

УДК 619:579.843.95:636.934.57

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент
Каяк Ю.А., аспирант
Толяронок Г.Е., кандидат ветеринарных наук, доцент
Андрусевич А.С., кандидат ветеринарных наук, доцент

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

ВЫДЕЛЕНИЕ ШТАММОВ ПАСТЕРЕЛЛ ИЗ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НОРОК, ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И СЕЛЕКЦИЯ

Резюме

В статье приведены результаты анализа заболеваемости пастереллезом, выделения пастерелл из образцов биологического материала, селекции штаммов.

Ключевые слова: пастереллез, норки, бактерии, *Pasteurella multocida*, серовар, свойства, патогенность, стабильность, штаммы.

Summary

The article shows the results of the analysis of the incidence of pasteurellosis, the isolation of pasteurellas from samples of biological material, and the selection of strains.

Keywords: pasteurellosis, minks, bacteria, *Pasteurella multocida*, serovar, properties, pathogenicity, stability, strains.

Поступила в редакцию 07.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

Пастереллез – контагиозная инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом и отеками в различных областях тела, а при подостром и хроническом течении – гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, иногда маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом. Основной возбудитель пастереллеза – *Pasteurella multocida*.

К пастереллезу восприимчивы все виды животных и птиц в любом возрасте, однако молодняк более чувствителен. Эпизоотические вспышки с острым течением болезни регистрируется как у молодняка, так и у взрослых животных.

Источником инфекции являются больные животные и клинически здоровые бактерионосители. Бактерионосительство обуславливает стационарность инфекции.

У пушных зверей (чаще норок, песцов, лисиц) к пастереллезу более восприимчив молодняк 2–5-месячного возраста. Болезнь обычно протекает в виде энзоотий

со значительной смертностью. На зверофермы возбудитель заносится с зараженными мясом и субпродуктами. Возможно заражение аэрогенно и через воду, инфицированную пометом синантропных птиц.

У пушных зверей инфекция, обусловленная *P. multocida*, при первичном заносе протекает с коротким инкубационным периодом и высокой смертностью. Проявляется признаками септицемии, рвотой, поносом, судорогами, пенными выделениями из носа и ротовой полости.

При повторных вспышках пастереллеза показатели заболеваемости и смертности снижаются.

При ассоциативном течении пастереллеза с другими вирусными и бактериальными патогенами смертность может возрастать в 1,5–2 раза.

При селекции изолятов пастерелл чаще используют биологический метод отбора штаммов в качестве вакцинных.

Целью наших исследований было выделение от норок патогенных культур пастерелл, пригодных для конструирования биопрепаратов (вакцин).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций, опытно-технологического участка и вивария РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, звероводческих хозяйствах Республики Беларусь, неблагополучных по пастереллезу норок.

Изучение эпизоотической ситуации по пастереллезу в хозяйствах проводили согласно методическим указаниям по эпизоотологическому исследованию (И.А. Бакулов с соавт., 1982 г.) на основании изучения клинических признаков, результатов вскрытия павших и вынужденно убитых норок с признаками этого заболевания [1]. Были обследованы звероводческие хозяйства. С этой целью нами было подобрано 5 звероводческих хозяйств, принадлежащих ПУП «Белкоопмех»: филиал «Гродненское зверохозяйство», Молодечненское зверохозяйство, Калинковичское зверохозяйство, Барановичское зверохозяйство, Пинское зверохозяйство.

Было отобрано 168 проб патологического материала для исследований из Молодечненского, Пинского и Барановичского зверохозяйств.

Бакиследования патологического материала от павших и вынужденно убитых животных с признаками этой инфекции проводили согласно Методическим указаниям по лабораторной диагностике пастереллеза животных и птиц. Патологический материал для бакисследований отбирали от павших (не позднее 3–5 часов после гибели) или вынужденно убитых животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами [2].

Объектами исследования был патологический материал от павших норок: селезенка, легкое, кровь сердца, трахея, регионарные лимфатические узлы. Для выявления пастерелл в организме живых животных проводили отбор проб смывов со слизистых оболочек носовой полости, полости рта и глотки.

Пробы кусочков легких предварительно проверялись в полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения (присутствия) генома бактерии *Pasteurella multocida* и *Salmonella spp.* с целью установить выделяемость пастерелл и сальмонелл.

При положительных тестах в ПЦР на *P. multocida* материал подвергался бактериологическим исследованиям (34 образца патматериала).

Изучение культурально-морфологических свойств выделенных бактерий от норок проводилось на сывороточных жидких и твердых питательных средах.

Биохимические свойства чистых культур бактерий установили при идентификации пастерелл с помощью биохимического анализатора Vitek 2 COMPACT.

Серовариантную принадлежность изолятов *Pasteurella multocida* определяли с помощью ПЦР-анализа [3].

Патогенные свойства выделенных штаммов *Pasteurella multocida* определяли путем подкожного заражения белых мышей 18–20-часовой бульонной культурой в дозе 0,3 см³. За сохранностью мышей наблюдали в течение 5 суток [2, 3]. Гемолитические свойства пастерелл изучали путем посева на кровяной агар.

Отбор пастерелл для последующей селекции осуществляли только из патогенных культур. Основными критериями селекции были идентичность (соответствие свойствам пастерелл, в т.ч. серовариантная принадлежность), чистота, степень патогенности, отсутствие признаков диссоциации агаровых и бульонных культур.

Окончательное заключение о пригодности штаммов пастерелл для конструирования вакцины проводилось по отсутствию признаков диссоциации, по стабильности биологических свойств после пересевов на питательных средах (4–5 пассажей) и повторного инфицирования животных.

Патогенные штаммы *P. multocida* планировали использовать в качестве антигенного компонента для конструирования инактивированной вакцины, а также для проверки антигенной активности полученных образцов.

Для адаптации к жидкой питательной среде и отработки параметров культивирования штаммов *Pasteurella multocida* на ней использовали бульонную сердечно-мозговую среду производства Himedia, которая включала в себя 5–10 % стерильной сыворотки, 0,5 % дрожжевого экстракта. При отработке параметров культивирования применялся штамм серовара А *P. multocida*.

Для получения посевного материала бактерий раскладки 1-й генерации штамм *P. multocida* высевали на питательную среду во флакон объемом 400,0 см³. Штаммы бактерий термостатировали при температуре (+37,5±0,5) °С в течение 18 ч. По окончании культивирования проверяли чистоту раскладки.

При получении посевного материала пастерелл 2-й генерации культуру высевали в бутылки объемом 3 л с сердечно-мозговым бульоном и 5–10 % стерильной сыворотки крови и 0,5 % дрожжевого экстракта. Перед их постановкой в термостат содержимое бутылей перемешивали и выращивали при температуре (+37±0,5) °С в течение 16–18 ч. По окончании термостатирования проверяли чистоту культуры.

В реактор со стерильной подогретой жидкой сердечно-мозговой средой производства «Нimedia» с добавлением 5%-ной стерильной сывороткой крови вносили посевной материал 2-й генерации (10 % по объему).

Подключали систему подачи источников питания и поддержания рН (6,8–7,4) среды, состоящую из двух емкостей с 40%-ным стерильным раствором глюкозы и 20%-ным раствором калия гидроокиси.

Для обеспечения максимальной выхода биомассы пастерелл в реакторе Bioflo 5000 культуры выращивали в течение 10–12 ч при температуре (+37±1) °С при непрерывном перемешивании, начиная со 2 часа, и аэрации (подача стерильного воздуха). В процессе культивирования отбирали пробы бульонной суспензии через каждый 1 час для определения концентрации микробных клеток по оптической плотности.

Поддержание аэрации проводилось путем изменения подачи стерильного воздуха и скорости вращения мешалки в режиме удержания парциального содержания кислорода в среде в пределах 10–30 %. Для предотвращения избыточной аэрации и образования пены в значительном количестве на поверхности среды в первый час роста подачу воздуха не делали, работала только мешалка, иначе возможно было торможение роста бактерий. По показателю еН корректировки не проводилось.

По окончании процесса в выросших культурах определили концентрацию биомассы по оптической плотности с помо-

щью денситометра по МакФарланду (в перерасчете – млрд микробных клеток на 1 мл суспензии).

Проверяли чистоту выросшей культуры после окраски по Флуку (Граму) по однотипности морфологии бактерий в поле зрения микроскопа, а также на отсутствие конгломерации (комкования, слипания бактерий в поле зрения микроскопа).

Затем при постоянном перемешивании для инактивации бактериальной взвеси пастерелл добавляли формалин в конечной концентрации в среде 0,3 %.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

У норок в обследуемых звероводческих хозяйствах болезнь, обусловленная *P. multocida*, проявлялась признаками септицемии, рвоты, поноса, судорог, пенистых выделений из носа и ротовой полости и протекала со значительной смертностью.

Клинические признаки отмечались в виде резкого угнетения животных, шаткости походки, лихорадки, отсутствия аппетита, иногда со рвотой и поносом с примесью крови, судорог, с пенистым выделением из носа и ротовой полости. Обычно звери погибали во время припадка.

Болезнь у молодых животных длилась от 12 ч до 2–3 суток. Летальность достигала 6 %, а в случае жары – 10,8 %.

Выраженной сезонности легочных заболеваний у норок не отмечалось. Однако молодняк норок 3–4-недельного возраста был наиболее уязвимым к простудным заболеваниям весной, когда еще не сформировался теплый подшерсток, особенно если в пометах кормящие мамы были неспокойные (не согревали малышей, убежали от них).

Взрослые животные болели реже молодняка. Чаще отмечалось хроническое течение болезни.

Болезнь усугублялась летом, во время жары, и отход зверей был более массовым, при этом чаще в это время, как правило, погибали самые крупные зверьки.

При патологоанатомическом вскрытии во внутренних органах павших норок отмечали точечные кровоизлияния, отек и воспаление легких, увеличение и дряблость печени, набухание селезенки, иногда студенистую отечность подкожной клетчатки в области головы.

При бактериологическом исследовании в первичных посевах из числа выросших на агаре колоний отбирали отдельные, с морфологией, характерной для пастерелл, – круглые, блестящие, серо-белого цвета, без кишечного запаха.

Процент выделения пастерелл от пушных зверей в возрасте от 4 до 7 месяцев в пяти обследованных хозяйствах составлял от 14 до 26 % с учетом данных в ПЦР.

При бактериологическом исследовании патологического материала от 35 павших норок установлено, что из выделенных культур микроорганизмов к *P. multocida* было отнесено 37 % (13 изолятов). В 15 случаях в ПЦР установлен геном *Salmonella spp.* (43 %).

При этом в ряде случаев (в Барановичском, Пинском, Молодеченском, Бобруйском зверохозяйстве) одновременно изолировался возбудитель аэромоноза рыб как фактор бактерионосительства (не менее 50 % случаев). Выделение аэромоносов прекращалось после отмены в рационе зверей рыбных полуфабрикатов.

Выделенные чистые культуры бактерий по биохимическим свойствам идентифицированы с помощью анализатора Vittek 2 как *Pasteurella multocida*.

При обнаружении возбудителей других видов (типажей) их идентификацию не проводили из-за носительства, обусловленного особенностями кормовых рационов зверей.

Серовариантная принадлежность изолятов *Pasteurella multocida* подтверждалась с помощью ПЦР-анализа. Выделенные изоляты *Pasteurella multocida* идентифицированы в 9 случаях как серовариант А, в 3 случаях – как серовариант В. Одна культура *P. multocida* отнесена к сероварианту Д.

При подтверждении принадлежности в ПЦР обнаруживался геном *Pasteurella multocida*.

Изоляты *P. multocida* сероваров А, В и Д были патогенны (77 %) для лабораторных животных. Белые мыши погибали в течение 5 дней (срок наблюдения).

На агаровых питательных средах наблюдался рост только S-типов и M-типов колоний. R-форм колоний при этом не обнаруживалось, т.е. отсутствовали признаки диссоциации культур. У изолятов *Pasteurella multocida* сероваров В чаще регистрировались S-типы колоний.

После биопробы из внутренних органов норок (кровь сердца, легкие, печень) реизолировались исходные культуры.

У изолятов *Pasteurella multocida* сероваров А, В, Д гемолитическая активность отсутствовала (не было зон просветления на кровяном агаре).

Полученные культуры *Pasteurella multocida* после 4-5 пассажей и хранения в лабораторных условиях были стабильны и сохраняли свои первоначальные биологические свойства.

При изготовлении из них антигенов для реакции агглютинации в суспензиях агаровых культур отсутствовали признаки самоагглютинации.

Пастереллы успешно адаптировались к жидкой бульонной сердечно-мозговой среде с добавлением стерильной сыворотки крови крупного рогатого скота и дрожжевого экстракта.

Выросшие при культивировании в жидкой питательной среде в реакторе в течение 10–12 ч бактерии давали выход биомассы с концентрацией от 3,0 до 4,0 млрд микробных клеток на 1,0 см³ суспензии.

После окраски по Граму была проверена чистота выросшей культуры. По отсутствию комкования реакторной культуры исключена конгломерация биомассы, нежелательная при реакторном культивировании, изготовлении вакцин из них и дальнейшем хранении биопрепаратов.

Морфологические и биологические свойства реакторных культур не изменились в процессе пересевов и не отличались от исходных культур выделенных пастерелл.

ВЫВОДЫ

1. На основании проведенных исследований установлено, что в обследованных хозяйствах возбудитель пастереллеза выявлен в 14–26 % случаев. Заболеваемость пастереллезом регистрировалась в пределах 5–11 % поголовья.

2. Патогенные изоляты *P. multocida* сероваров А и В являлись определяющими в эпизоотическом плане, так как они встречаются более часто. Подобранные и селекционированные штаммы *Pasteurella multocida* обладали стабильными биологическими и антигенными свойствами.

3. Основными критериями при селекции были идентичность (соответствие

свойствам пастерелл, в т.ч. серовариантная принадлежность), его чистота, степень патогенности, отсутствие признаков диссоциации, самоагглютинации и агрегации агаровых и бульонных культур.

4. Выход биомассы пастерелл в реакторной культуре являлся достаточным при изготовлении (конструировании) вакцины с участием пастереллезного компонента.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Методические указания по эпизоотологическому исследованию / М-во сел. хоз-ва СССР, ВНИИ вет. вирусологии и микробиологии, Всесоюз. ин-т эксперим. ветеринарии [сост. : И. А. Бакулов и др.]. – М. : Колос, 1982. – 17 с.
2. Методические указания по лабораторной диагностике пастереллеза животных и птиц / Г. Е. Толяронок [и др.]. – Минск, 2009. – 19 с.
3. Методические указания по диагностике и системе мер борьбы с пастереллезом свиней / А. Ю. Финогенов. – Минск, 2011. – 17 с.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ПОЛИКОКС

ДЛЯ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА И ОВЕЦ

противококцидиозное
средство

содержит
диклазурил, фумаровую кислоту

не вызывает
осложнений
и побочных
явлений

применяют в целях лечения и
профилактики протозойных
болезней, вызванных эймериями
и криптоспоридиями



WWW.BIEVM.BY