

ЖОВНІР О.М., аспірант

Науковий керівник – РИЖЕНКО В.П., д-р вет. наук, професор, чл.-кор. НААНУ

Інститут ветеринарної медицини НААН України

ВИЗНАЧЕННЯ БІОТИПІВ МУЗЕЙНИХ КУЛЬТУР І ПОЛЬОВИХ ІЗОЛЯТІВ *F. necrophorum* ТА ПІДБІР ШТАМІВ ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ НЕКРОБАКТЕРІОЗУ

У статті викладено аналіз результатів досліджень з приводу типування музейних культур та польових ізолятів *F. necrophorum*, виділених від тварин, які загинули із клінічними ознаками некробактеріозу. Зважаючи на те, що підбір біотипів збудника некробактеріозу для конструювання вакцин має важливе значення, проведено визначення біотипів лабораторних штамів *F. necrophorum*. До основних диференційних ознак включено вивчення гемолітичних властивостей культур фузобактерій на кров'яному МПА. Досліджено седиментативні властивості культур фузобактерій за росту на рідкому живильному середовищі; гемаглютинаційні властивості стосовно осадження курячих еритроцитів та патогенні властивості наявних культур збудника. Враховуючи згадані властивості культур *F. necrophorum*, підбрано високовірулентні штами біотипів А і АВ для виготовлення вакцини проти некробактеріозу.

Ключові слова: біотики *F. necrophorum*, вакцина, седиментація, гемоліз, реакція гемаглютинації, вірулентність, патогенність.

Постановка проблеми. Некробактеріоз – широко розповсюджене інфекційне захворювання домашніх, диких тварин, птиці та людей, яке проявляється гнійно-некротичними ураженнями різних тканин і органів, збудником якого є *F. necrophorum* [1]. Останнім часом, у свинарській галузі спостерігається асоціативний перебіг захворювання, що вказує на необхідність створення ефективних асоційованих вакцин. Збудник некробактеріозу неоднорідний за біологічними та серологічними властивостями, тому диференціація культур *F. necrophorum* за біотипами сприяє відбору високовірулентних його штамів для створення протифузобактеріозних вакцин [2–3]. Вивченням біологічних властивостей збудника некробактеріозу науковці займаються уже тривалий період, проте до цього часу не вдалося систематизувати всі дані, тому в Україні на сьогодні не існує референтних штамів *F. necrophorum* [2–3].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Російськими вченими, зокрема Соломахою О.І. (1973, 2000), Кириловим Л.В. (2000), Сидорчуком А.А. (2006), Панасюком С.Д. (2007), на основі даних щодо біологічних властивостей культур збудника некробактеріозу, запропоновано їх поділ на 4 біотики – А, АВ, В та С. Культури *F. necrophorum* біотипу АВ займають проміжне положення між біотипами А і В та відрізняються від біотипу В ступенем вірулентності і чітко вираженими диференційними ознаками, особливо стосовно явища седиментації курячих еритроцитів. Культури біотипу А і АВ є найбільш патогенними для білих мишей, не дають седиментації за культурального росту в рідких живильних середовищах, викликають гемоліз еритроцитів барана, аглютинують курячі еритроцити, виділяють в культуральну рідину екзотоксини, тому є найбільш підходящими для конструювання вакцин проти некробактеріозу. Культури *F. necrophorum* біотипу С є непатогенними [6, 7].

Мета дослідження – провести диференціацію музейних культур та польових ізолятів *F. necrophorum* за біотипами по седиментаційних, гемолітичних, гемаглютинаційних та вірулентних властивостях збудника та підібрати штами для конструювання вакцин проти некробактеріозу.

Матеріал і методи досліджень. Робота виконана на базі лабораторії анаеробних інфекцій ІВМ НААН України. У ході проведення досліджень було використано 4 музейні штами та 14 ізолятів *F. necrophorum*, виділені із біоматеріалу від тварин, які загинули із клінічними ознаками некробактеріозу, надісланого з господарств різних регіонів України [8–10]. Дослідні ізоляти фузобактерій попередньо було ідентифіковано за морфологічними, культуральними, біохімічними та біологічними властивостями [11, 12]. Біотики музейних штамів і польових ізолятів *F. necrophorum* визначали за основними властивостями, запропонованими російськими науковцями [12], які вивчають проблеми некробактеріозу (табл. 1). З метою визначення біотипів наявних штамів досліджуваних культур збудника некробактеріозу досліджували гемолітичні властивості за загальноприйнятими методиками [12, 13].

Для виявлення феномену седиментації кожен із дослідних штамів культур *F. necrophorum* висівали на середовище Кітта-Тароцці, культивували до 10 діб, щоденно спостерігали та реєстру-

вали термін появи осідання мікробних клітин культури збудника на дно пробірки. Найбільш вірулентні штами збудника некробактеріозу, які належать до біотипів А і АВ, не проявляють феномену седиментації на середовищі Кітта-Тароцці; штами збудника біотипу В дають седиментацію через кілька діб після посіву; у збудників біотипу С явище седиментації спостерігається уже через добу від початку культивування [6, 7, 13].

Таблиця 1 – Основні властивості біотипів *F. necrophorum*

Ознаки	Біотипи збудника <i>F. necrophorum</i>			
	А	АВ	В	С
1. Седиментація за росту на рідкому живильному середовищі Кітта-Тароцці	-	+/-	+	-
2. Гемолітичні властивості (гемоліз еритроцитів барана)	+	+	+	-
3. Гемаглютинаційні властивості – аглютинація курячих еритроцитів	+	+/-	-	-
4. Патогенність для мишей добової бульйонної культури	+++	++	+	-

Примітка: (+) – наявність властивостей; (-) – відсутність властивостей.

Для виявлення феномену аглютинації курячих еритроцитів, за постановки РГА, використовували 12–14-годинні культури дослідних штамів, вирощених на середовищі Кітта-Тароцці. Культуральні суспензії центрифугували за 10 тис. об./хв, супернатант відбирали та незаражували. Осад ресуспендували у стерильному фізіологічному розчині до концентрації 5 млрд м. т./см³ за оптичним стандартом каламутності. Курячі еритроцити триразово відмивали стерильним фізіологічним розчином та виготовляли 1,0 % суспензію. Постановку реакції гемаглютинації проводили в лунках полістиролових планшетів, змішуючи мікробну масу дослідних фузобактерій і 1,0 % суспензію курячих еритроцитів в рівних об'ємах – по 0,2 см³, ретельно перемішували. Паралельно ставили контроль на визначення самоаглютинації курячих еритроцитів, а саме: до 0,2 см³ суспензії курячих еритроцитів додавали 0,2 см³ фізіологічного розчину. Облік реакції проводили через 60 хв за витримки планшетів за кімнатної температури. Реакцію ставили у трьох повторностях. Позитивна реакція характеризувалася утворенням на дні лунки аглютинату у вигляді «перевернутої парасольки» із рівномірним осіданням еритроцитів по периметру лунки і просвітленням надосадової рідини. Негативна реакція – еритроцити щільно осідали у вигляді «гудзика» на дні лунки. Патогенність дослідних штамів культур *F. necrophorum* досліджували методом біопробу. З метою досягнення високої концентрації екзотоксину, який продукує збудник *F. necrophorum*, для культивування дослідних штамів культур використовували печінковий бульйон із додаванням 20,0 % стерильної сироватки крові великої рогатої худоби та 2,0 % стерильного розчину глюкози *ex tempore* [6, 7].

Для визначення ступеня патогенності дослідних штамів використовували 12–14-годинні бульйонні культури збудника із попередньо визначеною концентрацією мікробних клітин за оптичним стандартом каламутності. Білим мишам (по 5 гол. для кожного дослідного штаму *F. necrophorum*) було інокульовано відповідну культуру збудника в об'ємі по 0,5 см³ із розрахунку, щоб у кожній дозі знаходилась однакова кількість мікробних клітин – $1,6 \times 10^9$ КУО/см³. За обліку результатів ступінь патогенності дослідних штамів культур визначали: у разі загибелі 80,0–100,0 % (+++) тварин – високопатогенні культури *F. necrophorum*; 60,0–80,0 % загибелі мишей (++) – патогенні культури; 40,0–60 % загибелі мишей – низькопатогенні фузобактерії та непатогенні штами у разі загибелі до 10,0 % (+) тварин у досліді [11].

Результати досліджень та їх обговорення. Нами вивчено гемолітичні властивості 18 дослідних штамів культур *F. necrophorum* (рис. 1). Результати досліджень показали, що із 18 дослідних культур гемолітичні властивості відмічали у 14 штамів, а саме: «Світанок-8», «Богачка», «Старо-Костянтинівський», «Р/Л», «Єрчик», «Сапейко», «Ришнівка», «Зоря», «Лан», «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський», «Прогрес» володіють здатністю викликати лізис еритроцитів барана та утворювати прозору зону гемолізу за їх росту на кров'яному МПА.

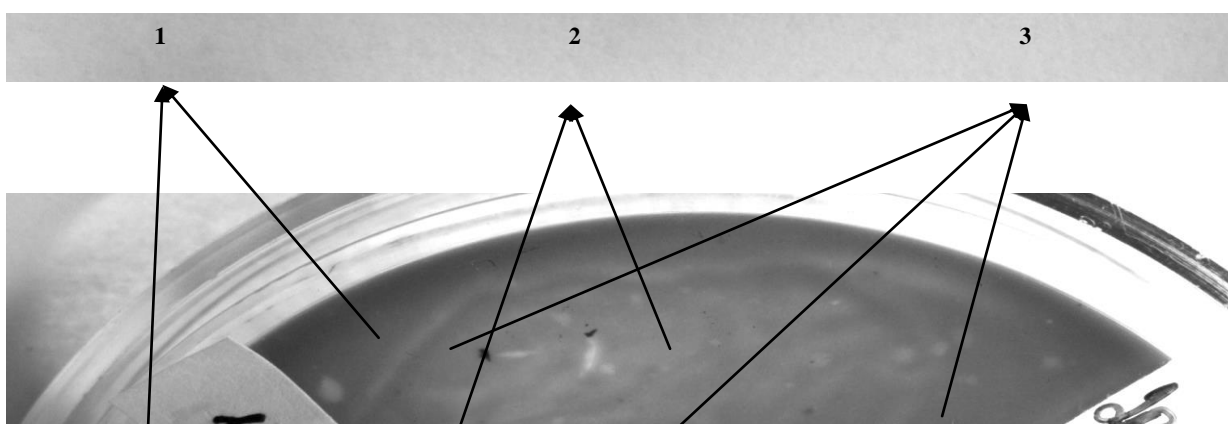


Рисунок 1. Гемоліз еритроцитів барана за культивування збудника *F. necrophorum* на кров'яному МПА: 1 – кров'яний МПА; 2 – зона росту культури збудника на середовищі; 3 – явище гемолізу еритроцитів за культивування *F. necrophorum*.

Аналіз результатів досліджень феномену седиментації культури *F. necrophorum* різних штамів засвідчив її відсутність у цілому ряду дослідних культур, що вказувало на можливу їх належність до вірулентних біотипів А і АВ. У культуральних суспензіях штамів «Богачка», «Р/Л», «Засядька», «Сапейко», «Ришнівка», «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський», «Прогрес» осаду клітин не виявлено упродовж 10 діб. За термостатування культур штамів «Світанок 8», «Старокостянтинівський», «Єрчик», «Лан» часткове осідання клітин фузобактерій починалося через 48–72 год. Культури штамів «Білоцерківський», «Злагода», «Цюрупи» утворювали осад через добу їх культивування (рис. 2).

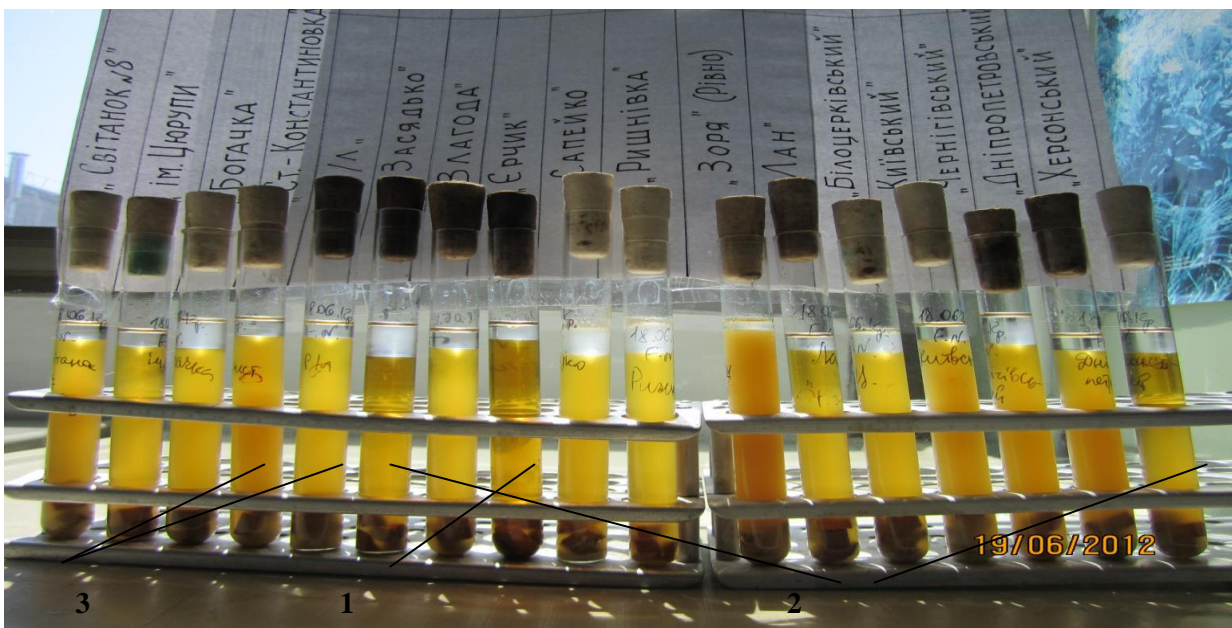


Рисунок 2. Ступінь седиментації культур *F. necrophorum*, ізольованих із біоматеріалу від загинлих тварин: 1 – седиментація культури; 2 – початок седиментації; 3 – відсутність седиментації.

Аналіз результатів обліку РГА засвідчує, що всі патогенні культури збудника *F. necrophorum* дослідних штамів «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський», «Р/Л», «Засядька», «Ришнівка», «Зоря», «Прогрес» викликали аглютинацію курячих еритроцитів на рівні від двох до чотирьох хрестів за відсутності аглютинації у контролі. Результати постановки РГА з еритроцитами курей та дослідними культурами штамів збудника проведені в трьох повторностях, як показано на рис. 3.

Аналіз результатів досліджень ступеня вірулентності дослідних штамів *F. necrophorum* показав, що патогенним був штам «Прогрес», за інокуляції якого білим мишах їх загинель складала 60,0 %. З інших дослідних штамів *F. necrophorum* (близько 56,0 % від загальної кількості) спостерігалось зниження рівня патогенності у кілька разів в порівнянні із початковою, що, ймовірно, пов'язано із багаторазовими пересівами культур збудника на середовища. Дослідні штами фузобактеріозних культур із низьким рівнем патогенності, в межах 20,0–30,0 % загинелі мишей, склали 27,7 % від усіх досліджених штамів *F. necrophorum*.

Аналіз результатів досліджень з вивчення гемолітичних, седиментативних, здатності до спонтанної аглютинації курячих еритроцитів та за рівнем вірулентності музейних культур (4 екз.) і польових ізолятів (14 екз.) збудника *F. necrophorum* дозволив їх диференціювати на біотики та визначити штами, найбільш придатні для конструювання вакцин проти некробактеріозу (табл. 2).

Таким чином, із 18 досліджених дослідних культур *F. necrophorum* виявлено п'ять штамів збудників біотипу А – «Богачка», «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський» (серед яких задепоновано чотири штами *F. necrophorum*), п'ять штамів біотипу АВ – «Р/Л», «Засядька», «Ришнівка», «Зоря», «Прогрес», п'ять штамів віднесені до біотипу В – «Світанок 8», «Старокосянтинівський», «Єрчик», «Сапейко», «Лан» та три непатогенних штами біотипу С – «Цюрупі», «Злагода» і «Білоцерківський». Враховуючи вивчені властивості культур *F. necrophorum*, зокрема здатність до продукування гемолітичного токсину, аглютинації курячих еритроцитів у РГА, відсутність седиментаційної властивості відносно клітин *F. necrophorum* та рівня патогенності штамів культур на інбредних білих мишах, як вірулентні культури, придатні для виготовлення вакцин, визнано штами біотипу А – «Богачка», «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський» та штами біотипу АВ – «Р/Л», «Засядька», «Ришнівка», «Зоря», «Прогрес». Штами культур, віднесені до біотипу В, проявляли низькі патогенні властивості після зараження лабораторних тварин, що свідчить про низький рівень токсигенності штамів, тому непридатних для виготовлення вакцинних препаратів проти некробактеріозу. Штами *F. necrophorum*, диференційовані як біотип С, а саме: «Цюрупі», «Злагода» та «Білоцерківський» є непатогенними.

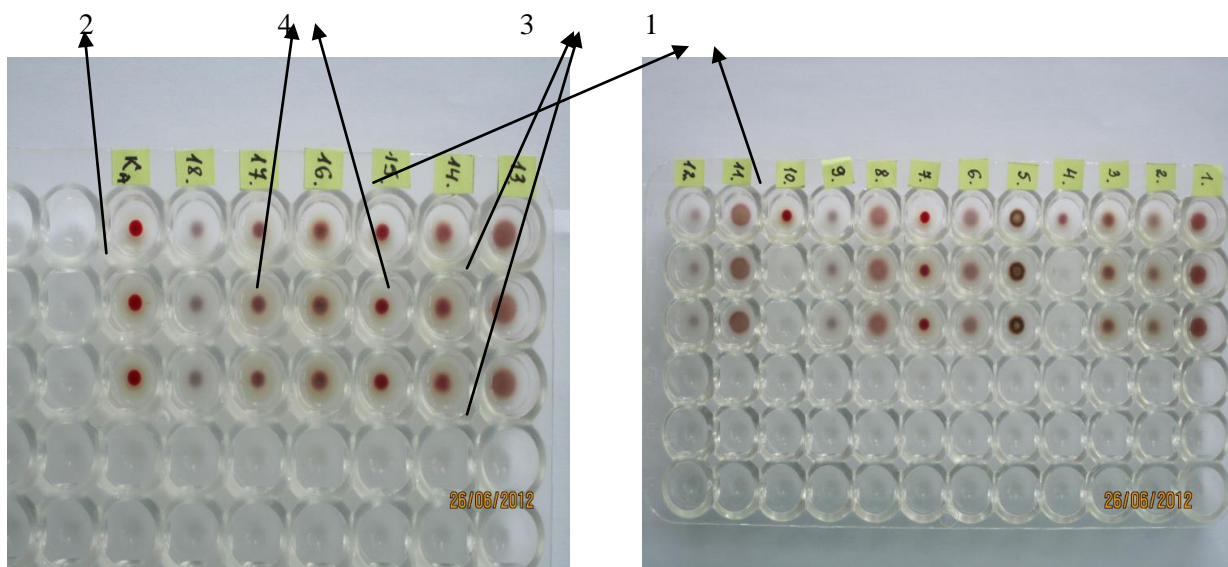


Рисунок 3. Облік реакції гемаглютинації дослідних культур *F. necrophorum* із курячими еритроцитами:

- 1 – плексигласові пластини; 2 – контроль еритроцитів (утворення щільного диска, реакція негативна); 3 – аглютинація еритроцитів на +++ хрести (утворення аглютинату на дні лунки у вигляді широкої перевернутої «парасольки», реакція позитивна); 4 – утворення щільного диска із неаглютинованих еритроцитів і культури збудника (як у контролі), реакція негативна.

Таблиця 2 – Результати досліджень щодо визначення біотипів штамів *F. necrophorum*

Дослідні штами культур <i>F. necrophorum</i>	Ознаки біотипів <i>F. necrophorum</i>				Біотип <i>Fusobacterium necrophorum</i>
	Седиментація в середовищі (Кітта-Тарощі)	Гемолітичні властивості	Гемаглютинація еритроцитів	Патогенність для мишей, %	
1. «Світанок № 8»	±	+	*-	40,0	В
2. «Цюрупі»	±	-	*-	20,0	С
3. «Богачка»	-	+	*++++	40,0	А
4. «Старокосянтинівський»	±	+	*-	20,0	В
5. «Р/Л»	-	+	*+++	40,0	АВ
6. «Засядько»	-	-	*++	40,0	АВ
7. «Злагода»	±	-	*-	-	С
8. «Єрчик»	+	+	*+	20,0	В
9. «Сапейко»	-	+	*+	20,0	В
10. «Ришнівка»	-	+	*++++	40,0	АВ
11. «Зоря», (Рівно)	±	+	*++++	30,0	АВ
12. «Лан»	±	+	*-	20,0	В
13. «Білоцерківський»	±	-	*++++	-	С

14. Штам Київський»	-	+	*++++	40,0	A
15. Штам Чернігівський»	-	+	*++++	40,0	A
16. Штам Дніпропетровський»	-	+	*++++	40,0	A
17. Штам Херсонський»	-	+	*++++	40,0	A
18. «Прогрес»	-	+	*++	60,0	AB

Примітка: (+) – позитивний результат; (±) – слабка реакція; (-) – негативний результат; *+ – РГА культури *F. necrophorum* із курячими еритроцитами на один хрест – негативно; *++, *+++, *++++ – РГА культури *F. necrophorum* із курячими еритроцитами відповідно на два, три, чотири хрести – позитивно.

Висновки. 1. За результатами визначення гемолітичних, седиментаційних, патогенних та гемаглютинуючих властивостей, із 18 дослідних культур збудника *F. necrophorum*, п'ять диференційовано як біотип А, п'ять штамів віднесено до біотипу АВ, п'ять штамів – до біотипу В та три штами – до біотипу С.

2. За результатами диференційних досліджень та зважаючи на певний ступінь вірулентності, для виготовлення вакцин нами рекомендовано культури *F. necrophorum* штамів «Богачка», «Київський», «Чернігівський», «Дніпропетровський», «Херсонський», віднесені до біотипу А та штами «Р/Л», «Засядька», «Ришнівка», «Зоря», «Прогрес», віднесені до біотипу АВ, як такі, що відповідають рівню патогенності та мають характерні диференційні ознаки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Методи діагностики некробактеріозу сільськогосподарських тварин:* Методичні рекомендації для спеціалістів державної ветеринарної медицини, науковців та студентів/ В.П. Риженко, Г. Ф. Риженко, М. С. Павленко та ін.. – К. 2003. – С. 4-10.
2. *Риженко В.П.* Проблеми профілактики некробактеріозу// Наукова спадщина Луї Пастера і ветмедицина України // Наукові статті конференції. – Рівне, 1998. – С. 138–139.
3. *Марченко О. М.* Специфічна профілактика патології відтворення у свиней, викликані *Fusobacterium necrophorum* і *Salmonellae cholerae suis* // Науковий вісник НАУ. – 2000, вип. 22. – С.78–81.
4. *Самоловов А.А.* *Fusobacterium necrophorum*: морфологические, биологические свойства, классификация // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве.– Новосибирск, 1999. – С. 399–406.
5. *Berg J.N.* Studies of *Fusobacterium necrophorum* from bovine hepatic abscesses: biotypes, quantitation, virulence and antibiotic susceptibility // *Am. J. Vet. Res.* – 1982. – Vol. 43. – P. 1580–1586.
6. *Соломаха О.И.* Биотипы возбудителя некробактериоза и подбор штаммов для изготовления вакцины против некробактериоза / О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, Н.Н. Кружнов [и др.] // *Аграрная Россия.* – № 3.– 2000. – С. 62–66.
7. *Лопатин С.В.* Культурально-морфологические свойства *Fusobacterium necrophorum* штамма «ИВ», используемого для изготовления антигена при реакции агглютинации / С.В. Лопатин // *Актуальные проблемы патологии животных: Материалы Междунар. съезда терапевтов, диагностов.* – Барнаул, 2005. – С. 102–104.
8. *Риженко В.П.* Відбір біологічного матеріалу для лабораторних досліджень на анаеробні інфекції: Методичні рекомендації / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк [та ін.]. – Київ, 2011. – 44 с.
9. *Риженко В.П.* Интегральная система захисту тварин від фузобактеріозу (некробактеріозу): Методичні рекомендації / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк [та ін.]. – Київ, 2012. – 69 с.
10. *Івченко В.М.* Загальні методи мікробіологічних досліджень у лабораторіях ветеринарної медицини: Методичні рекомендації / В.М. Івченко, Г.М. Денисенко, В.В. Шарандак [та ін.]. – Біла Церква, 2003. – С. 26–36.
11. *Риженко В.П.* Методи діагностики некробактеріозу сільськогосподарських тварин: Методичні рекомендації / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, М.С. Павленко та ін. – Київ, 2003. – С. 14–18.
12. *Скородумов Д.И.* Микробиологическая диагностика некробактериоза / Д.И. Скородумов // *Ветеринария сельскохозяйственных животных.* – 2007. – № 12. – С. 21–28.
13. *Соломаха О.И.* Некоторые морфологические особенности *Fusobacterium necrophorum* / О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова // *Аграрная Россия.*– 2000. – № 3. – С. 59–61.
14. *Балобанов В.А.* Некробактериоз животных / В.А. Балобанов. – М.: Колос, 1971. – 146 с.

Определение биотипов музейной культуры и полевых изолятов *F. necrophorum* и подбор штаммов для изготовления вакцины против некробактериоза

А.М. Жовнир

В статье изложен анализ результатов исследований по поводу типирования музейных культур и полевых изолятов *F. necrophorum*, выделенных от животных, погибших с клиническими признаками некробактериоза. Ввиду того, что подбор биотипов возбудителя некробактериоза для конструирования вакцин имеет очень важное значение, проведено определение лабораторных штаммов возбудителя *F. necrophorum*. К основным дифференциальным признакам отнесено изучение гемолитических свойств фузобактерий на кровяном МПА. Исследованы седиментативные свойства культур фузобактерий при росте на жидкой питательной среде; гемагглютинационные свойства относительно осаждения куриных эритроцитов и патогенные свойства имеющихся возбудителей. Учитывая упомянутые свойства культур *F. necrophorum*, подобраны высоковирулентные штаммы биотипов А и АВ для изготовления вакцин против некробактериоза.

Ключевые слова: биотипы *F. necrophorum*, вакцина, седиментация, гемолиз, гемагглютинация, вирулентность, патогенность.

Definition of culture and museum biotype field isolate *F. necrophorum* and selection of strains for the production of vaccines against necrobacteriosis

A. Zhovnir

The article describes the analysis of the results of studies on the typing of museum cultures and field isolates of *F. necrophorum*, isolated from animals that died with clinical signs necrobacteriosis. Since the selection of pathogen biotypes necrobacteriosis for designing vaccines is a very important place of laboratory strains of *F. necrophorum*. The main characteristics attributed differentionnym study fuzobakterii hemolytic properties on blood MPA. Investigated the properties of cultures sedimentativnye fuzobakterii with growth in liquid medium; gemagglyutatsionnye properties relative deposition chicken erythrocytes and pathogenic properties of existing pathogens. Given the above-mentioned properties of cultures *F. necrophorum*, matched by highly virulent strains of biotypes A and AB to produce vaccines necrobacteriosis.

Key words: biotype *F. necrophorum*, vaccine, sedimentation, hemolysis, haemagglutination, virulence, pathogenicity.