УДК 619:578

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ВИДА ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОРНИТОБАКТЕРИОЗА ПТИЦ

Курьянова Н.Х.

Технологический институт филиал ФГБОУ ВО «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», Димитровград, e-mail: knaziya1960@yandex.ru

В последней трети XX века, несмотря на определенные успехи в борьбе с инфекционными болезнями, значение инфекционной патологии как одного из основных критериев здоровья признано всем мировым сообществом. Сегодня можно констатировать, что суммарная распространенность инфекционных (и паразитарных) болезней, несмотря на предпринимаемые усилия, направленные на борьбу с ними, не только не сокращается, но даже возрастает. Так, если в начале девяностых годов в России ежегодно регистрировалось в среднем 30 млн случаев инфекционных заболеваний, то в последние годы эта величина превышает 40 млн. Мировой опыт борьбы с болезнями животных показал, что в системе мероприятий обеспечения здоровья всех видов животных специфическая профилактика занимает важное место. Это связано с тем, что активная иммунизация является наиболее эффективным средством предотвращения многих болезней вирусной и бактериальной этиологии. В статье описаны результаты исследований по изучению тинкториальных, культуральных и биохимических свойств бактерий вида Ornithobacterium rhinotracheale – возбудителей орнитобактериоза птиц. Подобраны плотные и жидкие питательные среды для культивирования вышеназванных микроорганизмов для наработки бактериальной массы. Бактерии вида Ornithobacterium rhinotracheale сравнительно недавно признали в качестве патогенного возбудителя заболевания респираторных путей у значительного числа цыплят и индеек.

Ключевые слова: питательные среды, тинкториальные свойства, референс-штаммы, Ornithobacterium rhinotracheale, ОРТ

BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE BACTERIUM ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE – AGENTS ORNITOBAKTERIOZA BIRDS

Kuryanova N.H.

Technological Institute FGBOU VO «Ulyanovsk State Agricultural Academy», e-mail: knaziya1960@yandex.ru

In the last third of the XX century, in spite of some progress in the fight against infectious diseases, infectious pathology value as one of the main criteria of health recognized by the entire world community. Today we can say that the total number of infectious (and parasitic) diseases, despite the efforts being made to deal with them , not only not declining, but even increases. So, if in the early nineties in Russia reported an average of 30 million cases of infectious diseases, in recent years this value exceeds 40 million. World experience in dealing with animal diseases has shown that the system of measures to ensure the health of all species specific prevention plays an important role. This is due to the fact that active immunization is the most effective way to prevent many diseases of viral and bacterial etiology. The article describes the results of studies on the tinctorial, cultural and biochemical properties of the bacterium Ornithobacterium rhinotracheale – pathogens ornitobakterioza birds. Picked up tight and liquid culture media for culturing microorganisms for producing the above-mentioned bacterial mass. Bacteria form Ornithobacterium rhinotracheale relatively recently recognized as a pathogen of respiratory tract disease in a significant number of chickens and turkeys.

Keywords: nutrient medium, tinctorial properties, reference strains, Ornithobacterium rhinotracheale, ORT

Бактерии вида *Ornithobacterium rhinotracheale* сравнительно недавно признали в качестве патогенного возбудителя заболевания респираторных путей у значительного числа цыплят и индеек [1, 3, 5].

Первоначально возбудитель орнитобактериоза был описан как *Pasteurella*-подобный или *Kingella*-подобный [4] микроорганизм или полиморфная грамм-отрицательная палочка (PGNR) [1]. В 1994 году было предложено назвать возбудителя *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), gen.nov.,sp.nov. По данным от 3 мая 1999 года *(Anonymous*) род *Ornithobacterium* относят к семейству *Flavobacteriaceae*. Посредством генетического метода классифицируют и определяют как *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT), gen.nov.,sp.nov в rRNA суперсемействе V, находящимся в таксономической близости родов *Cytophaga, Riemerella, Flavobacterium, Weekseela, Sporocytophaga, Capnocytophaga* [3].

Особенности, характеризующие болезнь, вызываемую орнитобактериями, включают относительно слабые респираторные симптомы у молодых птиц, которые начинаются с чихания и исчезают через 1–2 недели. У погибшей птицы наиболее часто регистрируют аэросаккулиты, одно- или двухсторонние пневмонии, пенистые скопления жидкости в грудной полости, анемичность, перикардиты и перитониты [4].

Заболевание, вызываемое орнитобактериями, может принести значительный экономический ущерб за счет увеличения процента смертности, снижения яйценоскости, снижения вывода птенцов, повышения процента выбраковки и низкого показателя прироста. Для изучения возможности создания инактивированной вакцины против орнитобактериоза птиц необходимо было изучить биологические свойства этого малоизученного в нашей стране инфекционного агента [5].

Цель и задачи исследования – изучить основные биологические свойства бактерий вида Ornithobacterium rhinotracheale на референс-штаммах К 282 и К 33, полученных из музея НИИЦМиБ ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА».

Для достижения поставленной цели необходимо изучить тинкториальные, культуральные и биохимические свойства Ornithobacterium rhinotracheale; подобрать плотные и жидкие питательные среды для культивирования вышеназванных микроорганизмов для наработки бактериальной массы.

Изучение биологических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* проводилось по классическим методикам [1].

Результаты исследований и их обсуждение

Для изучения возможности создания инактивированной вакцины против орнитобактериоза птиц необходимо было изучить биологические свойства этого малоизученного в нашей стране инфекционного агента.

Тинкториальные свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* устанавливали путем микроскопии под иммерсионной системой мазка суточной культуры, окрашенной по Граму. Увеличение светового микроскопа составляло ×100×15.

Микроскопию проводили методом негативного контрастирования 1,5% фосфорновольфрамовой кислотой (ФВК). Просматривали препараты на электронном микроскопе HV-12A (фирмы Hitachi) при ускоряющем напряжении 75 кВ и увеличении 35×103. Фиксировали культуру 2%-м раствором OsO_4.

Результаты микроскопирования O. rhinotracheale представлены на рис. 1.

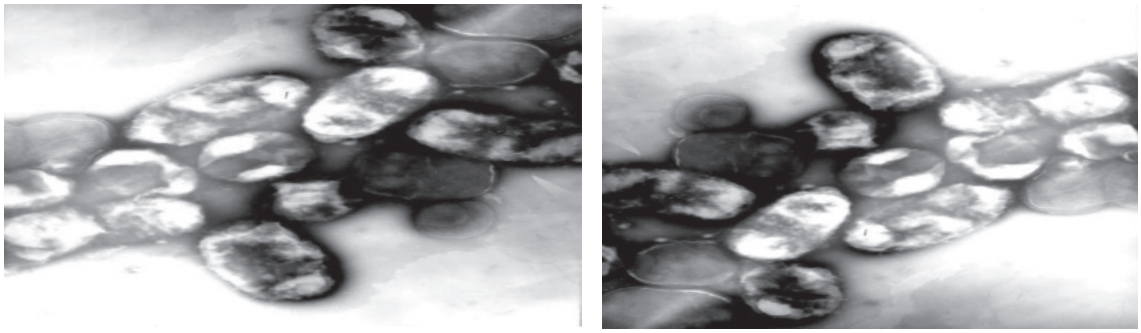


Рис. 1. Микроскопия O. rhinotracheale К 282 увеличение 35·103

При исследовании морфологических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* нами было установлено, что это небольшие грамотрицательные палочки с округлыми концами. Споры и капсулы не образуют. Результаты электронной микроскопии, представленные на рис. 1, дают характерную информацию о данном микроорганизме.

При исследовании морфологических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* нами было установлено, что это небольшие грамотрицательные палочки с округлыми концами. Споры и капсулы не образуют.

Для изучения культуральных свойств использовали тесты, которые наиболее полно характеризуют ферментативные свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* согласно литературным данным [2].

Таким образом, мы получили следующие результаты: интенсивное синее окрашивание дисков для исследования на оксидазу (HiMedia) говорит о положительной реакции на цитохромоксидазу; индол и сероводород не образуют; при добавлении метилового красного кислоту не образуют и окрашивание среды остается желтого цвета; на среде Симмонса цитрат не утилизируют; фермент ДНКаза не деполимеризует ДНК вокруг культуры и цвет среды остается без изменений; тест окисления/ферментации положительный. При ферментации углеводов производят слабое сбраживание (интенсивное синее окрашивание по ходу укола практически без изменения цвета среды) с образованием газа лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, маннит, маннозу, что отражает положительную сторону проведенных тестов. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Длительность исследований по изучению культуральных свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* подтолкнула

нас к использованию тест-систем по ускоренной типизации микроорганизмов, произведенных ФГУН НИИЭМ им. Пастера. Нами были получены результаты, отраженные в табл. 2.

Таблица 1

Показатели исследований на биохимические свойства бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale*

Тесты	Ornithobacterium rhinotracheale К 282	Ornithobacterium rhinotracheale К33
Каталаза	–	–
Оксидаза	+	+
Индол	–	–
Сероводород	–	–
Метиловый красный	–	–
Утилизация цитрата	–	–
Днказа	–	–
O/F	+	+
Лактоза	+	+
Сахароза	+	+
Глюкоза	+	+
Мальтоза	+	+
Гемолиз	–	-
Манноза	+	+
Маннит	+	+

Примечание: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

Использование тест-систем позволило расширить спектр изученных культаральных свойств референс-штаммов бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* по еще 7 показателям. В результате исследований нами изучены 22 биохимических свойства вышеназванных бактерий.

Изучение протеолитических свойств бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* мы начали с определения гемолитической активности. Определение морфологических и фенотипических факторов на гемолитическую активность проводили на триптозо-соевом агаре (Difko) с добавлением 10% овечьей и человеческой дефибринированной крови. Для этого культуру предварительно культивировали в течение 48 ч при 37°С на бульоне Хоттингера. При изучении гемолитической активности бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* было установлено, что независимо от вида донора, чья кровь была использована, зона разрушения эритроцитов не обнаружена.

Следующей целью исследований было проведение сравнительного анализа ростовых характеристик орнитобактерий на различных средах, предлагаемых для оптимального культивирования чистой культуры, что обусловлено получением больших объёмов бактериальной массы для цели наших исследований.

Таблица 2

Показатели ферментативной активности бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* по тест-системе по ускоренной типизации ФГУН НИИЭМ им. Пастера

Тесты	Ornithobacterium rhinotracheale К 282	Ornithobacterium rhinotracheale К33
Сероводород	–	–
Орнитиндекарбоксилаза	+	+
Лизиндегидролаза	–	–
Аргининдегидролаза	–	–
Уреаза	–	–
Индол	–	–
Арабиноза	–	–
Манноза	+	+
Сахароза	+	+
Глюкоза	+	+
Маннит	–	–
Адонит	–	–
Сорбит	–	–
Лактоза	+	+

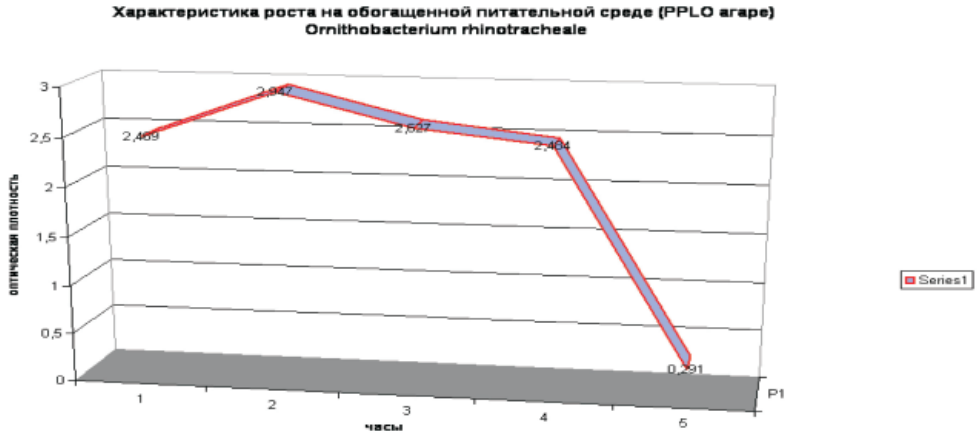
Примечание: «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

Из плотных питательных сред активный рост бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* был кровяном агаре, содержащем 5–10% дефибринированной овечьей крови. Экспериментально установлено, что его основу могут составлять Blood agar base (bioMerieux, Франция), Purple Broth base (Difco, USA), Tryptose Blood agar base (Difco, USA). Рекомендуется инкубировать на агаре в чашках Петри при 37°С в течении 48–72 часов в анаэробных или микроаэробных условиях (5–10% CO_2). Слабый рост либо его отсутствие возникает при 24°С. Установлено, что вышеназванные микроорганизмы растут на триптозо-соевом агаре фирм: (bio Merieux, Франция), Tryptose agar base (Difco, USA), на PPLO агаре (Difco, USA). Из жидких питательных сред оптимум роста предоставляют бульон Хоттингера, сердечно-мозговой экстракт и пептонная вода.

В наших экспериментах по определению оптимальной среды культивирования установлено, что бактерии вида *Ornithobacterium rhinotracheale* не растут на агаре МакКонки, Дригальского, Эндо, Симмонса.

Оптимальное время культивирования бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на выбранных нами питательных средах – 48 часов. На рис. 2 отражены ростовые

характеристики бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на PPLO агаре. Экспериментальным путем было установлено, что ростовые характеристики бактерий вида *Ornithobacterium rhinotracheale* на кровяном агаре, содержащем 5–10% дефибринированной овечьей крови, триптозо-соевом агаре и PPLO агаре, примерно аналогичны.



	1	2	3	4	5
Series1	2,469	2,947	2,627	2,484	0,291

Рис. 2. Характеристика роста на обогащенной питательной среде (PPLO агаре) бактерий вида Ornithobacterium rhinotracheale

Данные среды для наработки бактериальной массы достаточно дороги и экономически невыгодны. По результатам экспериментов пришли к выводу, что в качестве азотно-витаминной основы конструируемой нами среды нужно использовать дрожжевой экстракт, пептон, в качестве источника углерода – глюкозу. По результатам опытов сконструирована оптимальная питательная среда накопления для культивирования бактерий *O. Rhinotracheale.*

Выводы

Охарактеризованы основные биологические свойства бактерий O. rhinotracheale (по данным эмирсионной микроскопии – это короткие палочки с округлыми концами, спор и капсул не образуют; установлено отсутствие способности образовывать индол, сероводород и утилизировать цитрат; гемолитическая активность не выявлена; при взаимодействии с лактозой, сахарозой, глюкозой, маннозой, маннитом, оксидазой – реакция положительная, при взаимодействии с аргининдекарбоксилазой, лизиндекарбоксилазой, арабинозой, лизином, аргинином, уреазой, адонитом, сорбитом – реакция отрицательная).

Разработана питательная среда для наработки бактериальной массы *O. rhinotracheale* с целью получения инактивированного антигена: мясопептонный агар – 1000 мл; дрожжевой экстракт – 4,0 г; пептон – 5,0 г; глюкоза – 3,5 г; K2HPO4 – 2,0 г; MgSO4 – 5,0 г.

Список литературы

1. Курьянова Н.Х. Тинкториальные и биологические свойства Ornithobacterium rhinotracheale, используемые для идентификации А.С. Разорвина, Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Материалы Международной научно-практической конференции на тему Актуальные вопросы аграрной науки и образования, посвященной 65-летию УГСХА, эпизоотологии, ВСЭ, биотехнологии – Ульяновск, 2008 – С. 155–161.

2. Курьянова Н.Х. Проблемы биологической диагностики орнитобактериоза / Н.И. Молофеева, Д.А. Васильев // Научный вестник – Димитровград, 2009 – С. 170–174.

3. De Rosa M., R. Droual, R.P. Chin, H.P. Shivaprasad and R.L. Walker. Ornithobacterium rhinotracheale infection in turkey breeders // Avian Dis., 1996, 40:865–874.

4. Hafez H. Current status on the role of Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) in respiratory disease complexes in poultry // Arch. Geflugelk, 1996, P. 60.

5. Hafez H., and W.Beyer Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* «ORT» isolates using PCR-fingerprintings // In: Proc.ll th Internation Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary. 1997, P. 51.

References

1. Kur›janova N.H. Tinktorial›nye i biologicheskie svojstva Ornithobacterium rhinotracheale, ispol›zuemye dlja identifikacii A.S. Razorvina, N.I. Molofeeva, D.A. Vasil›ev // Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii na temu Aktual›nye voprosy agrarnoj nauki i obrazovanija, posvjashhennoj 65-letiju UGSHA, jepizootologii, VSJe, biotehnologii Ul›janovsk, 2008 pp. 155–161.

2. Kur›janova N.H. Problemy biologicheskoj diagnostiki ornitobakterioza / N.I. Molofeeva, D.A. Vasil›ev // Nauchnyj vestnik Dimitrovgrad, 2009 pp. 170–174.

3. De Rosa M., R.Droual, R.P.Chin, H.P. Shivaprasad and R.L. Walker. Ornithobacterium rhinotracheale infection in turkey breeders // Avian Dis., 1996, 40:865–874.

4. Hafez H. Current status on the role of Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) in respiratory disease complexes in poultry // Arch. Geflugelk, 1996, pp. 60.

5. Hafez H., and W.Beyer Preliminary investigation on Ornithobacterium rhinotracheale «ORT» isolates using PCR-fingerprintings // In: Proc.ll th Internation Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, Hungary. 1997, pp. 51.

Рецензенты:

Любин Н.А., д.б.н., профессор, зав. кафедрой морфологии, физиологии и патологии животных, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», г. Ульяновск;

Хайруллин И.Н., д.в.н., профессор кафедры хирургии, акушерства, фармакологии и терапии, ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 19.12.2013.