

Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

Заключение. При проведении токсикометрических исследований препарата «Аесел» на белых крысах и мышях было установлено, что LD₅₀ препарата по чистому селену, рассчитанная по методу Першина, для крыс при парэнтеральном введении равна 5,48, при энтеральном введении – 39, для мышей при парэнтеральном введении – 7,72 мг/кг. LD₅₀ препарата, рассчитанная по всем составляющим компонентам, оказалась равной 39000 мг/кг. Следовательно, по ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к незначительно опасным веществам.

Литература. 1. Кучинский, М.П. Биоэлементы – фактор здоровья и продуктивности животных: монография/ М.П. Кучинский. – Минск: Бизнесофсет, 2007. – 372с. 2. Ветеринарная токсикология: Учебное пособие/О.А. Малинин [и др.]/ Корсунь-Шевченковский: ЧП Майдаченко, 2002. – 464с. 3. Клінічна ветеринарна фармакологія/О.І. Канюка, В.Р. Файтельберг-Бланк, Ю.П. Лизогуб [и др.]/Навчальний посібник за редакцією О.І. Канюки. – Одесса: «Астропринт», 2006. – 296с. С.109 4. Виноградов, В.Н. Обмен веществ и продуктивность коров при скормливанні концентратов с органической формой селена/ В.Н. Виноградов, Ю.А. Кузнецов, Я.М. Бадалов. Доклады Российской Академии сельскохозяйственных наук, 2003. - 6:29-31. 5. Cummins LM, Kimura ET. Safety evaluation of selenium sulfide antidandruff shampoos/ Toxicol Appl Pharmacol. - 1971. - 20:89-96. 6. Olson OE. Selenium toxicity in animals with emphasis on man/ J Am Coll Toxicol. - 1986. - 5:45-70. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy // Lancet. — 1984. — P.1396-98. 7. Кузьмич Р.Г., Бобрик Д.И., Саватеев А.В. Перекисное окисление липидов и система антиоксидантной защиты организма животных//Мн., 2004. –75с. 8. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. – Справочник / И.П. Кондрахин [и др.]; под ред. И.П. Кондрахина. – М.: Колос, 2004. – 520с. 9. Методы первичной токсикологической оценки химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии/А.Э. Высоцкий, Д.А. Гирис, М.П. Кучинский, А.А. Богущ, А.Ю.Фенюгенов// Экология и мир животных: международный научно-практический журнал. – Минск, 2007. – №2. – С.19-27 10. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии/А.Э. Высоцкий, М.П. Кучинский, Б.Я. Бирман [и др.]/ Утверждены начальником главного управления ветеринарии с Государственной ветеринарной и Государственной продовольственной инспекциями Минсельхозпрода Республики Беларусь А.И. Конон. – Минск, 2007. – 156с. 11. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ/ Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева.-изд. 2-е доп. и перераб.- М.: «Медицина», 2005.- 832с.

УДК 619:579.22-843.95:636.93

РЕЗУЛЬТАТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ПАСТЕРЕЛЛ ОТ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ, ИЗУЧЕНИЕ ИХ КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ СЕРОВАРИАНТНОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Бирман Б.Я., Андрусевич А.С.

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

В данной статье приводятся результаты выделения от пушных зверей пастерелл на основании изучения их культурально-морфологических, биохимических свойств и определение серовариантной принадлежности.

In given article results of allocation from fur animals pasteurill on the basis of studying of their kulturalno-morphological, biochemical properties and definition of a specific accessory are resulted.

ВВЕДЕНИЕ. Важное место в ветеринарных мероприятиях по борьбе с пастереллезом молодняка пушных зверей занимает специфическая профилактика на основе точно проведенных диагностических исследований.

В настоящее время диагностика пастереллеза пушных зверей в Республике Беларусь основана на проведении бактериологических исследований, по результатам которых проводятся профилактические мероприятия. Однако высокий уровень заболеваемости, отход щенков и низкая выделяемость возбудителя пастереллеза из патологического материала павших зверей свидетельствуют о ее недостаточной эффективности.

Кроме того, вследствие отсутствия коммерческих антисывороток, в большинстве случаев не проводится определение серовариантной принадлежности выделенных штаммов пастерелл, что сказывается на эффективности вакцинопрофилактики этой болезни.

Таким образом, целью наших исследований было изучение культурально-морфологических, биохимических свойств пастерелл, выделенных от пушных зверей, и определение их серовариантной принадлежности с целью конструирования инактивированной вакцины против пастереллеза пушных зверей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Работа выполнялась в отделе болезней птиц, пчел, рыб и пушных зверей, отделе бактериальных инфекций, виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского».

Выделение и идентификацию культур пастерелл проводили согласно методическим рекомендациям по диагностике, профилактике и мерам борьбы с пастереллезом сельскохозяйственных животных (1999). Для этого делали посеvy патологического материала на МПБ и МПА, бульон и агар Хоттингера (рН от 6 до 8,5, оптимальный – 7,2 - 7,4) с добавлением 10% стерильной нормальной сыворотки крови лошади, 5 - 10% глюкозы. Экссудат из грудной полости засеивали на плотные питательные среды, без предварительной обработки.

Посевы на плотных и жидких питательных средах инкубировали в аэробных условиях в термостате при температуре 37⁰С в течение 24 - 48 часов. При отсутствии роста на питательных средах посеvy выдерживали в термостате до 4 - 5 суток при ежедневном просмотре.

Микроскопию мазков, приготовленных из бульонных и агаровых культур и окрашенных по Грамму, проводили с помощью светового микроскопа при увеличении x 90.

О принадлежности выделенных культур к пастереллам судили по биохимическим свойствам, используя

Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

набор сред с глюкозой, галактозой, сахарозой, рафинозой, мальтозой, ксилозой, арабинозой, дульцитом, лактозой, маннитом и сорбитом.

Определение патогенности выделенных культур пастерелл проводили на белых мышах.

С этой целью использовали агаровые культуры, выращенные на скошенном МПА или агаре Хоттингера. Культуры пастерелл пассировали (1 раз в 3 месяца) через организм белых мышей, клонировали и изолировали типичные колонии S-формы на кровяном агаре и пересевали на бульон Хоттингера. С каждой выделенной культуры готовили смывы стерильным физиологическим раствором, устанавливали взвесь бактерий в концентрации 1 млрд. микробных тел в 1 мл и заражали три-четыре белые мыши массой 16-18 г подкожно в дозе 0,3 мл. Гибель белых мышей учитывали через 24, 48 и 72 часа после заражения. Из патологического материала от павших мышей делали высевы на питательные среды с целью реизоляции исходной культуры пастерелл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. Патологический материал отбирали согласно правилам от павших (не позднее 3-5 часов после гибели) или вынужденно убитых животных, не подвергавшихся лечению антибактериальными препаратами. Взятие и доставку материала осуществляли в соответствии с действующими правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования. Трупы животных отбирали целиком.

Посевы делали из легкого, сердца, селезенки, печени и костного мозга. При необходимости посевы производили из регионарных лимфоузлов (бронхиальных, средостенных), головного мозга. При поражении легкого посев осуществляли с границы измененной и нормальной ткани.

Посевы из патологического материала проводили на МПБ и МПА с добавлением 10% нормальной сыворотки крови лошади. Выделение чистой культуры осуществляли путем пластинчатого посева (метод Дригальского) или методом биопробы. При методе Дригальского отбирали колонии из числа выросших на агаре с наиболее характерной морфологией. Делали высевы из внутренних органов (сердце, легкое, печень) погибших мышей на питательные среды и изучали выросшие культуры. При обнаружении возбудителей других видов проводили их идентификацию. Диагностику пастереллеза пушных зверей проводили по общепринятым методам в нашей модификации (рисунок 1).

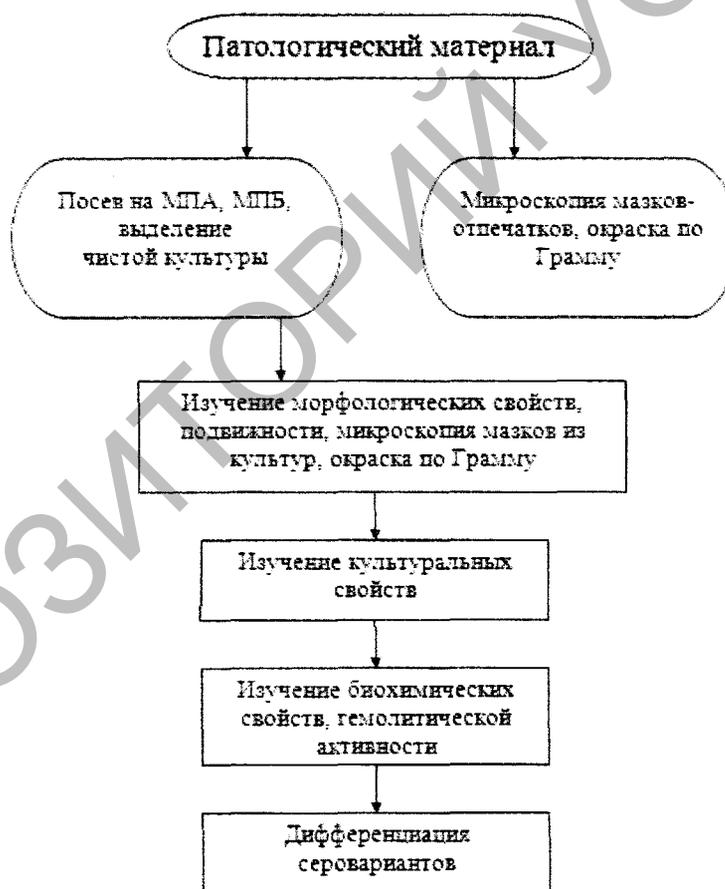


Рисунок 1- Схема диагностики пастереллеза пушных зверей

Пробирки с посевами инкубировали при 37,5⁰С в течение 24 часов. Из выросших колоний отбирали наиболее характерные для пастерелл и изучали культуральные, тинкториальные и морфологические свойства. Анализ на подвижность пастерелл проводили путем посева на полужидкий агар (ПЖА). Одновременно с посевами из каждого органа делали мазки-отпечатки, фиксировали 10-15 минут смесью равных объемов этилового спирта и эфира, окрашивали по Леффлеру и Романовскому—Гимзе и микроскопировали.

При микроскопии мазков по Грамму, сделанных из бульонных культур пастереллы имели вид мелких грамтрицательных коккоовидов. Длина их колебалась от 0,2 до 1,5 мкм, ширина - от 0,15 до 0,25 мкм. Спороброзование не отмечали (рисунок 2).

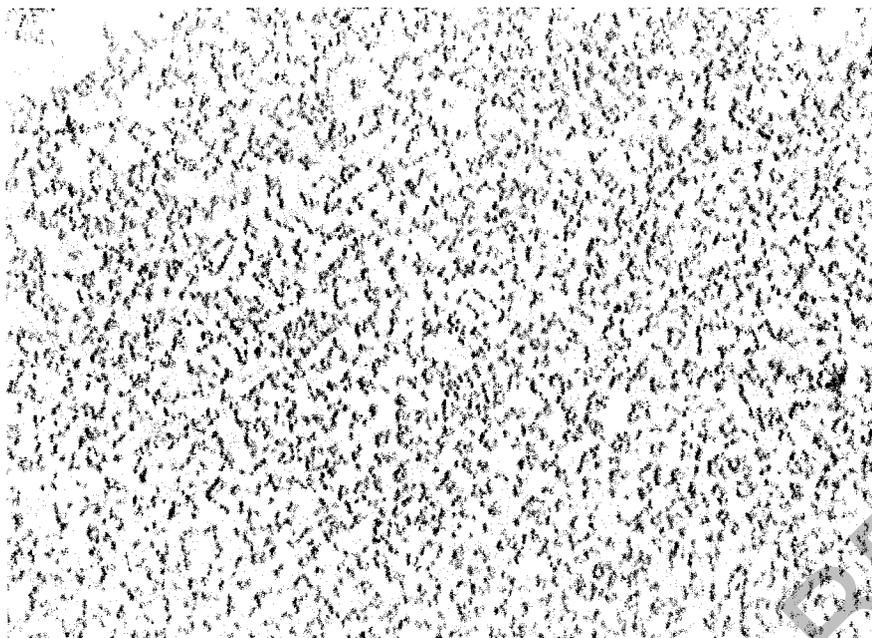


Рисунок 2. Морфология культуры возбудителя пастереллеза пушных зверей под микроскопом после окраски по Грамму

У выделенных культур изучали ферментативные свойства. Так суточную агаровую культуру высевали на среды Гисса с глюкозой, галактозой, сахарозой, раффинозой, мальтозой, ксилозой, арабинозой, дульцитом, лактозой, маннитом, сорбитом, на МПА, с молоком, желатином, на кровяной и сывороточный МПА, на МПБ с 1% нитрата калия, на среду с мочевиной. Кроме этого, учитывали выделение культурами сероводорода и индола.

На последнем этапе определили серовариантную принадлежность выделенных штаммов. Эти исследования выполняли путем постановки стафилококкового и акрифлавинового теста и биологического метода.

Результаты проведенных исследований по выделению культур пастерелл позволили сделать заключение, что пастереллез протекает у пушных зверей в виде моноинфекции, что характеризуется, в конечном счете, с протеканием заболевания в хронической или подострой форме. Выделение пастерелл у погибших пушных зверей из легочной ткани составило 100%, а из крови сердца 45%. При остром течении заболевания происходит распространение возбудителя в организме животного, поэтому культуру пастерелл выделяли из печени, селезенки, почек, головного и костного мозга. Выделение возбудителя пастереллеза из регионарных лимфатических узлов происходит при наличии патологического процесса в близлежащих органах.

Для выделения чистой культуры пастерелл заражали двух белых мышей суспензией из каждого патологического материала. Установлено, что основная гибель пары мышей происходит в течение первых трех суток и составляет 60%, в течение 3-5 суток в 33%, в срок до одной недели - 7% случаев соответственно. При этом нами было обнаружена закономерность в патогенности культур для лабораторных мышей. Малопатогенные культуры были выделены от вынужденно убитых животных с хроническим течением заболевания.

При микроскопии мазков-отпечатков из легкого и крови из сердца пушных зверей обнаруживали клетки, кокко-овоидной и овоидной формы, иногда присутствовали полиморфные формы, bipolarность выражена в разной степени, капсула от слабо до четко выраженной. В мазках из суточных бульонных культур обнаруживали клетки овоидной формы, расположенные чаще всего отдельно, но встречаются парные, групповые скопления. В пересевах культур иногда встречаются цепочки разной длины. В старых культурах иногда обнаруживали палочковидные формы. В культурах хранящихся более 3-4 месяцев рост микроорганизма практически отсутствовал, при этом ослаблялись биохимические свойства.

Все выделенные нами культуры пастерелл дали примерно одинаковый рост на обычных МПА и МПБ и на сывороточном агаре. Рост в МПБ наблюдался на конец первых суток культивирования и характеризовался равномерным помутнением среды различной интенсивности. На 2-3 сутки культивирования образуется обильный осадок, иногда очень обильный, слизистого характера, редко имеет мелкохлопчатую структуру или включает небольшое количество среднехлопчатого осадка. Особенно это заметно при посеве несвежих культур, т.е. длительно культивируемых на питательных средах. При встряхивании осадок поднимается в виде муаровой ленты, обильный слизистый осадок поднимается в виде ленты или тяжа, осадок с хлопьями разбивается.

Результаты проведенных исследований показали, что на МПА рост культуры состоял из трех основных типов: мелких колоний, полупрозрачных, с ровными краями — S-формы; большинство колоний имели вид слившихся сероватых колоний, слизистой консистенции. Нередко рост настолько обильный, что образуются обширные студневидные колонии слизистой консистенции M-формы. Нередко старые колонии сухие, белые, шершавые, часто такие колонии образуются при дальнейших пересевах культур на обычные среды без добавления сыворотки крови - R-формы (рисунок 3).

Проведенные нами исследования показали, что чаще всего культуры пастерелл имели признаки общие для R- и S- форм - переходные формы S и R. Общее количество S-форм при первичном выделении культур на сывороточном МПА составило 3 (7,14%), M - формы 23 (54,76%), переходных форм S и R - 16 культур (38,1%). В целом, по нашему мнению, данное разделение достаточно условно, так как при культивировании легко можно найти колонии сходной какой-либо вышеописанной формы.

У всех выделенных культур был определен стандартный набор сахаролитических, протеолитических, окислительно-восстановительных и гемолитических свойств, необходимых для дифференциации вида. Из сахаров все выделенные культуры постоянно ферментировали с образованием кислоты без выделения газа глюкозу, галактозу, сахарозу, ксилозу, маннит, сорбит. Не ферментировали раффинозу, мальтозу, арабинозу, дульцит, лактозу (рисунок 4).

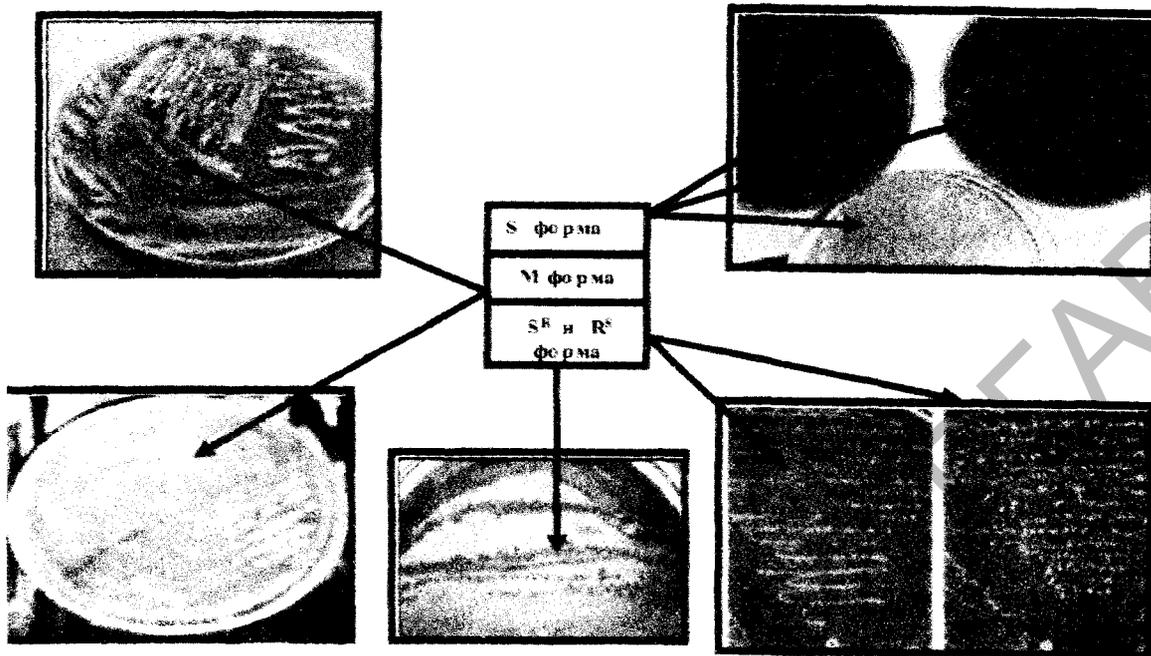


Рисунок 3. Культуральные формы *Pasteurella multocida* на плотных питательных средах

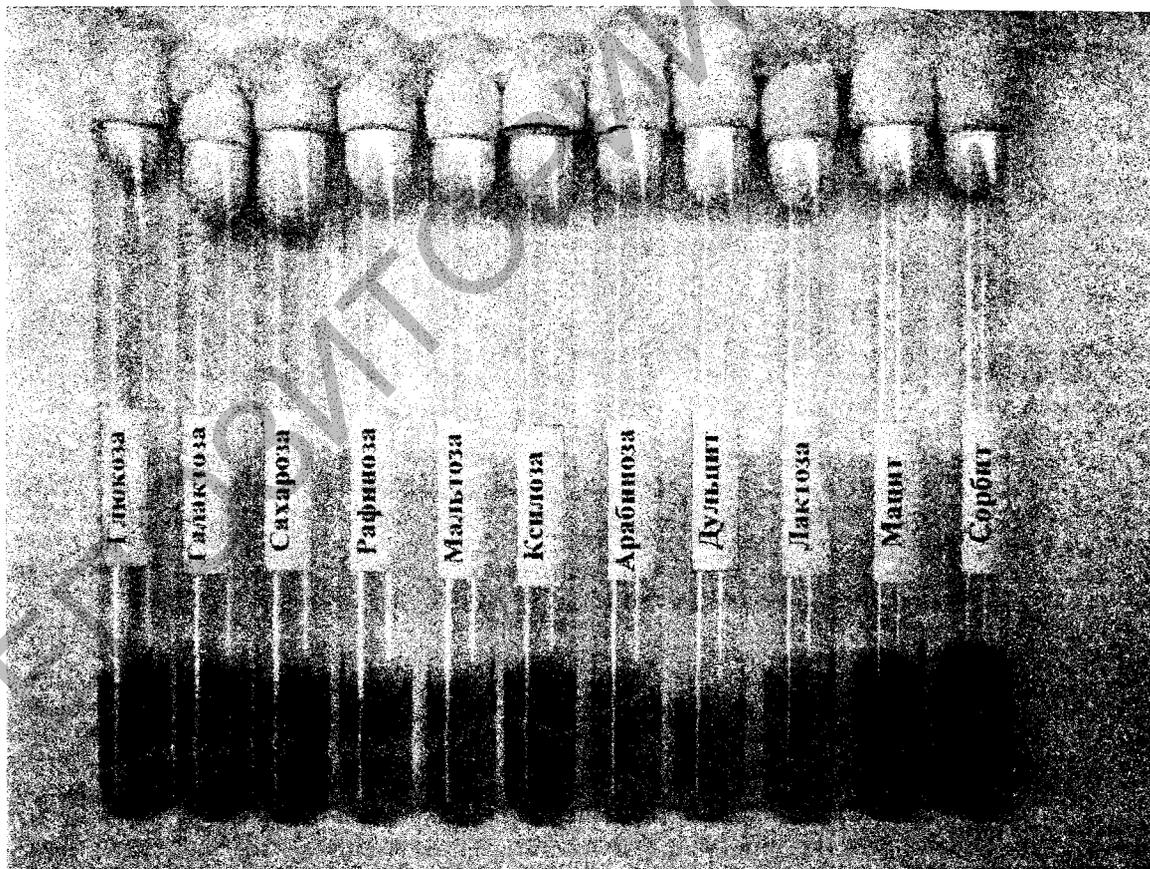


Рисунок 4. Биохимические свойства пастерелл

Протеолитические свойства культур пастерелл слабые. Культуры не свертывали молоко, не разжижали желатину, однако постоянно выделяли индол. При биохимических исследованиях нами были определены кроме стандартных свойств - образование сероводорода. Так, нами было установлено, что большинство выделенных штаммов пастерелл обладают способностью выделять сероводород, однако свойство неустойчиво и при

дальнейшем культивировании может снижаться вплоть до полного исчезновения.

Из окислительно-восстановительных свойств для пастерелл характерна редукция нитратов до нитритов, отрицательная уреазная активность, гемолитическая активность отсутствует. В целом в биохимическом отношении *Pasteurella multocida* малоактивна.

Результаты наших исследований показали, что все выделенные культуры пастерелл относятся к виду *Pasteurella multocida*, который в своем составе неоднородный. Разделение вида на подвида (*multocida*, *septica*, *gallicida*) основано на его биохимических показателях, а именно ферментации сорбита и дульцита, что по нашему мнению не имеет сколько-нибудь значимой практической ценности. Большую практическую значимость имеет определение серологических вариантов по антигенам, вызывающим иммунный ответ у животных. Наличие четырех серологических и иммунологических вариантов возбудителя - *Pasteurella multocida* является основным препятствием при отборе штаммов для изготовления биологических препаратов против этого заболевания.

У всех выделенных нами культур было проведено определение серовариантного состава путем постановки стафилококкового и акрифлавинового теста, а также биологического метода. Так как в акрифлавиновом тесте определяли только серовариант D, а в стафилококковом тесте только серовариант A, биологическим методом при отсутствии положительных результатов в обоих тестах устанавливали серовариант B. При нечетко выраженной положительной реакции в акрифлавиновом тесте считали культуру смешанного серовариантного состава, так называемые диссоциированные культуры. При этом следует учитывать, что для типизации лучше использовать культуры, выращенные на средах с добавлением сыворотки крови лошади или при выделении культуры в биопробе. Результаты исследований представлены на объемно-математической модели (рисунок 5).

Из рисунка 5 видно, что всего из 48 выделенных культур *Pasteurella multocida* к сероварианту B было отнесено 18 (37,5%), к сероварианту A - 21 (43,75%), сероварианту D 2 (4,17%). Оставшиеся 7 культур (14,58%) были отнесены к диссоциированным. При этом установлено, что острому течению заболевания соответствуют серовариант B, при подостром и хроническом течении остальные сероварианты A, D и смешанные. Следовательно, для более эффективной профилактики пастереллеза у пушных зверей необходимо, чтобы вакцина содержала антигены двух наиболее важных в эпизоотическом отношении серовариантов пастерелл, которые наиболее часто циркулируют среди зверопоголовья.

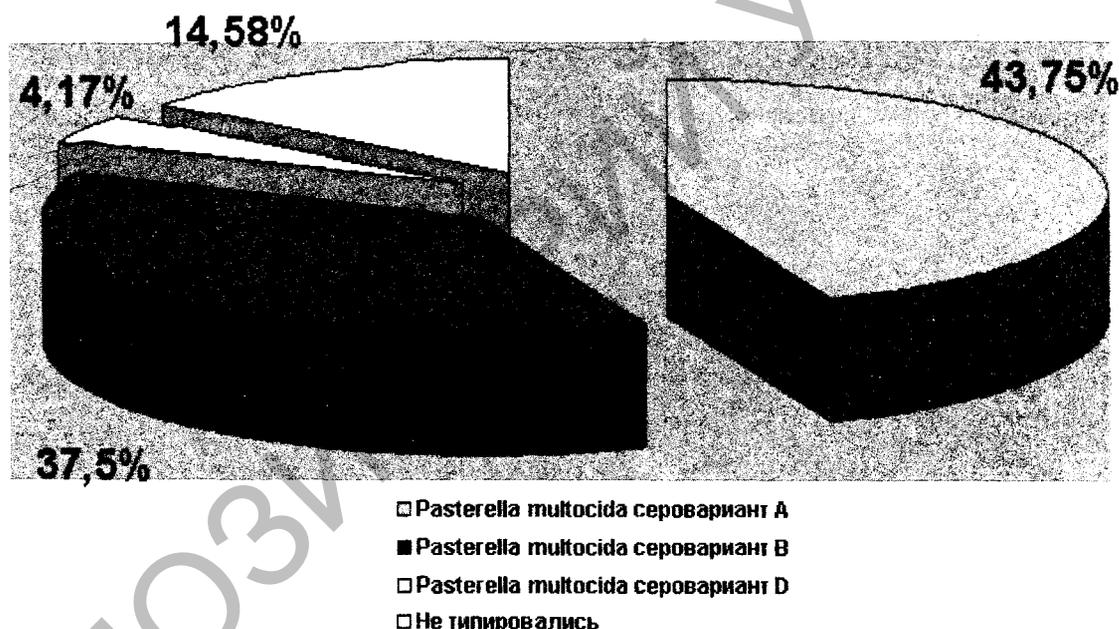


Рисунок 5. Распространение серовариантов *Pasteurella multocida*, выделенных от пушных зверей в звероводческих хозяйствах Республики Беларусь

Анализируя данные литературы, мы пришли к заключению, что многие авторы говорят о снижении иммуногенных свойств пастерелл при длительном культивировании их на искусственных питательных средах, но для изготовления и контроля средств специфической профилактики пастереллеза – вакцин – необходимы биологически активные и специфические штаммы *Pasteurella multocida*. Поэтому одной из задач наших исследований было селекционирование популяций штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных от пушных зверей, отличающихся стабильными свойствами.

Для этого из культур каждого сероварианта отивали по 10 колоний в одну пробирку с МПБ и инкубировали в течение 18 - 24 часов при температуре 37°C в термостате. Затем проверяли культуры на однородность, высевали на МПА в чашках Петри и инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C. По истечении указанного срока инкубации колонии просматривали в косо проходящем пучке света и отивали на МПБ по 8 – 10 колоний типичных S – форм. Селекцию проводили пятикратно до получения однородной популяции по характеру свечения. Популяции, выделенные из серовариантов A и B *Pasteurella multocida* и состоящие из однородных по морфологии и характеру свечения колоний, разделили на две части. Одну часть популяции подвергли периодическим пассажам на питательных средах, а вторую часть хранили в лабораторных условиях в течение 4 – 6 месяцев.

Результаты наших исследований показали, что полученные культуры пастерелл после многократных пассажей и хранения в лабораторных условиях в течение 5 месяцев стойко сохраняли свои первоначальные свойства. Полученные штаммы серологических вариантов А и В *Pasteurella multocida* на агаре формировали равномерно выпуклые, гомогенные, мелкозернистые с ровными краями колонии, которые давали яркое свечение с флюоресцирующим отливом. Таким образом, селекционированные популяции существенно не отличались от исходной культуры, из которой они были получены. Более того, они не теряли своих вирулентных свойств. С этой целью использовали серийные разведения суточных агаровых культур селекционированных культур из серовариантов А и В, которые вводили белым мышам подкожно в область спины в объеме 0,5 мл.

Результаты наших исследований показали, что значение LD_{100} для селекционированной популяции сероварианта В 10^9 , А 10^4 .

При изучении иммуногенных свойств селекционированных культур нами было установлено, что коэффициент иммунологической эффективности для сероварианта А составил 68,0%; В – 72,2%.

На основании этих данных можно сделать заключение, что методом селекции нами были отобраны культуры *Pasteurella multocida* серовариантов А и В обладающие высокими вирулентными свойствами, которые зарегистрированы в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» под названием штамм *Pasteurella multocida* серовариант А (КМИЭВ-67) – штамм - антиген, штамм *Pasteurella multocida* серовариант В (КМИЭВ-68) – штамм - антиген. На указанные штаммы были поданы заявки в Национальный центр интеллектуальной собственности при Совете Министров Республики Беларусь на патенты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. 1. В результате проведения бактериологических исследований патологического материала, полученного от пушных зверей, были выделены чистые культуры, на основании культурально-морфологических и биохимических свойств, отнесены нами к *Pasteurella multocida*.

2. При серотипизации установленные культуры *Pasteurella multocida* отнесены к серовариантам А, В и D.

3. Для проведения селекции были отобраны наиболее важные в эпизоотическом отношении сероварианты А и В *Pasteurella multocida*.

4. Селекционированные штаммы серовариантов А и В *Pasteurella multocida* имели стабильные свойства для каждого сероварианта пастерелл, что дало основание паспортизировать их в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и подать заявки в Национальный центр интеллектуальной собственности при Совете Министров Республики Беларусь на патенты.

ЛИТЕРАТУРА. 1. Агаева, Э.М. Серологические варианты пастерелл, выделенных от разных видов животных. /Э.М. Агаева, М.А. Сидорова, // Бюллетень Всесоюзного ордена Ленина научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко., вып. 45, с.3-5. 2. Антонов, Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии (Бактериально-альные инфекции)/Б.И. Антонов. - М.: «Агропромиздат», 1986. - 352 с. 3. Кадымов, Р.А. Серотипизация штаммов пастерелл, выделенных от нутрий при смешанных инфекциях. / Р.А. Кадымов, Г.Э. Дулямалиев, СИ. Ганифаева // Пробл. и перспективы паразитологии. - Харьков; Луганск, 1997. - с. 76-77. 4. Краткий определитель бактерий Берги/ Перевод с английского М.Ш. Терказарьяна. Под редакцией Г.А. Заварзина. - М.: Мир, 1980. - 321 с. 5. Шегидевич Э.А. Идентификация *Pasteurella multocida* сероварианта D // Ветеринария. – 1985. - №6. – С. 63.

УДК 619:616-02:579.843.95:636.93

ЭПИЗОТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ПАСТЕРЕЛЛЕЗУ ПУШНЫХ ЗВЕРЕЙ В ЗВЕРОВОДСКИХ ХОЗЯЙСТВАХ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Бирман Б.Я., Андрусевич А.С.

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

В данной статье речь идет об эпизоотической ситуации по пастереллезу пушных зверей в звероводческих хозяйствах Республики Беларусь, приведены результаты изучения этиологической роли пастерелл в структуре бактериальных инфекций пушных зверей.

In given article it is a question of a situation on pasteurellosis fur animals in animals economy of Byelorussia, results of studying a role aetiology pasteurell in structure of bacterial infections of fur animals are resultted.

ВВЕДЕНИЕ. Актуальность инфекционных заболеваний в ветеринарной отрасли республики требует особого внимания к пушным зверям. Промышленное звероводство является перспективной отраслью народного хозяйства и базой для меховой промышленности, а также пушного экспорта. В настоящее время в республике имеется семь крупных и около двадцати средних и мелких звероводческих хозяйств, которые выращивают около 1 млн. пушных зверей. Успешное ведение звероводства возможно только при условии знания биологических особенностей, соблюдения современных технологий, приемов ветеринарной защиты.

Одним из заболеваний респираторного характера, причиняющим звероводству республики значительный экономический ущерб, является пастереллез. Пастереллез – остро протекающее инфекционное заболевание пушных зверей, вызываемое бактерией из рода пастерелл и характеризующееся септициемией и геморрагическим воспалением слизистых и серозных оболочек и органов дыхательной и пищеварительной систем.

Пастереллез пушных зверей распространен довольно широко за рубежом и в нашей стране. При острой форме заболевания в течение нескольких дней может погибнуть от 50 до 80% поголовья зверофермы. В случаях хронического течения инфекции экономические потери связаны с падежом, повышенной выбраковкой племенных зверей, ухудшением качества меха, снижением получения щенков.