

УДК 616.981.45:59

**КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ
СВОЙСТВА ШТАММОВ PASTEURELLA MULTOCIDA,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И САЙГИ****Алиева А.Б., Далбаев Н.К., Кайсенов Д.Н., Зинина Н.Н., Еспембетов Б.А.,
Баракбаев К.Б., Сансызбай А.Р.***РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
(НИИПББ) КН МОН РК, Гвардейский, e-mail: alina_beisenovna@mail.ru*

В статье представлены результаты исследований по изучению вирулентности, культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных от крупного рогатого скота и сайги. С целью освежения выделенных штаммов и повышения их вирулентных свойств проводили последовательные пассажи через организм белых мышей. По результатам экспериментов установлено сокращение срока гибели мышей после заражения культурами пастерелл, что доказывает повышение их вирулентности. При изучении культурально-морфологических свойств чистые культуры пастерелл выращивали на питательных средах при 37°C в течение 18-24 ч. Для полного подтверждения полученных данных использовали биохимический тест. Испытуемые культуры, выделенные из патологического материала крупного рогатого скота и сайгака, обладают культуральными, биохимическими и биологическими свойствами, характерными для вида *Pasteurella multocida* и образуют колонии S-формы. Выделенные культуры *Pasteurella multocida* могут быть использованы для оценки иммуногенности существующих вакцин и применения их в качестве основы для разработки рекомбинантных вакцин.

Ключевые слова: *Pasteurella multocida*, вирулентность, пассаж, культурально-морфологические, биохимические

**CULTURE-MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES
OF PASTEURELLA MULTOCIDA STRAINS ISOLATED FROM CATTLE AND SAIGA****Aliyeva A.B., Dalbayev N.K., Kaissenov D.N., Zinina N.N., Yespembetov B.A.,
Barakbayev K.B., Sansyzbai A.R.***Research Institute for biological safety problems (RIBSP), Gvardeyskiy, e-mail: alina_beisenovna@mail.ru*

The article presents the results of research on the study of virulence, cultural-morphological and biochemical properties of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and saiga. In order to refresh the isolated strains and improve their virulent conducted successive passages through the body of white mice. According to the results of experiments established the shortening of the death of mice after infection with *Pasteurella* cultures, which proves increasing their virulence. When studying the cultural-morphological properties *Pasteurella* grown pure cultures on nutrient media at 37°C for 18-24 h. To fully confirm the data obtained using a biochemical test. The test cultures isolated from pathological material in cattle and of saiga have cultural, biochemical and biological properties characteristic of type *Pasteurella multocida* and form colonies of S-shape. The isolated *Pasteurella multocida* cultures may be used to evaluate the immunogenicity of existing vaccines and their use as a basis for the development of recombinant vaccines.

Keywords: *Pasteurella multocida*, virulence, passage, culture-morphological, biochemical

Одной из главных проблем, препятствующих росту поголовья домашних животных и птиц, являются инфекционные заболевания, в частности пастереллезы [4]. Пастереллез – широко распространенная высококонтагиозная инфекционная болезнь многих видов домашних и диких животных, сопровождающаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением и отеком легких, плевритом, отеками в различных частях тела, а при подостром и хроническом течении гнойно-некротизирующей пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом и энтеритом.

Согласно сведениям МСХ РК за 2009-2015 гг., одной из основных причин массового падежа сайгаков в 2009-2015 гг.

являлась пастереллезная инфекция, а стабильно неблагополучными по пастереллезу являются Западно-Казахстанская, Восточно-Казахстанская и Алматинская области [5].

Научный и практический интерес к пастереллезу животных обусловлен природной очаговостью, пастереллоносительством переболевших животных, появлению не только единичных случаев заболевания, но и крупных вспышек как среди домашних, так и диких животных [1-2].

В представленной работе отражены данные по изучению культурально-морфологических и биохимических свойств эпизоотических изолятов *Pasteurella multocida*, выделенных от крупного рогатого скота и сайги. Проведенные исследования позво-

ляют оценить возможность использования полученных культур *Pasteurella multocida* как для оценки иммуногенности существующих вакцин, так и для применения их в качестве основы для разработки рекомбинантных вакцин.

Материалы и методы исследований

В опытах использовали следующие изоляты и штамм *Pasteurella multocida*:

1) изолят, выделенный из патологического материала от сайгака и освеженный на телятах в 1988 г. (получен из лаборатории коллекции микроорганизмов НИИПББ);

2) изолят, выделенный из патологического материала от крупного рогатого скота из Алматинской области в 2016 г.;

3) в качестве контроля использовали мутантный штамм *Pasteurella multocida* AgoA (Коллекционный номер/В-0050/L), полученный в 2013 г. и депонированный в музее НИИПББ.

Для освежения и повышения вирулентных свойств изучаемых изолятов проводили шесть последовательных пассажей через организм белых беспородных мышей массой 16-18 г путем заражения подкожно в область спины 18 часовой бульонной культурой, в объеме 0,5 см³.

При изучении культурально-морфологических свойств выделенных чистых культур штаммов *Pasteurella multocida* использовали питательные среды ВНІА (Brain heart infusion agar) и ВНІВ (Brain heart infusion broth). Посевной материал инкубировали в биологических пробирках и чашках Петри при 37 °С в течение 18-24 ч.

Морфологию клеток определяли путем световой микроскопии, мазки-отпечатки окрашивали по методу Грама. Биохимические свойства пастерелл изучали методом их гликолитической активности путем высева на средах Гисса с использованием различных углеводов и последующим инкубированием при 37 °С в течение 24 ч. О ферментации углеводов судили по изменению окраски среды.

Каталазный тест проводили путем смешивания на предметных стеклах, нанося каплю раствора ката-

лазы на бакмассу. Образование пузырьков газа отмечали как положительный результат.

Для полного подтверждения полученных данных проводили биохимический тест с использованием набора ЭНТЕРО-Рапид 24 (Чехия), для постановки теста использовали суточную культуру вышеуказанных образцов, выращенных на ВНІА. Учет результатов проводили, используя цветную шкалу набора по окрашиванию проб в лунках.

Результаты исследования и их обсуждение

При посеве изолята *Pasteurella multocida*, выделенного от КРС на ВНІА, через 24 ч культивирования формируются круглые, выпуклые, с гладкой влажной поверхностью прозрачные и полупрозрачные колонии с ровными краями диаметром до и более 2,5 мм.

При культивировании изолята, выделенного от сайгака, через 18-24 ч инкубации наблюдается рост просвечивающих круглых, с ровными краями, гладкой поверхностью колоний слизистой консистенции, диаметром до 2 мм. В проходящем свете 24 ч культура имеет прозрачные края янтарного цвета с слегка затемненным центром. Результаты исследований представлены на рисунке.

В пробирках с жидкой питательной средой ВНІВ при выращивании изучаемых культур пастерелл во всех случаях наблюдали образование слизистого осадка, которое при встряхивании поднималось в виде характерной косички, что также свидетельствует о принадлежности к пастереллам.

По результатам проведенных исследований установлено, что существенной морфологической особенностью пастерелл являются временные различия в величине и цвете колоний, а также скорости роста на питательных средах.



а) изолят *Pasteurella multocida*, выделенный от КРС



б) изолят *Pasteurella multocida*, выделенный от сайги

Морфологические свойства колоний пастерелл, выделенных из патологического материала КРС и сайгака

Таблица 1

Исследование гликолитической активности пастерелл на средах Гисса

Углеводы/спирты	Испытанные культуры пастерелл		
	от КРС	от сайги	штамм АгоА, контроль
Маннит	+	+	+
Дульцит	-	-	-
Глюкоза	+	+	+
Лактоза	-	-	-
Сахароза	+	+	+
Инозит	+	+	+
Раффиноза	-	-	-

Примечания: 1 «+» – положительная реакция, 2 «-» – отрицательная реакция

Таблица 2

Результаты биохимического теста для идентификации *Pasteurella multocida*

Использованные тесты	Испытанные культуры пастерелл		
	От КРС	От сайги	штамм АгоА, контроль
1	2	3	4
Indole	+	+	+
Lysine	(-)	(-)	(-)
Otnithine	d	d	d
Urease	(-)	(-)	(-)
Sucrose	+	+	+
Sorbitol	d	d	d
Trehalose	+	+	+
Glucose	+	+	+
Pyroglutonylamidase	(-)	(-)	(-)
Esculin	(-)	(-)	(-)
Cellobiose	(-)	(-)	(-)
Meliobiose	(-)	(-)	(-)
Salicin	(-)	(-)	(-)
Mannose	+	+	+
Maltose	(-)	(-)	(-)
Raffinose	(-)	(-)	(-)
Aceton	(-)	(-)	(-)
Phenylalanine	(-)	(-)	(-)
Malonate	(-)	(-)	(-)
β -Galactosida	d	d	d
β -Glucuronidase	(-)	(-)	(-)
α -Galactosidase	d	d	d
β -Xylosidase	d	d	d
N-acetyl- β -D-glucosaminidase	(+)	(+)	(+)

Примечания: 1 «+» – 80-100% положительная реакция, 2 «(+») – 70-79% положительная реакция, 3 «d» – вариационная реакция, 4 «(-)» – 16-30% отрицательная реакция, 5 «-» – 0-15% отрицательная реакция.

Морфология клеток пастерелл. Морфологию клеток изучали посредством световой микроскопии. По данным литературы, характерной особенностью данного микроорганизма является биполярность при окрашивании мазков [6]. В изучаемых культурах *Pasteurella multocida*, неоднократно пересеваемых на плотной питательной (ВНІА) и жидкой (ВНІВ) средах, микроб наиболее часто имеет вид коккообразной палочки,

диплококка, расположенных чаще всего отдельно, но встречались парные, групповые скопления и цепочки из коротких палочек разной длины.

При изучении вирулентных свойств испытуемых изолятов, с повышением пассажного уровня отмечали снижение сроков гибели мышей от 24 ч до 18-20 ч, при этом через 12-14 ч после заражения лабораторных животных наблюдали угнетение, уча-

щение дыхания, малоподвижность и взъерошенность волосяного покрова.

В результате вскрытия мышей обнаруживали патологические изменения во внутренних органах: легкие гиперемированы, кровоизлияния на эпикарде сердца, под серозной оболочкой печени, селезенки, геморрагическое воспаление кишечника. При микроскопии мазков-отпечатков, сделанных из крови и органов (сердца, печени, почки, селезенки) лабораторных животных экспериментально зараженных изучаемыми изолятами *Pasteurella multocida*, в поле зрения встречались граммотрицательные палочки, чаще овоидной формы. Средняя часть бактериальных клеток окрашена бледнее, чем концы. Из органов павших мышей были выделены чистые культуры пастерелл.

После восстановления вирулентных свойств пастерелл проводили эксперименты по изучению биохимических свойств путем высева в биологические пробирки на среды Гисса, постановки каталазного теста и с использованием набора ЭНТЕРО-Рапид 24. Данные по изучению гликолитической активности выделенных чистых культур *Pasteurella multocida* от КРС и сайги оценивали по изменению цвета в пробирках со средами. В качестве контроля использовали мутантный штамм *Pasteurella multocida* АгоА, полученные результаты представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о ферментации пастереллами углеводов и спиртов: маннит, глюкоза, сахароза, инозит, ксилоза, кроме пробирок содержащих дульцит, лактозу и раффинозу.

Параллельно проведенный каталазный тест показал положительный результат. Полученные результаты позволяют отнести изучаемые пастереллы к виду *Pasteurella multocida*, которые согласуются с данными В.И. Покровского [3].

На конечном этапе экспериментов проводили биохимический тест с использованием набора ЭНТЕРО-Рапид 24, результаты показаны в табл. 2.

Из данных, представленных в табл. 2, можно сделать вывод, что при биохимическом тесте с использованием набора ЭНТЕРО-Рапид 24 оба проверяемых образца

и контроль дали положительный результат на индол, сахарозу, трегалозу, глюкозу, маннозу и N-acetyl- β -D-glucosaminidase. При этом пробы были окрашены: с индолом в розовый, сахарозой – желто-зеленый, трегалозой, глюкозой, маннозой и N-acetyl- β -D-glucosaminidase – желтый цвет. Изменение цвета при проведении биохимического теста с использованием набора ЭНТЕРО-Рапид 24 свидетельствует о положительной реакции, что является маркерным признаком для *Pasteurella multocida* [7].

Заключение

Пастереллы, изолированные из патологического материала от КРС и сайги, после шести последовательных пассажей на лабораторных животных вызывают гибель через 18-20 ч, что доказывает их высокую вирулентность.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод, что чистые культуры *Pasteurella multocida*, выделенные из патологического материала крупного рогатого скота и сайгака, образуют колонии S-формы и позволяют отнести их к роду *Pasteurella*, виду *Pasteurella multocida*.

Выделенные культуры *Pasteurella multocida* могут быть использованы для оценки иммуногенности существующих вакцин и применения их в качестве основы для разработки рекомбинантных вакцин.

Список литературы

1. Буткин И.Е., Юдаев А.П. Изучение свойств эпизоотических и вакцинных штаммов пастерелл // Ветеринария. – 1972. – № 8. – С. 56–57.
2. Шеедевич Э.А. Состояние и перспективы изучения пастереллезов сельскохозяйственных животных // Труды ВИЭВ. – 1984. – Т. 60. – С. 58.
3. Покровский В.И. Медицинская микробиология. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – С. 26–28.
4. Серикказинов О.Б., Мержакып М.К., Сабырова А.К., Байгазанов А.Н., Нуркенова М.К. Пастереллез крупного рогатого скота. – Государственный университет имени Шакарима города Семей, Казахстан, С. 46–49.
5. <http://mgov.kz/ministerstvo/komitety/>
6. Namioka S., Murata M. Antigenic analysis of cultures isolated from various animals // Cornell Vet., – 1961. – V. 51. – No.4. – P. 522–528.
7. Tefera G., Smola J. The utility of the ENTERO Rapid 24 kit for the identification of *P. multocida* and *M. hemolytica* // Vet. Med. – Czech, 2002. (4). – P. 99–103.