

УДК 619:636.5.616.9

UDC 619:636.5.616.9

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
КЛЕБСИЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ  
БРОЙЛЕРОВ****THE BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF  
KLEBSIELLA ALLOCATED FROM  
BROILERS**

Ольховик Оксана Петровна  
научный сотрудник  
*ГНУ Краснодарский НИВИ, Краснодар, Россия*

Olkhovik Oksana Petrovna  
scientific employee  
*GNU Krasnodar NIVI, Krasnodar, Russia*

Изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства и серологический профиль клебсиелл, выделенных от бройлеров. Приведены данные о серологическом профиле и факторах вирулентности 3-х видов клебсиелл. Определена гемолитическая активность клебсиелл к эритроцитам различных видов животных.

Biochemical, morphological, cultural properties and serologic profile of Klebsiella allocated from broilers are studied. Data about serologic profile and factors of virulence of 3 kinds of Klebsiella are cited. Hemolytic activity of Klebsiella to erythrocytes of various kinds of animals is defined

Ключевые слова: БИОЛОГИЧЕСКАЯ  
ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕБСИЕЛЛ, БРОЙЛЕР

Keywords: BIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF  
KLEBSIELLA, BROILER

В настоящее время серьёзной проблемой промышленного птицеводства являются массовые желудочно-кишечные и респираторные болезни, вызываемые различными ассоциациями бактериальных агентов.

Одним из ведущих агентов вызывающих такие заболевания у бройлеров, являются клебсиеллы. В настоящее время недостаточно сведений о биологических, культуральных характеристиках микроорганизма этого рода, выделяемых от бройлеров (Ковалёва Е.П., Рейзис А.П., 1993).

**Материалы и методы исследований.** Культуральные свойства выделенных микроорганизмов изучали в процессе выращивания на плотных и жидких питательных средах. Особое внимание обращали на форму, величину, структуру и консистенцию колоний. Серологическую типизацию изолятов проводили в РА, по общепринятой методике с типа специфическими сыворотками, изготовленными фирмой «Илья Мечников» НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова Российской АМН. Гемолитическую активность определяли на МПА с добавлением 5% дефибринированной крови различных видов животных. Токсигенность выделенных культур проводили методом биотестирования на инфузориях рода стилонихии и по тесту отёка лапки белых мышей.

**Результаты исследований.** Морфокультуральные и биохимические свойства изучили у 257 выделенных от птиц культур клебсиелл. При микроскопии клебсиеллы представляли собой граммотрицательные палочки с закруглёнными концами, длина и толщина которых колебалась от 0,6 до 6 мкм и от 0,3 до 1,5 мкм, соответственно, располагающиеся единично, парами или короткими цепочками. Все выделенные культуры имели капсулу. Однако после длительного культивирования на питательных средах некоторые штаммы (15,2% или 39 культур) теряли способность к капсулообразованию, другие, наоборот, сохраняли капсулу в течение всего срока исследований. Восстановление капсул отмечали после пассирования клебсиелл через углеродсодержащие среды (МПБ с 2% содержанием сахаров: глюкозы, лактозы, сахарозы) или организм лабораторных животных (белые мыши).

Все выделенные от бройлеров культуры клебсиелл хорошо росли в аэробных условиях на обычных питательных средах при температуре от 20<sup>0</sup>С до 43<sup>0</sup>С, при рН от 5,5 до 8,2. Оптимальная температура роста 37 -38<sup>0</sup> С, оптимум рН – 7,2- 7,4.

При культивировании клебсиелл на МПБ наблюдалось интенсивное помутнение среды с одновременным образованием слизистого осадка. Некоторые штаммы (77% или 197 культур) образовывали пристеночное кольцо и плёнку, что свидетельствует о наличии у них фимбрий.

На МПА клебсиеллы формировали круглые, блестящие колонии беловато-серого цвета, диаметром 1, 0 – 3,0 мм, в слизистые в 54,9% случаев.

На висмут-сульфит агаре все изученные культуры клебсиелл формировали блестящие круглые колонии коричневые (у 89,1% - 228 культур), или прозрачные, как слизистые (57,6% - 148 культур), так и не слизистые (42,4 % или 109 изолятов), размерами от 0,3 до 2,5 мм. Штаммы *K. rhinoscleromatis* и *K. ozaenae* формируют выпуклые, гладкие колонии S формы, а *K. oxytoca* - плоские и шероховатые – R формы.

На агаре Эндо в большинстве случаев - 252 культуры (98,1%) росли колонии малинового цвета различной интенсивности - лактозапозитивные штаммы и 7 культур (1,9%) образовывали колонии розового цвета - лактозанегативные штаммы. Все культуры *K. oxytoca* формировали колонии бледно-розового цвета – то есть не ферментировали лактозу. Диаметр колоний 24 часовых культур на среде Эндо варьировал от 0,5 до 2 мм.

Все культуры клебсиелл, изолированные от бройлеров продуцировали 5-аминосалицилатдекарбоксилазу. На специализированной дифференциальной питательной среде «КЛЕБСИЕЛЛА 5-АСК-20», образовывали вокруг колоний широкую зону чёрно-коричневого цвета – в результате образования пара-аминофенола.

На 5% кровяном агаре с дефибрированной крови барана *K. oxytoca* образовывала круглые блестящие неслизистые колонии серовато-белого и серовато-желтого цвета, диаметром 1,7 – 7,0 мм, а *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaena* - слизистые серого цвета, диаметром 0,8 – 4,5 мм.

Все колонии клебсиелл на скошенном агаре были прозрачны в проходящем свете и имели розово-дымчатый или оранжево-дымчато-зеленоватый тип свечения.

Культуры клебсиелл выделенные от бройлеров обладали высокой биохимической активностью (таблица 1).

Как видно из данных таблицы 1, все культуры *K. rhinoscleromatis* сбраживали глюкозу, маннит, инозит, сорбит, арабинозу и мальтозу, 88,9% культур ферментировали сахарозу, 99,2% давали положительную реакцию с малонатом натрия и 100% культур - отрицательную с цитратом натрия. 91,7% культур *K. rhinoscleromatis* отрицательно реагировали с цитратом натрия с глюкозой, 100% - не продуцировали индол и сероводород, не обладали уреазной активностью.

*K. ozaenae* в 25% положительно реагировала с цитратом натрия и продуцировала лизиндекарбоксилазу, 75% культур обладали ферментативной активностью в отношении лактозы и сахарозы, 50% продуцировали β-галактидазу и сбраживали сорбит, 25% - инозит, с образованием кислоты.

Культура *K. oxytoca*, выделенная от бройлеров, отрицательно реагировала в тесте с малонатом натрия, продуцировала индол, β - галактидазу и ацетилметилкарбинол, обладала уреазной активностью, активно ферментировала сахара.

Серологический профиль клебсиелл определяли по типу капсульного антигена.

Для стимуляции капсулообразования клебсиелл культивировали на агаровой среде Ворфеля – Фергюсона в течение 24 часов. Серологическую идентификацию проводили в реакции агглютинации на стекле, смешивая 10 мкл смыва агаровых культур в концентрации  $10^{10} - 10^{11}$  кл/мл в физиологическом растворе pH – 7,2 с 30 мкл агглютинирующей капсульной сыворотки.

В результате проведенных исследований установили, что все 252 культуры *K. rhinoscleromatis* (100%) относились к серогруппе К – 5, 75% культур *K. ozaenae* - к К – 68 и 25% - к К – 25. Культура *K. oxytoca* – к сероварианту К – 70 (таблица 2).

Таблица 1

Ферментативная характеристика клебсиелл выделенных от бройлеров.

| № п/п | тест или субстрат | <i>K.rhinoscleromatis</i> n=252 |      | <i>K. ozaenae</i> n=4    |      | <i>K. oxytoca</i> n=1    |     |
|-------|-------------------|---------------------------------|------|--------------------------|------|--------------------------|-----|
|       |                   | количество положительных        | %    | количество положительных | %    | количество положительных | %   |
| 1.    | цитрат натрия     | 0                               | 0    | 1                        | 25,0 | 1                        | 100 |
| 2.    | малонат натрия    | 250                             | 99,2 | 0                        | 0    | 0                        | 0   |

|     |                      |     |      |   |      |   |     |
|-----|----------------------|-----|------|---|------|---|-----|
| 3.  | цитр.натрия с<br>гл  | 21  | 8,3  | 0 | 0    | 1 | 100 |
| 4.  | лизин                | 0   | 0    | 1 | 25,0 | 1 | 100 |
| 5.  | аргинин              | 0   | 0    | 0 | 0    | 0 | 0   |
| 6.  | орнитин              | 0   | 0    | 0 | 0    | 0 | 0   |
| 7.  | фенилаланин          | 0   | 0    | 0 | 0    | 0 | 0   |
| 8.  | индол                | 0   | 0    | 0 | 0    | 1 | 100 |
| 9.  | ацетилметил-<br>кар. | 0   | 0    | 0 | 0    | 1 | 100 |
| 10. | уреаза               | 0   | 0    | 0 | 0    | 1 | 100 |
| 11. | сероводород          | 0   | 0    | 0 | 0    | 0 | 0   |
| 12. | глюкоза              | 252 | 100  | 4 | 100  | 1 | 100 |
| 13. | $\beta$ -галактидаза | 0   | 0    | 2 | 50,0 | 1 | 100 |
| 14. | лактоза              | 0   | 0    | 3 | 75,0 | 1 | 100 |
| 15. | маннит               | 252 | 100  | 4 | 100  | 1 | 100 |
| 16. | сахароза             | 224 | 88,9 | 3 | 75,0 | 1 | 100 |
| 17. | инозит               | 252 | 100  | 1 | 25,0 | 1 | 100 |
| 18. | сорбит               | 252 | 100  | 2 | 50,0 | 1 | 100 |
| 19. | арабиноза            | 252 | 100  | 4 | 100  | 1 | 100 |
| 20. | мальтоза             | 252 | 100  | 4 | 100  | 1 | 100 |

Наличия двух и более типов К-антигена у изученных клебсиелл не выявили.

Таблица 2

Антигенная структура клебсиелл, выделенных от бройлеров.

n=257

| Виды рода <i>Klebsiella</i> | Тип К- антигена | Положительно реагировало: |       |
|-----------------------------|-----------------|---------------------------|-------|
|                             |                 | культур                   | %     |
| <i>K. rhinoscleromatis</i>  | K5              | 252                       | 100,0 |
| <i>K. ozaenae</i>           | K68             | 3                         | 75,0  |
| <i>K. ozaenae</i>           | K25             | 1                         | 25,0  |
| <i>K. oxytoca</i>           | K70             | 1                         | 100,0 |

Ферментативная активность клебсиелл различных сероваров одного вида различалась: Культуры *K. ozaenae*, отнесённые к серологическому варианту К – 68, в отличие от серологического типа К – 25, отрицательно реагировали с цитратом натрия, не продуцировали лизиндекарбоксила-

зу и не сбраживали инозит, но активно ферментировали лактозу и сахарозу.

Таким образом, культуры клебсиелл, выделенные от бройлеров обладали значительной вариабельностью морфологических, культуральных и биохимических свойств, но имели узкий спектр сероваров.

Патогенность выделенных от птиц изолятов клебсиелл определяли на беспородных белых мышах, весом 18 – 20 грамм, при внутрибрюшинном заражении смывами агаровых суточных культур и бульонными 24-часовыми культурами в объеме 0,5 мл/мышь.

Установили, что все выделенные из инкубационных яиц, замерших эмбрионов, вынужденно убитых и павших цыплят бройлеров и взрослой птицы культуры клебсиелл патогенны для белых мышей. Гибель животных вызывали как суточные агаровые, так и бульонные культуры.

При внутрибрюшинном заражении смывами агаровых культур гибель мышей регистрировали через 18-24 часа. В более короткие сроки животные гибли после введения бульонной культуры (5 – 7 часов), что, по нашему мнению, свидетельствует о наличии экзотоксина. У большинства выделенных штаммов клебсиелл (241 культура или 93,8%)  $LD_{50}$  находилась в пределах 400-600 млн. м. т./мышь, 16 культур или 6,2% были более вирулентны -  $LD_{50}$  – 200-250 млн. м. т./мышь. Слизистые культуры *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* обладающие мощной капсулой, оказались более вирулентными по отношению к белым мышам, чем бескапсульные *K. oxytoca*. При заражении минимальными дозами (50 млн. м. т./мышь), гибель мышей регистрировали через 10-14 дней. Оставшиеся в живых животные в течение 18-20 дней являлись бактерионосителями - при убое мышей по истечении указанного срока из крови, печени и селезёнки выделяли исходные культуры клебсиелл в концентрации  $10^2$  –  $10^3$  КОЕ/мл.

Одним из факторов патогенности клебсиелл, является цитотоксичность (гемолитическая активность). Гемолизины состоят из полипептидов

и липополисахаридов, обладающих способностью лизировать эритроциты различных видов животных.

Изучение гемолитической активности 257 штаммов клебсиелл выделенных от бройлеров (таблица 3), проводили на 2% мясопептонном агаре с добавлением 1% глюкозы и 5% дефибринированной крови наиболее часто применяемых в лабораторной практике видов животных: барана, кролика, морской свинки. Предварительно культуры клебсиелл различных видов в течение 18-20 часов культивировали на бульоне Хоттингера.

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице 3, при использовании дефибринированной крови барана 100% культур клебсиелл проявляли гемолитическую активность, 79 культур (30,7%) продуцировали  $\beta$ -гемолизины, а 178 культур (69,3%) -  $\alpha$ -гемолизины.

Гемолитической активностью по отношению к эритроцитам кролика обладали 184 культуры или 71,5%, формируя вокруг колоний зону  $\alpha$ -гемолиза, а 73 культуры или 28,5% не проявляли гемолитической активности к эритроцитам этого животного. Не одна из изучаемых культур клебсиелл не гемолизировала эритроциты морской свинки.

Таблица 3

Гемолитическая активность рода *Klebsiella*, выделенных от бройлеров.

| культуры                              | МПА+ 1% глюкоза + 5% дефибринированной крови |              |          |              |              |             |              |          |             |
|---------------------------------------|--|--------------|----------|--------------|--------------|-------------|--------------|----------|-------------|
|                                       | барана                                       |              |          | кролика      |              |             | морс. свинки |          |             |
|                                       | тип гемолиза                                 |              |          | тип гемолиза |              |             | тип гемолиза |          |             |
|                                       | $\beta$                                      | $\alpha$     | $\gamma$ | $\beta$      | $\alpha$     | $\gamma$    | $\beta$      | $\alpha$ | $\gamma$    |
| $\sum$ <i>Klebsiella</i><br>n = 257   | 79/<br>30,7                                  | 178/<br>69,3 | -        | -            | 184/<br>71,5 | 73/<br>28,5 | -            | -        | 257/<br>100 |
| В том числе:                          |  |              |          |              |              |             |              |          |             |
| <i>K. rhinoscleromatis</i><br>n = 252 | 79/<br>31,3                                  | 173/<br>68,7 | -        | -            | 184/<br>73,0 | 68<br>27,0  | -            | -        | 252/<br>100 |

|                     |        |           |        |        |        |          |        |        |          |
|---------------------|--------|-----------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|----------|
| К. ozaenae<br>n = 4 | -<br>- | 4/<br>100 | -<br>- | -<br>- | -<br>- | 4<br>100 | -<br>- | -<br>- | 4<br>100 |
| К. oxytoca<br>n = 1 | -<br>- | 1/<br>100 | -<br>- | -<br>- | -<br>- | 1<br>100 | -<br>- | -<br>- | 1<br>100 |

Примечание: в числителе – количество культур; в знаменателе - % соотношения.

Исходя из результатов, полученных при изучении гемолитической активности культур клебсиелл выделенных от птиц, можно сделать вывод, что на агаре с использованием 5% дефибринированной крови барана гемолитическая способность клебсиелл выражена более интенсивно ( $\beta$  и  $\alpha$  гемолиз). При использовании агара с добавлением 5% дефибринированной крови кролика гемолитическая активность у клебсиелл менее выражена ( $\alpha$  и  $\gamma$  гемолиз), а в отношении эритроцитов морской свинки гемолитическая активность не проявлялась  $\gamma$  гемолиз.

Способность к токсинообразованию, по мнению ряда исследователей (Бондаренко В.М. и др., 1986; Jhanjee A., Asnani P., 1982; Kahlich R. et al., 1982; Ivanof A. et al., 1983), является одним из основных факторов патогенности клебсиелл.

Продукцию экзотоксинов у изучаемых культур определяли по тесту отека лапки на белых беспородных мышках.

Установили, что при введении фильтрата 12,4% (32 культуры) клебсиелл масса лапы мыши вследствие её отёка увеличилась на 20 - 34 мг - слаботоксичные штаммы. Количество умеренно токсичных возбудителей было больше - 36,2% или 93 культуры, при введении фильтратов которых масса лапы мышки увеличивалась на 38 – 62 мг и 8,6% - 22 культуры - высокотоксичные штаммы, масса лапки мышки увеличивалась на 66 – 97 мг; Экзотоксигенная активность отсутствовала у 110 протестированных культур, или 42,8%, при введении фильтратов этих культур клебсиелл увеличение массы лапы мышки было менее 12 мг.

Таким образом, установили, что экзотоксины продуцировало 57,2% или 147 культур выделенных от бройлеров клебсиелл.

Максимальное накопление токсинов в фильтратах культур клебсиелл отмечали на 3-5 сутки культивирования.

Биотестирование общей токсигенности выделенных клебсиелл проводили на инфузориях стилонихиях.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют, что 64,6% или 166 культур *Klebsiella* способны продуцировать токсины, то есть 7,4% или 19 культур кроме экзотоксина продуцировали токсины других типов.

Процент погибших стилонихий после контакта со средой культивирования *Klebsiella*, продуцирующей гемолизины и токсины – 41,7. Количество лизированных инфузорий после контакта со средой культивирования *Klebsiella*, продуцирующей только гемолизины было в 1,76 раз ниже и равнялось 23,7%.

Антилизозимный признак у клебсиелл способствует подавлению фагоцитоза, а также сохранению и возможно, размножению обладающих им штаммов в фаголизосоме. Установлено, что антилизозимный фактор участвует в инфекционном процессе и с полным основанием, может быть причислен к факторам патогенности. При наличии штаммов такого типа у больных наблюдается более тяжёлое течение заболевания и более длительное выделение возбудителя (Бондаренко В.М., Петровская В.Г., Потатуркина-Нестарова Н.И., 1996).

При изучении антилизозимной активности клебсиелл экспресс - методом на плотной питательной среде установили, что все 257 (100%) выделенные от птиц культуры клебсиелл обладали антилизозимной активностью. Средняя величина АЛЖ клебсиелл составила -  $4,9 \pm 0,2$  мкг (концентрация лизоцима мкг/мл).

Анализируя полученные результаты можно констатировать, что 64,6% выделенных от бройлеров культур клебсиелл обладали токсигенной и 100% - антилизоцимной и гемолитической активностью.