы борьбы с некробактериозом: заблуждение и реальность [Текст] / А.А. Сидорчук [и др.] // Ветеринария. – 2006. – № 2. – С. 5–6.
10. Самоловов, А.А. Микробные ассоциации при гнойно-некротических процессах пальца у коров [Текст] / А.А. Самоловов // Науч.-техн. бюл. ВАСХНИЛ / Сибирское отд. – Новосибирск, 1981. – Вып. 23. – С. 16–19.
11. Сидорчук, А.А. Значение анаэробных микроорганизмов и их ассоциаций в норме и при патологии у сельскохозяйственных животных [Текст] / А.А. Сидорчук, М.Д. Дриаева, В.А. Федосеенко // Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней животных. – М., 1996. – С. 177–180.
12. Марченко, О.М. Некробактеріоз великої рогатої худоби (особливості перебігу, біологічні властивості Fusobacterium necrophorum та ефективність вакцинопрофілактики) [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.08. – К., 2003. – 24 с.
13. Панасюк, С.Д. Значение ассоциаций микроорганизмов в этиологии и профилактике инфекционных болезней конечностей крупного и мелкого рогатого скота (некробактериоз, копытная гниль) [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03. – М., 2007. – 51 с.
14. Методи діагностики некробактеріозу сільськогосподарських тварин [Текст] : метод. рек. для спеціалістів держ. вет. медицини, науковців та студентів / В.П. Риженко [та ін.] – К., 2003. – С. 4–10.
15. Загальні методи мікробіологічних досліджень у лабораторіях ветеринарної медицини [Текст] : метод. рек. / В.М. Івченко [та ін.], – Біла Церква, 2003. – С. 26–59.
16. Ойвин, И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований [Текст] / И.А. Ойвин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 1960. – № 4. – С. 396–401.
17. Риженко, В.П. Лікувально-профілактичні заходи при гострому перебігу фузобактеріозу великої рогатої худоби [Текст] / В.П. Риженко [та ін.] // Вет. біотехнологія : бюл. – 2005. – Вип. 6. – С. 158–164.
18. Риженко, В.П. Біотичні відносини Fusobacterium necrophorum із асоціаціями аеробних мікроорганізмів [Текст] / В.П. Риженко [та ін.] // Вет. біотехнологія : бюл. – 2009. – Вип. 14. – С. 278–285.

THE ETHIOPATHOLOGICAL PECULIARITIES OF MICROBIOCENOSIS FORMING AT ANIMAL NECROBACTERIOSIS

Gorbatiuk O.I., Zhovnir A.M., Andrijashiuk V.O., Rudoi O.V., Mazigula T.O.

Institute of Veterinary Medicine of NAAN of Ukraine, Kyiv

The peculiarities of epizootic process during complicated course of pig necrobacteriosis was shown. It was shown the spectrum of species microbiologic associations and the influence of inoculated monocultures of necrophorum, associants and their microbiocenosis onto the course of the disease of rabbits.