



003054479

На правах рукописи

Макара

МАКАРОВА ВЕРА НИКОЛАЕВНА

**ИЕРСИНИОЗ СВИНЕЙ В УСЛОВИЯХ КРУПНОГО
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО РЕГИОНА
(ЭПИЗООТОЛОГИЯ, МЕРЫ БОРЬБЫ, ЛАБОРАТОРНОЕ
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА)**

16.00.03 – ветеринарная микробиология,
вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией
и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Диссертация выполнена в лаборатории по изучению болезней молодняка с.х. животных ГУ «Вологодская научно-исследовательская ветеринарная станция»

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Рыбакова Н.А.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Григорьева Г.И.

кандидат ветеринарных наук Волкова Н.И.

Ведущее учреждение: ФГОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины»

Защита состоится «28» февраля 2007 г в 10 часов на заседании диссертационного совета Д 220.047.02 при ФГОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» (603107, Н. Новгород, пр. Гагарина, 97)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НГСХА.

Автореферат разослан «29» декабря 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор



Горчакова Н. Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В условиях кризиса сельского хозяйства животноводство в России переживает не только депрессию, но и спад своего развития: сокращается численность поголовья, снижается продуктивность, физиологическая устойчивость животных и возрастает их заболеваемость. Наряду с хорошо известными болезнями животных появляются «новые», которые ранее находились вне поля зрения исследователей.

Изучению заболеваний сельскохозяйственных животных иерсиниозами, возбудителями которых являются микроорганизмы распространенных видов рода *Yersinia* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), посвящено в последние десятилетия большое количество работ (Е.Н. Колос с соавт., 1982; Е.А. Кириянов, И.И. Савчук, 1989; А.Б. Тебекин с соавт., 1991; М.П. Елезов, 1994; В.А. Сабурин, 1995; В.В. Сочнев с соавт., 1997, 1990, 2004; А.С. Собакин с соавт., 1998; В.К. Тихонов, 1999 и др.). Выявлены не только носительство, но и клинически выраженные заболевания, проявляющиеся генерализацией инфекции. Особенно восприимчив к иерсиниям молодняк животных, что влияет на его сохранность, нанося существенный ущерб животноводству.

Актуальность работы определяется и всё возрастающей заболеваемостью людей иерсиниозами. С 1994 г. на отдельных территориях России заболеваемость населения псевдотуберкулезом и иерсиниозом возросла в 2–50 раз и тенденция к ее росту не снижается. Как отмечается в документах международного симпозиума по пищевым зоонозам, иерсиниозам по значимости было отведено 2-е место после сальмонеллёзов (Б.Л. Черкасский с соавт., 1995). В настоящее время эпизоотолого-эпидемиологической особенностью возбудителей указанных заболеваний является изменение пейзажа циркулирующих серотипов *Y. enterocolitica*, снижение доли ранее доминировавших серотипов и появление новых серо- и биотипов, ранее считавшихся непатогенными (Г.Я. Ценева, 1992, 1997, 2000).

В связи с факультативным паразитизмом иерсиний, роль животных и пищевых продуктов как источников инфекции и факторов передачи этих микроорганизмов для человека неравнозначна. Существенное значение в этой связи принадлежит больным сельскохозяйственным животным (свиньи, крупный и мелкий рогатый скот). Во многих странах установлено значительное инфицирование иерсиниями свиней, доказана их роль как основных источников *Y. enterocolitica* для человека (S. Alecsic et al., 1976; E. Aldová, K. Lázníčková, 1979; H. Fucushima et al., 1979; Г.В. Ющенко, 1981; Е.Н. Колос с соавт., 1982). Исследователи указывают на обсеменённость иерсиниями свинины, говядины, мяса птицы и мясных продуктов.

По данным разных авторов частота выделения иерсиний из сырого молока варьирует от 18 до 65% исследованных проб. Описаны случаи инфицирования пастеризованного молока с частотой от 0,4 до 11% проб, молочных про-

дуктов, оборудования на молокоперерабатывающих предприятиях (D.A. Schiemann, 1978; Г.В. Ющенко, 1979, 1984; Т.С. Гречищева, 1981; С. Delmas, D. Vidon, 1982; A. Luppi, G. Bucci, 1982; А.В. Куликовский, К. Джентемирова, 1993).

Обсеменение продуктов животного и растительного происхождения иерсиниями определяет их значение как факторов дальнейшего распространения возбудителей при нарушении технологических режимов на объектах питания и торговли.

В этиологии иерсиниозов животных ведущее значение на территории Вологодской области принадлежит *Y. enterocolitica*. Многие теоретические и практические аспекты управления эпизоотическим процессом иерсиниозной инфекции остаются неизученными. В первую очередь это обусловлено неполной оценочно-прогнозной информацией об истинной распространенности иерсиний среди сельскохозяйственных животных и их этиологической значимости. Сложность в изучении эпизоотологии иерсиниозов заключается в том, что эти болезни не включены в перечень обязательных исследований, утвержденных Главным управлением ветеринарии Минсельхозпрода России, и поэтому практические ветеринарные лаборатории в области исследования на иерсинии не проводят.

Резкое ухудшение эпидемической и эпизоотической обстановки по пищевым зоонозам в ряде регионов России в последние годы, угроза их распространения в ранее благополучных регионах требуют совершенствования системы эпизоотологического надзора и, в первую очередь, обеспечения его эффективными методами и средствами контроля за циркуляцией иерсиний.

Цель исследования: определить особенности эпизоотического процесса иерсиниоза молодняка свиней в условиях сельскохозяйственного региона и на этой основе разработать эффективное лечение и профилактику заболевания и усовершенствовать методы лабораторного обеспечения эпизоотологического надзора за иерсиниозами животных.

Задачи исследования:

1. Изучить этиологическую структуру и биологические особенности иерсиний, циркулирующих на территории Вологодской области, определить серо- и биотипы, имеющие этиологическое значение в желудочно-кишечной патологии молодняка свиней.
2. Испытать препараты антимикробного, иммуностимулирующего и протективного действия для лечения и профилактики иерсиниоза поросят.
3. Отработать оптимальную методику бактериологического и иммунологического исследования на иерсиниозы материала различного происхождения.

4. Унифицировать методы микробиологического мониторинга за распространением иерсиний для включения их в систему эпизоотологического надзора за иерсиниозами.

Научная новизна работы. Получены новые данные о распространении иерсиниозной инфекции в популяции свиней. Апробирована и внедрена в лабораторную практику новая жидкая пептонно-калиевая среда (ПК) для накопления бактерий рода *Yersinia*.

В экспериментальных условиях на лабораторных животных получен протективный эффект от развития генерализованной иерсиниозной инфекции в результате их иммунизации протеино-липополисахаридным комплексом *Y.pseudotuberculosis*. Доказана принципиальная возможность специфической защиты животных от развития патологического иерсиниозного процесса.

Усовершенствована схема идентификации иерсиний, упрощающая проведение исследования в практических ветеринарных лабораториях.

Научно обоснована тактика унифицированного микробиологического мониторинга иерсиниозов в условиях крупного сельскохозяйственного региона.

Теоретическая и практическая значимость работы. Апробирована и внедрена в практику жидкая пептонно-калиевая среда (ПК) накопления для бактерий рода *Yersinia*. Она позволяет сократить срок подращивания до 2 дней и с наибольшей частотой установить распространенность иерсиний среди животных, отработать условия использования среды для мониторинга циркуляции иерсиний при контроле материала животного и растительного происхождения. Испытания среды ПК в полевых условиях показали, что она эффективнее широко используемых БКД (на 26%) и ФБР (на 22%). Среда ПК внедрена в практических ветеринарных лабораториях Вологодской области.

Для повышения эффективности бактериологического метода при массовых исследованиях, рекомендовано однократное щелочение исследуемого материала на этапе первичного посева на среду накопления, позволившее увеличить количество выделенных иерсиний при высеве на 4-5-е сутки в 2 раза по сравнению с щелочной обработкой перед высевом на плотную питательную среду.

Предложена унифицированная тактика микробиологического мониторинга иерсиний с использованием эффективных методов и средств.

Опыт научного обоснования системы микробиологического мониторинга и профилактики иерсиниозов включен в программу обучения студентов факультета ветеринарной медицины Вологодской государственной молочнохозяйственной академии им. Н.В. Верещагина. В целях внедрения эпизоотологического надзора за иерсиниозами в практику ветеринарной службы подготовлены методические рекомендации «Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз - этиология, эпизоотология, лабораторная диагностика у сельскохозяйственных

животных» (Вологда, 2003) и «Иерсиниозы животных (диагностика, меры борьбы) научно обоснованная система» (Н. Новгород, 2004).

Положения, выносимые на защиту:

1. *Y. enterocolitica* I биотипа, серотипов O:6,30, O:6,31, O:5, O:5,27, O:4,32, O:4,33 являются главными этиологическим фактором иерсиниоза свиней в изучаемом регионе.

2. Комплексное применение антимикробных и иммуностимулирующих препаратов с целью профилактики иерсиниозов у поросят высоко эффективно.

3. В опытах на биологических моделях показана принципиальная возможность специфической защиты от развития иерсиниозного патологического процесса. Иммунизации сельскохозяйственных животных протеино-липополисахаридным комплексом *Y. pseudotuberculosis* создает специфический протективный эффект при иерсиниозе.

4. Использование новой питательной среды ПК для накопления иерсиний в сочетании с однократным щелочением исследуемых проб существенно повышает эффективность бактериологического исследования.

Апробация работы. Диссертация апробирована на заседаниях методической комиссии Вологодской научно-исследовательской ветеринарной станции (НИВС). Материалы работы доложены и обсуждены: на юбилейной научно-практ. конф., посвящ. 75-летию аспирантуры ВГМХА им. Н.В. Верещагина (2001), на международной научно-технической конференции «Проблемы экологии на пути к устойчивому развитию регионов» (Вологда, 2001.); 8-м международном симпозиуме по *Yersinia* в Turku (Финляндия, 2002); на научно-произв. конф., посв. 70-летию научн. деят. Вологодской НИВС (2002), на региональной научно-практической конференции «Современные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения» (Вологда, 2002), на заседании Вологодского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (2002), на юбилейной научно-практической конференции, посвященной 35-летию ГУ «Прикаспийский НИВИ» (Махачкала, 2003), на научно-производственной конференции факультета ветеринарной медицины ВГМХА им. Н.В. Верещагина (2005). Результаты исследований опубликованы в 19 научных работах, в том числе в иностранных изданиях – 1, в периодических изданиях, зарегистрированных в ВАК, 2.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 172 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 17 рисунками, 36 таблицами и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических рекомендаций. Список используемой литературы включает 279 источников, в том числе 150 зарубежных авторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы, методы и объем исследований

Работа выполнялась в лаборатории по изучению болезней молодняка с.х. животных ГУ «Вологодская НИВС» (Россельхозакадемии), в 6 хозяйствах Вологодского, Грязовецкого и Череповецкого районов Вологодской области.

Основная часть работы выполнена в 1999-2005 гг. в рамках программы НИР Вологодской НИВС «Изучить распространение и проявление иерсиниоза молодняка сельскохозяйственных животных, предложить методы лечения и профилактики» № госрегистрации 01.2.00 101328.

В работе проанализированы: отчеты ветслужбы хозяйств за последние 10 лет об инфекционных болезнях свиней, результаты лабораторных исследований биологического материала от сельскохозяйственных, свободноживущих животных, объектов внешней среды и людей, выполненные областной ветеринарной лабораторией, диагностическими лабораториями лечебных учреждений и санэпидслужбы, результаты исследований, полученные автором при проведении экспериментов,

Проведены клинические исследования 12885 свиней разных возрастов, 1155 телят, проведены патоморфологические исследования 1893 павших и вынужденно убитых поросят.

Исследования по изучению эпидемиологии иерсиниозов проводились совместно с сотрудниками Центра Государственного санитарно-эпидемиологического надзора (ЦГСЭН) в Вологодской области.

Раздел по изучению протективных свойств иерсиний выполнен на базе лаборатории бактериальных инфекций (руководитель д.м.н., проф. Ценева Г.Я.) Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера.

Отбор specimens (фекалий) от животных проводили при подозрении на заболевание до начала лечения антибиотиками. Испражнения брали после естественной дефекации или ректальным тампоном. Материал помещали в среду накопления (среды БКД, ФБР, ПК), встряхивали, ставили в холодильник при температуре +4°C и выдерживали в ней до 14 дней с высевом на плотные дифференциально-диагностические среды. Эти же среды накопления использовали как транспортные.

Смывы с миндалин, глотки и языка брали в первые дни болезни до кормления стерильным ватным тампоном и помещали в пробирку со средой накопления.

Материал от убитых с диагностической целью и павших животных тщательно растирали в ступке с песком и фосфатно-буферным раствором; 1,5 мл взвеси переносили в 5 мл среды накопления.

Смывы с объектов внешней среды свинокомплексов проводили с 10 одноименных поверхностей размером 10x10 см стерильным ватным тампоном, который помещали в 5 мл среды накопления.

Воду для поения животных исследовали методом концентрации на мембранных фильтрах в соответствии с МУ 2285-81. После фильтрации фильтры засевали в среду накопления.

Пробы кормов для поросят обрабатывали по общепринятой методике. В 225 мл среды накопления засевали 25 г (мл) исследуемого образца. Инкубацию посевов проводили вышеуказанным методом.

При бактериологических исследованиях применяли метод холодного накопления. Высевы со сред накопления при экспериментальных работах проводили ежедневно, при текущей работе – на 2 - 3-и, 5 - 7-е, 10-е сутки на плотные дифференциально-диагностические среды Эндо и СБТС прямым методом и с применением щелочной обработки для освобождения от посторонней микрофлоры.

При количественном посеве кусочки органов экспериментальных животных взвешивали, растирали в фарфоровых ступках до однородного состояния с добавлением 1,0 мл 0,15 М раствора NaCl. Из каждой пробы по 0,1 мл засевали на 4 чашки со средами. Проводили подсчет выросших колоний и определяли концентрацию возбудителя в 1,0 г исследуемого органа.

Чашки с посевами инкубировали 24 часа при температуре 37°C, затем еще 24 часа при комнатной температуре в защищенном от света месте. Отсев подозрительных колоний проводили на комбинированную среду типа Клиглера и скошенный питательный агар. Пробирки инкубировали в течение суток при температуре 37°C. Дальнейшую идентификацию штаммов, изучение ферментативных и антигенных свойств проводили со скошенного питательного агара.

Видовую принадлежность выделенных культур устанавливали на основании комплекса типичных морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств.

Серологическую титризацию иерсиний проводили с помощью набора коммерческих моновалентных сывороток к серогруппам *Y. enterocolitica*: O:3; O:4,32; O: 4,33; O:5; O:5,27; O:6,30; O:6,31; O:7,8; O:9; и *Y. pseudotuberculosis* серотипов O:1 и O:3; *идентификацию вирулентных иерсиний* – с использованием «диагностической сыворотки к вирулентным иерсиниям» – СВИ (производства НИИЭМ им. Пастера, г.Санкт-Петербург).

Сыворотки крови животных исследовали на наличие антител к *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. При диагностических исследованиях титры антител определяли в динамике, первую пробу крови отбирали в конце первой недели заболевания, вторую – на 14 день. При серологическом скрининге животных на антитела к иерсиниям исследовали одну пробу сыворотки. Антитела выявляли в РНГА с коммерческими кишечно-иерсиниозными O:3, O:9 и псевдотуберкулезным диагностикумами производства НИИВиС (г.Санкт-Петербург) и в РА с антигенами иерсиниозными (серотипов O3; O4,33; O5,27; O6,30; O7,8; O9) и псевдотуберкулезными (I и III серотипов) производства НИИЭМ

им. Пастера. Исследование в РНГА и РА проводили согласно инструкции, прилагаемой к препаратам.

Для поиска иерсиниозного антигена методом ИФА использовали «тест-систему иммуноферментную для выявления антигенов иерсиний псевдотуберкулеза I серовара» производства НИИЭМ им. Пастера. Подготовку пробы, проведение ИФА, учет результатов проводили в соответствии с инструкцией к тест-системе. Результаты ИФА регистрировали с помощью спектрофотометра «Multiscan-assenb».

Постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфичным для фрагмента гена *uorA* плазмиды *pCad Y. pseudotuberculosis* проводили в режиме амплификации, описанном в инструкции «По применению тест-системы для обнаружения ДНК *Yersinia pseudotuberculosis* методом ПЦР» (производства Ниармедик Плюс г. Москва). Детектировали продукты ПЦР методом гелеэлектрофореза в 1,2 агарозном геле, используя трис-ацетатный буфер, содержащий бромистый этидий. Электрофорез проводили в режиме 120 V в течение 30 мин. Гели анализировали в проходящем УФ.

Культуры иерсиний. Для оценки протективной активности антигенов было использовано 2 штамма *Y. pseudotuberculosis* I серотипа (№ 15, № 377), полученные из коллекции Санкт-Петербургского НИИЭМ им. Пастера. Ранее эти штаммы были изучены в НИИЭМ им. Пастера на комплексе биологических моделей и оценены как высоковирулентные.

Штаммы использовали после лиофилизации при условиях, сохраняющих характеристику S-формы. Липополисахаридный антиген (ЛПС) из *Y. pseudotuberculosis* получали методом дезинтеграции по Грассе, антиген белков наружной мембраны (БНМ) – по методикам M. Osborn, R. Munsen, K. Schnaitman (А.Н. Бистрова, 1991).

Биологические модели. Для оценки протективных свойств различных антигенов *Y. pseudotuberculosis* использовали модель энтерального заражения морских свинок массой 200 - 250 г. По окончании срока иммунизации животным вводили по 3,0 мл суспензии с концентрацией $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл 2-х суточной культуры высоковирулентного штамма № 377 в S-форме. Опытных и контрольных животных исследовали в динамике инфекционного процесса на 3, 6, 9, 14, 21 сутки (по 3 свинки на срок). Генерализацию инфекции определяли по результатам количественных посевов гомогенатов печени, селезенки, почек, мезентериальных лимфоузлов и тонкого кишечника. Одновременно у всех животных определяли иерсиниозные антитела в сыворотке крови.

Гистологические исследования проведены в НИИЭМ им. Пастера совместно с В.Е. Ефремовым. Для исследований использовали парафинированные срезы материала биопробных животных, окрашенные азур-эозином по Романовскому и краской Лейшмана. Отдельные препараты изучали методом иммунофлюоресценции.

Для определения патогенности *Y. enterocolitica* на белых мышах использовали беспородных животных 16 – 18 г. Из односуточных агаровых культур, находящихся в S-форме, по стандарту мутности готовили одномиллиардную бактериальную взвесь. Каждой культурой в дозе 0,5 мл ($5 \cdot 10^8$ КОЕ) заражали внутрибрюшинно трех белых мышей. Наблюдение за подопытными животными вели в течение 10 дней.

Эпидемиологический анализ выполнен совместно с Е.Ю. Смирновой. Первичные материалы были предоставлены отделением особо опасных инфекций ЦГСЭН в Вологодской области.

Проанализированы направления эпидемиологического надзора за иерсиниозами (эпидемиологическая проекция иерсиниозной инфекции в Вологодской области за период с 1991 по 2002 гг.; распространенность иерсиний среди людей, мелких млекопитающих и в окружающей среде; биологические свойства иерсиний, изолированных от людей, мелких млекопитающих, пищевых продуктов).

Статистическую обработку полученных данных проводили в соответствии с правилами биологической статистики с помощью программного пакета Microsoft Excel путем вычисления для полученных параметров средней величины (M) и средней ошибки средней величины (m). Оценку достоверности разности средних величин для парных рядов определяли по критерию Стьюдента (t). Значения фактора достоверности определяли по таблице вероятности. Различия считали достоверными при $P < 0,05$. Силу связи между явлениями оценивали по величине полученного коэффициента корреляции: от 0,0 до 0,29 – слабая степень корреляции; от 0,3 до 0,69 – средняя; от 0,7 до 1,0 – сильная (высокая) степень корреляции.

Автор выражает искреннюю признательность и благодарность д.биол.н., профессору Н.А. Рыбаковой, д.мед.н., профессору Г.Я. Ценовой, д.вет.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ, члену-корреспонденту РАСХН В.В. Сочневу за научные консультации при обосновании методической основы работы, директору Вологодской НИВС, к.вет.н. А.П. Горбунову – за предоставленную возможность организации эпизоотологических и микробиологических экспериментов, а также специалистам отделения особо опасных инфекций, базовой микробиологической лаборатории ЦГСЭН, научным сотрудникам Вологодской НИИВС за постоянную всестороннюю помощь и сотрудничество.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Провели ретроспективный анализ государственной ветеринарной отчетности о заболеваемости свиней в Вологодской области. Установили, что в среднем за год в свиноводческих хозяйствах области переболевает 61% народившегося молодняка, из которых более 15% гибнет. За последние 9 лет из общего количества заболевших поросят у 63% отмечали желудочно-кишечные расстройства.

Провели экспертную оценку результатов бактериологических исследований патологического материала от павших поросят, проводившихся в областной ветеринарной лаборатории (1998–2002 гг.). Подтвердили недостаточную эффективность диагностики: из 23480 образцов трупного материала только в 3,6% случаев обнаружены инфекционные агенты, из них 64,9% составляют эшерихии, 7,1% – сальмонеллы, 5,1% – клостридии, 5,7% – пастереллы, 0,8% – стафилококки, 0,1% – коринебактерии, 15,4% – вирусная микрофлора; микстинфекция составила 0,8%. Это не достаточно отражает этиологическую структуру патологии поросят, так как в ветеринарной диагностической лаборатории не проводят исследования на весь перечень потенциальных возбудителей инфекции, что затрудняет разработку мероприятий по управлению эпизоотическим процессом и профилактике заболеваний животных.

Нами в течение 1999–2002 гг. проведены 957 диагностических бактериологических исследования павших и вынужденно убитых поросят с явлениями гастроэнтерита, выявили, что кишечные инфекции поросят в 18,6% обусловлены *Y. enterocolitica*.

Степень вовлеченности сельскохозяйственных животных в формирование и функционирование иерсиниозной инфекции на территории Вологодской области. Установили, что в субпопуляциях сельскохозяйственных животных иерсиниоз функционирует как политипическая инфекция. В условиях региона свиньи оказались наиболее вовлеченными в эпизоотическое проявление иерсиниозов, чем другие виды сельскохозяйственных животных (обнаружены антитела к *Y. enterocolitica*: у овец в 17,7%, у коров – в 49,4%, у свиней – в 76,7%; антитела к *Y. pseudotuberculosis* – у 6,7; 6,9; 26,6% животных соответственно).

Изучили степень вовлеченности популяции свиней различных возрастов в процесс формирования иерсиниозной инфекции. С этой целью антитела к антигенам различных серотипов иерсиний определяли у поросят 35–45-дневного, 60–90-дневного возрастов и свиноматок. У всех возрастных групп свиней выявили наличие антител к 8-ми иерсиниозным антигенам, но преобладали антитела к иерсиниям серогрупп 0:9; 0:5,27. Бактериологические находки иерсиний у свиней составили 18,6 %.

Функционирование иерсиниозной инфекции среди свободно живущих мелких млекопитающих. На основании материалов санэпидслужбы провели анализ результатов серологического исследования сывороток крови диких и синантропных мелких млекопитающих. Установили, что из 17 видов, исследованных на наличие ретроспективных показателей иерсиниозов, циркуляция *Y. pseudotuberculosis* установлена у 11 и *Y. enterocolitica* – у 13 видов мелких млекопитающих в природных и хозяйственных очагах. Наибольшая доля иммунологических находок антител к *Y. enterocolitica* имеет место у диких мелких млекопитающих.

При изучении хозяйниного состава иерсиниозной инфекции проанализировали результаты бактериологического исследования обитателей природных

биотопов и объектов эпизоотолого-эпидемиологического «риска». Представленный материал указывает на их значительную зараженность иерсиниями. Основным резервуаром иерсиний оказались: серые крысы (зараженность 4,8%), домовые мыши (7,2%), рыжие полевки (1,8%), лесные мыши (6,7%), темные полевки (3,6%), полевые мыши (2,8%). Причем, в наибольшей степени заражены иерсиниями мелкие млекопитающие, обитающие на объектах животноводства.

Эпидемиологическое проявление иерсиниозов на территории Вологодской области. Проведен анализ заболеваемости населения инфекциями, обусловленными иерсиниями, за период с 1992 года. Заболеваемость псевдотуберкулезом в области во все годы значительно ниже среднереспубликанской, на долю вспышечной приходится 30,0% случаев. Для иерсиниоза характерна спорадическая заболеваемость, в отдельные годы превышающая среднероссийский уровень. Основная доля больных иерсиниозом (80%) и псевдотуберкулезом (65%) зарегистрирована в центральной части области, где развито сельское хозяйство и имеются благоприятные условия для существования мелких млекопитающих. Обе инфекции имеют весенне-летнюю сезонность с повторным подъемом заболеваемости псевдотуберкулезом в ноябре-январе, иерсиниозом – в октябре-ноябре.

Установили, что у 22% больных возникновение заболевания связано с употреблением продуктов животного происхождения и контактом с сельскохозяйственными животными.

Выявили статистически достоверные различия в иммунной структуре к возбудителям иерсиниоза и псевдотуберкулеза у животноводов, персонала предприятий, перерабатывающих животноводческое сырье, работников торговли и в группе населения, профессионально не связанной с риском инфицирования иерсиниями.

Определили корреляционную зависимость ($r = +0,860$) ретроспективных показателей иерсиниоза у населения от общей численности свиней в Вологодской области.

Биологические свойства иерсиний, изолированных от теплокровных животных, людей и из окружающей среды. Провели сравнительную оценку антигенного пейзажа культур *Y. enterocolitica*, изолированных из разных источников. Установили, что культуры *Y. enterocolitica*, выделенные от свиней и из продуктов животного происхождения, относились к 9 серологическим типам, от синантропных грызунов и из овощей к - 8 серотипам, от диких мелких млекопитающих - к 3 серотипам.

Наиболее распространенными в патологии свиней являлись *Y. enterocolitica* серотипов O:6,30; O:6,31; O:5; O:5,27; O:4,32; O:4,33; реже O:7,8; O:9; O:3; к нетипируемым культурам отнесено 41,0% штаммов. В воздухе свинарников *Y. enterocolitica* в 37,5% представлены серотипами O:6,30; O:6,31 по 25% штаммов O:9 и O:5; O:5,27; культуры из кормов для поросят принадлежали к сероти-

пам О:3; О:6,30; О:6,31; О:9. Кишечная патология людей, обусловленная всеми серотипами *Y. enterocolitica*, обладала чертами зооантропонозной инфекции.

Установили, что среди свиней и в продуктах животного происхождения циркулируют *Y. enterocolitica* всех биотипов с преобладанием V, I, IV у свиней и I биотипа в мясных и молочных продуктах. Из материала от людей и с овощей выделялись культуры I, II, III, IV биотипов, от синантропных мелких млекопитающих – I, II, IV, V биотипов, а от диких мелких млекопитающих – только I биотипа.

От поросят, больных тяжелыми и среднетяжелыми формами гастроэнтерита и из трупного материала преимущественно выделялись патогенные (СВИ+) *Y. enterocolitica* V биотипа, серотипов О:5,27; О:6,30; О:6,31. От здоровых поросят были выделены *Y. enterocolitica* преимущественно I биотипа, серотипов О:6,30; О:5,27; О:4,33, в 20% случаев содержащие плазмиду вирулентности, эти же серотипы I биотипа выделены от людей.

Определили патогенность 20 штаммов *Y. enterocolitica*, выделенных от поросят, для белых мышей: 17 изолятов относились к семи серотипам и пяти биотипам, в том числе 11 – агглютинировались в сыворотке СВИ; 3 штамма были нетипирующимися, но 2 из них агглютинировались в СВИ. Установили, что *Y. enterocolitica* в дозе $5 \cdot 10^8$ КОЕ патогенны для мышей, независимо от способности агглютинироваться в СВИ.

Эффективность антимикробных препаратов при лечении и профилактике иерсиниоза. Изучили клиническую картину иерсиниоза у 1215 поросят. Установили, что болезнь поражает поросят всех возрастов, при этом болеют как слабые, так и сильные, хорошо развитые животные.

Наряду с манифестацией, у части поросят имеет место асимптомное течение иерсиниоза. От больных, павших и вынужденно убитых поросят в 18,6% случаев изолированы *Y. enterocolitica*, специфические антитела обнаружены у 37,7% 30 - 60-дневных и у 24,4% 60 - 90 - дневных больных иерсиниозом животных.

Двадцати поросят с бессимптомным течением иерсиниоза поставлены РА с аутоштаммами иерсиний. Антитела к аутокультурам были обнаружены у 16 поросят в титрах 1:160–1:320 это подтверждает значимость иерсиний как возбудителей инфекции даже при ее бессимптомном течении.

Изучили микробиоценоз кишечника здоровых, больных иерсиниозом и подвергнутых лечению поросят-отъемышей. Установили, что у здоровых животных в фекалиях в большем количестве присутствует резидентная микрофлора, в то время как у больных иерсиниозом поросят в фекалиях присутствовали иерсинии различных серотипов, лактозонегативные и гемолизирующие кишечные палочки, гемолизирующие стрептококки.

После лечения больных животных при иерсиниозной инфекции антибиотиками в комплексе с бифидумбактерином произошло восстановление нормальной кишечной микрофлоры.

Для правильной тактики этиотропной терапии больных иерсиниозом поросят определяли чувствительность культур возбудителей к 23 антимикробным препаратам с использованием систем индикаторных бумажных дисков.

Наиболее чувствительными испытуемые культуры иерсиний оказались к энрофлоксацину, гентамицину, канамицину.

Больных иерсиниозом поросят 30–55 дневного возраста разделили на три опытных и контрольную (по 120 голов) группы. В опытных группах лечение поросят при иерсиниозе провели антибиотиками. Для этого однократно в течение 3-х дней вводили внутримышечно: первой группе – 5% раствор канамицина в дозе 0,3 мг на 10 кг живой массы; второй группе – 4% раствор гентамицина в дозе 1,5 мл на 10 кг живой массы; третьей группе – 5% раствор энрофлоксацина в дозе 0,3 мг на 10 кг массы поросенка.

Контрольную группу поросят лечили по схеме, принятой в хозяйстве: йодинол по 3–5 мл/гол. 1 раз в день, ронидазол по 75,0 мг/гол. 2 раза в сутки. Наблюдение за клиническим состоянием поросят вели в течение 25 дней. Манифестация болезни в среднем составляла: в первой группе – 1 день, во второй – 2, в третьей группе – 2,5, в контрольной группе – 2,5 дня, падеж животных – 0,8; 2,6; 3,2; 3,9% (соответственно), а стоимость всего курса лечения одного животного – 5,43; 5,87; 7,98; 2,64 рубля соответственно.

В целях экстренной профилактики иерсиниоза поросьятам 30–55-дневного возраста также применяли энрофлоксацин: из 120 животных заболел только 1 (0,8 %) – это в 15 раз меньше, чем в контрольной группе.

В связи с отсутствием специфической профилактики иерсиниозов, испытывали эффективность бифидумбактерина и спленивита – экстракта селезенки крупного рогатого скота с добавлением витамина В₁₂, изготовляемыми в Вологодской НИВС, для профилактики иерсиниоза у 60 - 90-дневных поросят. С этой целью в первом эксперименте 600 поросьятам опытной группы 2 раза в сутки в течение трех дней давали бифидумбактерин в дозе 5–7 мл/гол. Во втором эксперименте участвовало 122 головы поросят: 1-й опытной группе (31 поросенок) вводили спленивит внутримышечно по 1 мл 3 раза в день с интервалом 7–10 дней; 2-й группе поросят (29 голов) по той же схеме вводили неспецифический гамма-глобулин; в 3-й группе поросят (62 головы) вышеуказанные препараты не применяли. Клиническое наблюдение за всеми поросьятами вели в течение 1,5 месяцев, начиная со дня формирования групп на откорме. Данные экспериментов показали, что использование бифидумбактерина снизило заболеваемость иерсиниозом в опытной группе по сравнению с контролем в 1,86 раза; при применении спленивита в течение 1,5 мес. ни один поросенок не заболел, в то время как в контрольных группах заболело иерсиниозом 76 и 96 % поросят соответственно.

Протективная активность иерсиниозных антигенов. В опытах на морских свинках установили, что ЛПС *Y.pseudotuberculosis* обладает протективной защитой, обеспечивает снижение интенсивности размножения иерсиний в орга-

нах и тканях животных. Защитный эффект существенно возрастал при иммунизации лабораторных животных комплексами компонентов из микробных клеток липополисахаридной и белковой природы (сочетание ЛПС с БНМ). Иммунизация этим препаратом животных создавала более длительную защиту (не менее 3-х месяцев – срок наблюдения). При этом отмечалась преимущественно персистенция иерсиний в кишечнике на фоне индуцированных антител (к антигенам ЛПС и БНМ), что препятствовало развитию генерализации возбудителя и способствовало быстрой его элиминации из организма.

Опыт показал, что такие комплексные препараты могут быть использованы в профилактических целях на территориях с интенсивной циркуляцией иерсиний, особенно в животноводческих хозяйствах, где регистрируется гастроинтестинальная иерсиниозная патология.

Совершенствование микробиологической диагностики иерсиниоза и псевдотуберкулеза. Разработана и испытана в полевых условиях пептонно-калиевая среда (ПК) накопления для иерсиний. Диагностическую эффективность новой среды оценивали при исследовании объектов внешней среды и патологического материала от животных: с использованием среды ПК выделено на 26% иерсиний больше, чем на среде БКД и на 22% больше, чем на среде ФБР. Культуры иерсиний с накоплением в среде ПК изолированы в более ранние сроки (70% в первые 2–3 суток), что свидетельствует о ее значительном преимуществе. По стоимости среда ПК дешевле среды БКД в 8 раз, что позволяет удешевить бактериологическое исследование.

Повысить диагностическую эффективность среды стало возможным путем применения щелочения материала перед посевом, что позволило выделить в 2 раза больше иерсиний при высеве со среды накопления на 4 - 5 сутки.

Микробиологический мониторинг в системе эпизоотологического надзора за иерсиниозами сельскохозяйственных животных. На основании проведенных исследований на территории с широкой циркуляцией иерсиний нами унифицирована тактика микробиологического мониторинга за иерсиниозами для учреждений госветнадзора, а также методы и средства его проведения.

Разработаны и внедрены в деятельность лабораторной службы схемы подготовки исследуемого материала и первичной индикации и идентификации иерсиний. Это позволяет усовершенствовать лабораторную диагностику иерсиниоза и псевдотуберкулеза в практических ветеринарных лабораториях.

ВЫВОДЫ

1. В патологии свиней в условиях Вологодской области важное место занимает иерсиниозная инфекция. На ее долю приходится $18,6 \pm 0,9$ % от общего количества острых желудочно-кишечных расстройств у поросят в свиноводческих хозяйствах.

2. Иерсиниозная инфекция в регионе функционирует как инфекционная паразитарная система, соактантами которой являются и сельскохозяйственные

животные и в первую очередь свиньи различных возрастов, а также *Yersinia enterocolitica* различных биотипов и сероваров.

2.1. От поросят, больных тяжелыми и среднетяжелыми формами гастроэнтеритов, и из трупного материала преимущественно изолируются патогенные (СВИ+) *Y. enterocolitica* V биотипа, серотипов O:5,27; O:6,30; O:6,31; от клинически здоровых поросят (носителей иерсиний) изолируются *Y. enterocolitica* преимущественно I биотипа, серотипов O:6,30; O:5,27; O:4,33, в 20% случаев содержащие плазмиду вирулентности. Эти же серотипы иерсиний I биотипа изолированы и от людей.

2.2. Источником возбудителя при инфицировании свиней *Y. enterocolitica* V биотипа являются синантропные грызуны.

3. Наиболее поражаемыми иерсиниозом в Вологодской области оказались животноводы, работники перерабатывающей промышленности и общественного питания. Значительная доля сероконверсий к *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* у этих групп населения по сравнению с другими подтверждает специфический механизм передачи возбудителя через инфицированные продукты животного и растительного происхождения, а также эпидемиологическую значимость сельскохозяйственных животных в распространении иерсиний.

4. Полученные от животных изоляты иерсиний оказались высокочувствительными к энрофлоксацину. При его применении в сравнении с контролем продолжительность переболевания поросят иерсиниозом сокращается на 1,5 дня; в 5 раз сокращается уровень летальных исходов, на 21 грамм увеличивается суточный прирост живой массы поросят. Эффективными средствами профилактики иерсиниоза поросят в регионе оказались бифидумбактерин и спленивит, изготавливаемые Вологодской НИВС.

5. Использование новой пептонно-калиевой (ПК) среды накопления в сравнении с традиционными средами значительно повышает скорость размножения в ней иерсиний, а следовательно и разрешающую способность бактериологического исследования, сокращая сроки его проведения.

5.1. Однократное щелочение проб биоматериала животного и растительного происхождения перед посевом в среду накопления повышает результативность диагностики при массовых эпизоотологических исследованиях свиней на иерсиниоз.

6. Липополисахаридный комплекс *Y. pseudotuberculosis* (ЛПС) в сочетании с белками наружной мембраны (БНМ) стимулирует выработку полноценных противоиерсиниозных антител и в перспективе может быть использован для специфической защиты животных от иерсиниозов.

7. Внедрение разработанной научно обоснованной системы микробиологического мониторинга за иерсиниозами, с использованием доступных для практических ветеринарных лабораторий методов исследований подтвердило

ее востребованность и эффективность и позволило управлять эпизоотическим процессом иерсиниозов животных.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ:

1. Новая пептонно-калиевая среда для накопления иерсиний
2. Схема идентификации иерсиний, упрощающая проведение исследований в практических лабораториях.
3. Программа унифицированного микробиологического мониторинга иерсиниозов в условиях крупного сельскохозяйственного региона.
4. Методические рекомендации «Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз – этиология, эпизоотология, лабораторная диагностика у сельскохозяйственных животных» (Вологда, 2003).
5. Иерсиниозы животных (диагностика, меры борьбы). Учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности 110502 «Ветеринария» (Н.Новгород, 2004).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Масанская, В.В. Профилактика гастроэнтеритов новорожденных поросят на промышленных комплексах / В.В. Масанская, А.П. Горбунов, В.Н. Макарова // Прогнозирование и диагностика, меры профилактики и борьбы с различными заболеваниями животных в условиях НЗ РФ: Сб. научн. тр. – СПб., 1994. – С. 56.
2. Масанская, В.В. Показатели естественной резистентности поросят в промышленных комплексах / В.В. Масанская, В.Н. Макарова // Прогнозирование и диагностика, меры профилактики и борьбы с различными заболеваниями животных в условиях НЗ РФ: Сб. научн. тр. – СПб., 1994. – С. 57.
3. Масанская, В.В. Влияние некоторых факторов на показатели естественной резистентности поросят / В.В. Масанская, А.П. Горбунов, В.Н. Макарова // Состояние и перспективы развития научных исследований по профилактике и лечению болезней сельскохозяйственных животных и птиц: Матер. научн. конф., посвященной 50-летию Краснодарской НИВС. – Краснодар, 1996. – С. 153.
4. Масанская, В.В. Использование тканевого антигена для профилактики гастроэнтеритов новорожденных поросят / В.В. Масанская, А.П. Горбунов, В.Н. Макарова // Повышение эффективности внедрения научных разработок в сельскохозяйственное производство: Сб. научн. тр. ВГМХА им. В.Н. Верещагина. – Вологда-Молочное, 1998. – С. 51–53.
5. Проблемы профилактики зооантропонозных болезней в современных условиях / Н.А. Рыбакова, Е.Н. Агиевич, В.Н. Макарова // Перспективные направления научных исследований молодых ученых Северо-Запада России: Сб. научн. тр. молодых ученых и аспирантов, посв. 75-летию аспирантуры ВГМХА им. Н.В. Верещагина. – Вологда-Молочное, 2001. – С. 97–101.
6. Экологические аспекты иерсиниозных инфекций на территории Вологодской области / Е.Ю. Смирнова, Н.А. Рыбакова, В.В. Масанская, В.Н. Макарова [и др.] // Проблемы экологии на пути к устойчивому развитию регионов: Мат. Междунар. научно-техн. конф. – Вологда, 2001. – С. 151–153.
7. Эпидемиологическая характеристика природно-очаговых зоонозов в Вологодской области / Н.А. Рыбакова, Е.Н. Агиевич, Д.М. Кондаков, В.Н. Макарова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2001.– №4. – С. 8–11.
8. Псевдотуберкулез и иерсиниоз: эпидемиологические и экологические особенности на территории Вологодской области / Е.Ю. Смирнова, Н.А. Рыбакова, В.В. Масанская, В.Н. Макарова [и др.] // Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова. – 2001.– №2-3. – С. 22.

9. Эпидемиологические и экологические особенности иерсиниозов в Вологодской области / Н.А. Рыбакова, В.В. Масанская, В.Н. Макарова [и др.] // Проблемы ветеринарии на рубеже веков: Сб. научн. тр. Нижегородской сельскохозяйственной академии. – Н. Новгород, 2001. – С. 58–61.
10. Monitoring the Infections Caused by *Yersinia* in the European North of Russia / E.Y. Smirnova, N.A. Rybakova, G.Y. Tseneva, N.A. Evsiukova, R.G. Litvinova, L.A. Chumakova, W.N. Makarova // 8 th International Symposium on *Yersinia* (September 4-8, 2002). – Turku, Finland, 2002. – P. 87–88.
11. Циркуляция иерсиний среди свиней в хозяйствах Вологодской области и их эпизоотическая и эпидемическая значимость / В.Н. Макарова, В.В. Масанская, Н.А. Рыбакова, Е.Ю. Смирнова // Состояние и перспективы внедрения достижений ветеринарной науки и практики в сельскохозяйственное производство: Научно-произв. конф., посвящ. 70-летию Вологодской НИВС. – Вологда, 2002. – С. 73–75.
12. Характеристика штаммов *Yersinia enterocolitica*, выделенных от животных в Вологодской области / Масанская В.В., Макарова В.Н., Морозина З.Н., Попова Н.В. // Состояние и перспективы внедрения достижений ветеринарной науки и практики в сельскохозяйственное производство: Научно-произв. конф., посвящ. 70-летию Вологодской НИВС. – Вологда, 2002. – С. 75–77.
13. Иерсиниозная инфекция в Вологодской области / Е.Ю. Смирнова, Н.А. Рыбакова, Н.А. Евсюкова, Р.Г. Литвинова, Л.А. Чумакова, Т.Н. Николаева, В.Н. Макарова // Современные вопросы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения: Региональная научно-практ. конф., посвящ. 100-летию больницы Петра Великого. – Вологда, 2002. – С. 305–309 .
14. Макарова, В.Н. Иерсиниоз свиней / В.Н. Макарова, В.В. Масанская, А.В. Курашова // Проблемы ветеринарной медицины в условиях реформирования сельскохозяйственного производства: Юбил. научно-практ. конф., посвящ. 35-летию ГУ «Прикаспийский НИВИ». – Махачкала, 2003. – С. 72–73.
15. Псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз (экология, эпизоотология, лабораторная диагностика у сельскохозяйственных животных): Методические рекомендации / Н.А. Рыбакова, В.Л. Щекотуров, Г.Я. Ценева, М.В. Адрияхова, Е.Ю. Смирнова, В.Н. Макарова, В.В. Масанская // – Вологда, 2003. – 43 с.
16. Иерсиниозы животных (диагностика, меры борьбы): Учебно-методическое пособие / А.В. Аринкин, А.Б. Тебекин, Д.А. Мамлеева, В.Н. Макарова [и др.] // - Новгород, 2004. - 78 с.
17. Макарова, В.Н. Иерсиниоз поросят в промышленном свиноводстве Вологодской области / В.Н. Макарова // Материалы научно – произв. конф. преподавателей и аспирантов фак. ветер. Медицины ВГМХА. им. Н.В. Верещагина. – Вологда-Молочное, 2005. – С. 28–30.

18. Макарова, В.Н. Лечение иерсиниоза поросят / В.Н. Макарова // Материалы научно – производственной конференции преподавателей и аспирантов факультета ветеринарной медицины. – Вологда-Молочное, 2005. – С. 23–32.
19. Макарова, В.Н. Лечение и профилактика иерсиниоза свиней /В.Н. Макарова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных: Мат. Международной научно-практ. конф., посвященной 100 – летию со дня рождения Я.Р. Коваленко. – Москва: ВИЭВ, 2006 – С. 220–223.
20. Чувствительность иерсиний к противомикробным препаратам при терапии иерсиниозов свиней / В.Н. Макарова, А.Б. Тебекин, Е.Ю. Смирнова, Н.А. Рыбакова // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Мат. Второй научн.-практ. конф. С международ. участием. – СПб.: НИИЭМ им. Пастера, 2006. – С. 94–96.

МАКАРОВА ВЕРА НИКОЛАЕВНА

ИЕРСИНИОЗ СВИНЕЙ В УСЛОВИЯХ
КРУПНОГО СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО РЕГИОНА
(ЭПИЗООТОЛОГИЯ, МЕРЫ БОРЬБЫ, ЛАБОРАТОРНОЕ
ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Компьютерный набор и верстка *Шакерова Э.Н.*

Формат 60/84 1/16. Печать трафаретная. Бумага офсетная.
Усл. печ. л. – 1,4. Тираж 100 экз. Заказ № 02/1106

Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия
603107, г. Н. Новгород, пр. Гагарина, 97

Отпечатано издателем Ю.А.Николаевым
603073, Н.Новгород, Таганская, 6 -29