

**На правах рукописи**

Довбыш Вера Сергеевна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ  
*Yersinia enterocolitica***

16.00.03 - Ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией  
и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

МОСКВА 2004



Работа выполнена на кафедре инфекционных и паразитарных болезней Московского государственного университета прикладной биотехнологии (МГУПБ) Министерства Российской Федерации

**Научный руководитель** — доктор ветеринарных наук,  
Е.М. Ленченко (МГУПБ)

**Официальные оппоненты** - доктор ветеринарных наук, профессор  
Д.И. Скородумов (МГУПБ)

— кандидат ветеринарных наук  
О.Д. Складов (ФГУ ВГНКИ)

**Ведущая организация:** Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко (ВИЭВ).

Защита состоится *27 «февраля»* 2004 г. в *16<sup>00</sup>* часов на заседании диссертационного совета Д212.149.03. в Московском государственном университете прикладной биотехнологии (109316, Москва, ул. Талалихина, 33).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУПБ.

Автореферат разослан *26 января* 2004 г.

Ученый секретарь диссертационного  
совета, доктор ветеринарных наук



Смирнова И.Р.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Одной из задач ветеринарной службы является контроль безопасности пищевых продуктов по микробиологическим показателям (СанПиН 2.3.2.1078-01).

В последнее десятилетие ассортимент пищевых продуктов непрерывно расширяется, увеличивается доля импортных основных и вспомогательных материалов, изменяется порядок заготовки сырья для изготовления мясных изделий. При этом холодильная обработка приобретает одно из первостепенных значений, что обуславливает необходимость изучения биологических свойств малоизученных психрофильных микроорганизмов, в частности *Yersinia enterocolitica*.

Благодаря исследованиям А.Б. Дайтера и соавт. (1987); Н.Ф. Тимченко (1989); Г.В. Ющенко (1989); Н.Н. Беседновой, Ю.Е. Полоцкого (1992); И.В. Смирнова (1992); Г.Г. Гурлевой (1994); В.Ю. Литвина (1999); ГЛ. Ценевой (2000); А.Р. Мавзютова (2001); R.R. Brubaker (1983); G. Carperud et al. (1987); R.M. Robins-Browne et al. (1993); B. China et al. (1994); G. Cornelis et al. (1994) и др., доказана роль *Y. enterocolitica* в этиологии болезней человека, протекающих по типу пищевой токсикоинфекции. Установлено, что генотип патогенных штаммов иерсиний включает хромосомные и плазмидные детерминанты, кодирующие образование факторов патогенности.

Для ветеринарной практики методы выделения *Y. enterocolitica* и определения патогенности не унифицированы, что приводит к получению противоречивых данных. При проведении эпизоотологических исследований в ряде регионов страны установлено, что микроорганизмы *Y. enterocolitica* могут явиться этиологическим фактором желудочно-кишечных заболеваний животных раннего постнатального периода. Наряду с этим указанные микроорганизмы чрезвычайно широко распространены в объектах внешней среды (А.Ф. Бабкин и соавт., 1987; Е.А. Кирьянов, И.И. Савчук, 1988; А.В. Куликовский и соавт., 1988; В.С. Ефремов, 1990; СИ. Куцевалов, 1991; М.П. Елезов, 1994; Л.С. Каврук, 1995; В.А. Сабурин, 1995; К.В. Шумилов, Л.П. Мельниченко, 1996; В.Г. Скрыпник, А.В. Митрофанов, 1997; А.С. Собакин, Л.Ф. Зыкин, 1998; В.К. Тихонов, 1999; Е.М. Ленченко, 2000; З.Ю. Хапцев, 2000; Р.Б. Корочкин, 2003).

Наличие перекрестных серологических реакций *Y. enterocolitica* 09 с представителями рода *Brucella* обуславливает получение ложноположи-



тельных результатов при исследовании сыворотки крови животных из благополучных по бруцеллезу хозяйств (В.С. Ефремов, 1995; Л.П. Мельниченко и соавт., 2001; Т.С. Астахова, 2002; В.Б. Кузьмина, 2002).

Сельскохозяйственные животные являются основным источником возбудителя инфекции, а продукты животного происхождения - ведущими факторами передачи возбудителя иерсиниоза человеку (Санитарные правила. 3.1.094-96; Ветеринарные правила 13.3.1318-96). В этой связи изучение биологических свойств указанных микроорганизмов представляет социальную значимость. Изыскание эффективных дифференциально-диагностических питательных сред для индикации микроорганизмов *Y. enterocolitica* в различных объектах, а также научное обоснование определения патогенных свойств эпизоотических штаммов иерсиний, являются актуальными для ветеринарной медицины.

Цель исследований: изучить факторы патогенности для усовершенствования индикации вирулентных штаммов *Y. enterocolitica*.

Задачи исследований:

1. Определить оптимальную дифференциально-диагностическую питательную среду для выделения и первичной идентификации *Y. enterocolitica*.

2. Изучить морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства энтеробактерий, выделенных из патологического материала, фекалий поросят и телят, кормов и продуктов животного происхождения.

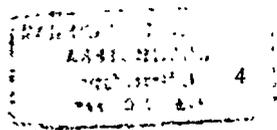
3. Изучить чувствительность к антибиотикам и межвидовой антагонизм музейных штаммов и выделенных из различных объектов культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*.

4. Изучить адгезивные и инвазивные свойства *Y. enterocolitica*.

5. Подобрать доступный для воспроизведения в практических лабораториях метод определения энтеротоксигенности *Y. enterocolitica*.

6. Изучить морфологические изменения в тканях лабораторных мышей при воздействии энтеротоксина *Y. enterocolitica*.

Научная новизна. Научно обоснованы и предложены методы выявления энтеротоксигенности у культур *Y. enterocolitica*. Экспериментальными исследованиями установлены критерии оценки вирулентности у выделенных культур *Y. enterocolitica*. Определен видовой и количественный состав бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *Y. enterocolitica*,



выделенных из репрезентативной выборки объектов ветеринарно-санитарного надзора.

**Практическая значимость.** Установлено, что дифференциально-диагностическая среда с бромтимоловым синим (СБТС) является оптимальной для выделения и первичной идентификации *Y.enterocolitica* от таксономически близких бактерий по сравнению со средами Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агаром.

Для определения энтеротоксигенности культур *Y.enterocolitica* предложено использовать плантарный тест на лабораторных мышах.

Изданы и внедрены в учебный процесс МГУПБ: методические указания к самостоятельной работе студентов ветеринарно-санитарного факультета по теме «Иерсиниоз как пищевая токсикоинфекция» (М., МГУПБ, 2001).

**Апробация материалов диссертации.** Основные результаты диссертационной работы доложены и одобрены на заседаниях кафедры инфекционных и паразитарных болезней МГУПБ (Москва, 2001-2003 гг.); Международной научно-практической конференции: «Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях» (Воронеж, 2002); 4-ой международной научно-практической конференции: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции» (М., 2002); 2-ой международной научной конференции студентов и молодых ученых: «Живые системы и биологическая безопасность населения» (М., 2003).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

- Сравнительная оценка дифференциально-диагностических питательных сред для выделения *Y.enterocolitica*.
- Видовой состав энтеробактерий, выделенных из объектов ветеринарно-санитарного надзора.
- Характеристика факторов патогенности *Y.enterocolitica*.

**Объем и структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, библиографии. Работа изложена на 135 страницах машинописного текста, содержит 14 таблиц, 1 схему, 46 рисунков. Библиографический список включает 204 источника, из них 100 - иностранных авторов.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в период с 2000 по 2003 гг. на кафедре инфекционных и паразитарных болезней МГУПБ и на базе Подольской зональной ветеринарной лаборатории. Часть исследований проводили в ФГУ ВГНКИ.

В работе использовали паспортизированные штаммы: *Y.enterocolitica* 03, №134; *Y.enterocolitica* 09, №383; *Y.enterocolitica* 08, №161; *Y.enterocolitica* 05.27, №885; *E.coli* O141:K87:K88, №727; *Cfreundii* №33/57; *E.aerogenes* ССМ 2531; *S.typhimurium* №5715; *S.aureus* №123; полученные из коллекции ФГУ ВГНКИ, Государственного НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, а также культуры микроорганизмов, выделенные нами от поросят, телят, из кормов и продуктов животного происхождения.

С целью выделения микроорганизмов *Y.enterocolitica* исследовали патологический материал от 60 телят в возрасте до 14 сут. и 60 поросят в возрасте до 4 мес, павших от желудочно-кишечных заболеваний невыясненной этиологии, а также по 60 проб фекалий от поросят и телят с диареей; 45 проб кормов - комбикорм, мясокостная мука, СК-58, СК-5, овес, пшеница, ячмень, отруби, патока свекольная, добавка свиная, добавка детская для поросят, добавка для свиней, добавка для коров; 150 проб свины заморозенной и 40 проб языков свиных охлажденных и замороженных.

Исследования проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями» (1999).

Сравнительное изучение ростообеспечивающих и дифференциальных свойств сред Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит-агара - ВСА (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), «Среды с бромтимоловым синим» - СБТС (ГНЦ ПМ, г. Оболенск) проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями к контролю питательных сред по биологическим показателям» (1980) и «Инструкцией по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для чумного микроба» (1984).

Отбор проб комбикормов и сырья, используемого при его производстве, проводили по ГОСТ 13496 0-80, зерна - по ГОСТ 13586.3-83, мясокостной муки - по ГОСТ 25311 -82.

Пробы пищевых продуктов для бактериологических исследований отбирали в количествах, предусмотренных нормативными документами:

ГОСТ 26668-85 (СТСЭВ 3013-81), ГОСТ 7269-79, СанПиН, исследовали в соответствии с ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 30518-97 (ГОСТ Р 50474-93), ГОСТ 30519-97 (ГОСТ Р 50480-93), «Методическими указаниями по выявлению *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* в пищевых продуктах животного происхождения» (1998). На первом этапе проводили холодное обогащение материала в 1%-ной пептонной воде с добавлением  $K_2HPO_4$ .

Идентификацию выделенных культур проводили, руководствуясь «Определителем бактерий Берджи» (1997). Морфологические и культуральные свойства изучали, используя общепринятые методы и стандартные питательные среды (Ф. Герхардт и соавт., 1984; М.А. Сидоров и соавт., 1995).

Биохимические свойства бактерий изучали общепринятыми методами, а также с использованием СИБ (Н. Новгородский НИИ экспериментальной микробиологии) по прилагаемой инструкции.

Биовары *Y. enterocolitica* определяли по методике Г.В. Ющенко, В.И. Дунаева (1981).

Серологические варианты выделенных культур *Y. enterocolitica* определяли в реакции агглютинации на стекле с помощью типовых адсорбированных кроличьих сывороток к эталонным штаммам иерсиний сероваров 03 и 09 (производство СПб НИИЭМ им. Пастера).

Чувствительность к антибиотикам изучали методом диффузии в агар (СМ. Навашин, И.П. Фомина, 1974), антагонистические свойства — методом агаровых блочков на плотных питательных средах (Н.С. Егоров, 1979).

Вирулентность культур микроорганизмов определяли путем внутрибрюшинного заражения белых мышей массой 14-16 г и выражали в  $LD_{50}$ .

Свойства иерсиний, связанные с наличием плазмиды вирулентности: способность к аутоагглютинации, зависимость бактериального роста от концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в среде при 37 °С, зависимость размеров колоний от температуры определяли согласно инструкции «Эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий» (1990).

Адгезивные свойства микроорганизмов изучали методом В.И. Брилис и соавт. (1986) с использованием формализированных эритроцитов барана.

Степень инвазивности и цитотоксичности иерсиний определяли путем заражения клеточной линии Нер-2 (ГЛ. Ценева и соавт., 1986).

Гемолитическую активность оценивали качественно после посева и культивирования суточной агаровой культуры на МПА с содержанием 5 % стерильной крови барана (А.С. Лабинская, 1984).

Энтеротоксигенность выделенных культур оценивали в плантарном тесте на мышках массой 14-16 г по методу Ю.П. Вартаняна и соавт. (1978) и на мышках-сосунках по методу Н.И. Романенковой и соавт. (1980).

Для гистологических исследований пробы обрабатывали общепринятыми методами (О.В. Волкова и соавт., 1987).

Результаты опытов подвергали статистической обработке общепринятым методом по И.П. Ашмарину, Л.А. Воробьеву (1962), константным методом по Н.В. Садовскому (1975) и с использованием компьютерной программы «Статистическая диалоговая система Stadia» (1992).

Выражаем благодарность д-ру вет. наук М.К. Пирожкову, под руководством которого выполнен раздел по апробации методов определения энтеротоксигенности на культурах эшерихий, и директору Подольской зональной ветеринарной лаборатории М.Е. Кузнецовой за оказание консультативной помощи.

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1. Определение оптимальной дифференциально-диагностической питательной среды для выделения *Y.enterocolitica***

Объектом исследований служили культуры *Y.enterocolitica*, *E.coli*, *S typhimurium*, *S.aureus*, а также среды Эндо, Левина, Плоскирева, ВСА и СБТС. Результаты исследований представлены в табл. 1.

На среде Эндо через 18 ч культивирования бактериальные клетки *Y.enterocolitica* формировали круглые, выпуклые, с ровными краями, прозрачные, бесцветные, диаметром 0,2-0,5 мм колонии, 48-часовые культуры приобретали розовый оттенок в центре колоний и увеличивались в размере до 2,0 мм. *E.coli* росли, образуя круглые, темно-красные или малиновые, диаметром 1,0-4,0 мм колонии; *S.typhimurium* — прозрачные, слегка голубоватые или светло-серые, диаметром 1,0-4,0 мм. Дифференцировать иерсинии по характеру роста от лактозоотрицательных бактерий и эшерихий со слабой лактозной активностью оказалось затруднительным. Кроме того, нерсинии в первой генерации на среде Эндо росли в виде росинчатых, трудно различимых колоний, и зачастую их рост подавлялся сопутствующей микрофлорой.

## Сравнительная оценка питательных сред

Среды	Сравниваемые признаки					
	Характеристика типичных колоний, 28 °С			Скорость роста Y. enterocolitica, ч	Чувствительность среды при посеве 100 кл.	Ингибирующие свойства
	Y. enterocolitica	E. coli	S. typhimurium			
Эндо	1,5-2,0 мм, прозрачные, бесцветные	1,0-4,0 мм, прозрачные, темно-красные	1,0-4,0 мм, прозрачные, бесцветные	Росинчатые колонии 0,2-0,5 мм выросли через 18 ч; 48-часовые приобретали розовый оттенок в центре, диаметр до 2,0 мм	59,0±0,5	Подавляет рост тест-штамма S. aureus
Левина	1,0-4,0 мм, светло-сиреневые, иногда с темным центром, неправильной формы	1,0-2,0 мм, темно-фиолетовые	1,0-2,0 мм, прозрачные, с фиолетовым оттенком	Отбор колоний затруднен из-за разной морфологии и окраски	22,0±1,3	Подавляет рост тест-штамма S. aureus
Плоскирева	1,0-1,5 мм, прозрачные бесцветные	1,5-2,5 мм, розовые	1-2 мм, бесцветные	Незначительное количество колоний через 48-72 ч	18,0±1,5	Подавляет рост тест-штамма S. aureus
ВСА	0,5-1,0 мм, светло-коричневые	1,0-2,0 мм бесцветные, зеленоватые	2,0-3,0 мм, черные	Колонии формировались через 48-72 ч	12,0±1,2	Подавляет рост тест-штамма S. aureus
СБТС	1,5-2,0 мм, непрозрачные, сине-зеленые	2,0-3,0 мм, непрозрачные, желтые	1,0-2,0 мм, непрозрачные, желтые	Колонии 0,2-0,5 мм формировались через 18 ч, типичные колонии - через 48 ч	62,0±2,0	Подавляет рост тест-штамма S. aureus

На среде Левина рост иерсиний проявлялся образованием колоний неправильной формы, светло-сиреневого цвета, иногда с темным центром, достигающих 1,0-4,0 мм в диаметре. *E.coli* на данной среде формировали темно-фиолетовые или черные колонии диаметром 2,0 мм; *S.typhimurium* - прозрачные, с легким фиолетовым или бледно-розовым оттенком, диаметром 1,0-2,0 мм. Варьирующие размеры и схожесть окраски колоний иерсиний с колониями других бактерий затрудняли идентификацию.

На среде Плоскирева *Y.enterocolitica* развивались замедленно. Через 48-72 ч росли гладкие, прозрачные, бесцветные, легко снимающиеся петлей колонии диаметром 1,0-1,5 мм; *E.coli* формировали колонии розового цвета, диаметром 1,5-2,5 мм; *S.typhimurium* — гладкие, с ровными краями, слегка выпуклые, влажные, бесцветные, диаметром 1,0-2,0 мм.

На ВСА иерсиний росли также замедленно, в виде мелких светло-коричневых, с ровными краями, диаметром до 1,0 мм колоний; *E.coli* - в виде мелких, бесцветных, зеленоватых или коричневых колоний. Рост *S.typhimurium* регистрировали через 24 ч, колонии были крупные, диаметром 2,0-3,0 мм, пастообразные, интенсивно-черного цвета, по краю колоний выявлялся прозрачный валик, на месте расположения колонии цвет среды изменялся на коричневый.

На СБТС иерсинии через 18 ч культивирования формировали круглые, с ровными краями, выпуклые, непрозрачные, сине-зеленого цвета колонии, размером 0,2-0,5 мм, через 48 ч диаметр колоний увеличивался до 1,5-2,0 мм. *E. coli* на данной среде были представлены круглыми, с ровными краями, выпуклыми, непрозрачными, ярко-желтыми колониями, диаметром 2,0-3,0 мм; *S.typhimurium* - круглыми, с ровными краями, плоскими, непрозрачными, желтыми колониями, диаметром 1,0-2,0 мм.

Среднее количество колоний *Y.enterocolitica*, выросших при посеве суспензии, содержащей около 100 клеток, составило: на среде Эндо  $59,0 \pm 0,5$ ; Левина  $26,0 \pm 1,3$ ; Плоскирева  $18,0 \pm 1,5$ ; ВСА  $12,0 \pm 1,2$ ; СБТС  $62,0 \pm 2,0$ . Биохимические свойства культур иерсиний после выращивания на указанных средах были одинаковыми и не изменялись.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о том, что наиболее благоприятной для иерсиний средой является СБТС, которая обладает более выраженными ростобеспечивающими свойствами и на этой среде морфология колоний более различима с другими энтеробактериями.

### 3.2. Сравнительное изучение дифференциально-диагностических признаков культур *Y. enterocolitica* и сходных энтеробактерий

Из патологического материала и фекалий от телят и поросят, замороженной свинины и свиных языков, а также комбикормов были выделены 367 культур микроорганизмов, отнесенных к семейству Enterobacteriaceae, из них 11 культур идентифицировали как *Y. enterocolitica*.

После холодового обогачения исследуемого материала в 1%-ной пептонной воде с добавлением  $K_2HPO_4$  и последующего посева и культивирования на СБТС и среде Эндо были выделены соответственно 11 и 4 культуры *Y. enterocolitica*. Из патологического материала и фекалий от поросят - 5 культур, от телят - 1 культуру; из свинины и свиных языков - 4 культуры; из комбикормов - 1 культуру. Следует отметить, что КМАФАнМ замороженной свинины было в пределах  $2,0 \times 10^4$  КОЕ/г и  $5,0 \times 10^4$  КОЕ/г, что не превышало значений по СанПиН.

Наряду с иерсиниями из патологического материала и фекалий выделили 328 культур бактерий семейства Enterobacteriaceae. Согласно результатам типирования к виду *E. coli* были отнесены 192; *E. aerogenes* — 11, *S. freundii* - 44, *S. diversus* - 15, *P. mirabilis* - 62, *M. morgani* - 4 культуры. У поросят обнаружили культуры эшерихий серогрупп 08, O20 и 0141, у телят - 08, 09, 026, 078, 0115..

Из кормов выделили 28 культур бактерий, из них *E. coli* - 5, *E. aerogenes* - 14, *S. freundii* - 7, *K. pneumoniae* - 2 культуры.

В мазках из агаровых и бульонных культур *Y. enterocolitica* были представлены грамотрицательными палочками с закругленными концами, овоидной или кокковидной формы, без капсул, одиночно расположенными.

Клетки *Y. enterocolitica* по размеру достоверно не отличались от *S. freundii*, *P. mirabilis* и *E. aerogenes* ( $t_4 < 4,6$  при  $P=0,01$ ) (табл. 2).

Для иерсиний характерной особенностью являлась подвижность при культивировании в полужидком агаре при 28 °С; при 37 °С они утрачивали это свойство. Бактерии *S. freundii* и *P. mirabilis* были подвижными при 28 и 37 °С; у *E. coli* этот признак варьировал: 33 культуры микроорганизмов были неподвижными, 66 - умеренно подвижными, 98 - подвижными.

## Размеры клеток энтеробактерий

Вид Энтеробактерий	Признаки			
	Длина, мкм		Ширина, мкм	
	(M±m)	t <sub>d</sub>	(M±m)	t <sub>d</sub>
<i>Y. enterocolitica</i>	1,85±0,15	-	0,64±0,02	-
<i>E. coli</i>	3,72±0,38	4,56	1,34±0,06	11,11
<i>E. aerogenes</i>	2,01±0,11	0,86	0,84±0,07	2,74
<i>S. freundi</i>	3,01±0,24	4,10	1,00±0,09	4,00
<i>P. mirabilis</i>	2,58±0,11	3,92	0,67±0,08	0,38

Примечание: t<sub>d</sub> - коэффициент достоверности различий средних величин по отношению к размерам клеток *Y. enterocolitica*.

На МПА через 24 ч культивирования при 28 °С *Y. enterocolitica* формировали круглые с ровными краями, прозрачные с голубоватым оттенком, блестящие, мягкой консистенции колонии, диаметром 0,5-1,0 мм.

Выделенные культуры *Y. enterocolitica* обладали каталазой, β-галактозидазой, уреазной активностью; цитохромоксидазу, лактазу, желатиназу, фенилаланиндезаминазу, лизиндекарбоксилазу не образовывали; ферментировали глюкозу; мальтозу, сахарозу, маннит, сорбит, расщепляя их с образованием кислоты без газа; давали положительные реакции в тестах с метиловым красным и Фогес-Проскауэра при 28 °С; не выделяли сероводород; не утилизировали цитрат Симмонса.

По результатам изучения биохимических свойств выделенные культуры иерсиний были отнесены к различным биоварам (табл. 3).

При серологической идентификации из 11 изученных культур *Y. enterocolitica* 5 отнесли к серовару 03; 3 - к серовару 09 и 3 - типировать не удалось.

**Чувствительность к антибиотикам и антагонистическая активность.** Для более полной характеристики биологических свойств выделенных культур микроорганизмов определили спектр их чувствительности к антибиотикам.

Изученные культуры *Y. enterocolitica* были чувствительны к антибиотикам группы фторхинолонов (энрофлону, байтрилу), устойчивы к антибиотикам группы природных и полусинтетических пенициллинов (бензилпенициллину, оксациллину, ампициллину, карбенициллину), олеандомицину, линкомицину, ристомицину.

**Биохимические свойства, дифференцирующие биовары  
Y.enterocolitica**

№	Вид микроорганизмов, серовар	Источник выделения	Тест или субстрат					Биовар
			Тригалола	Кальлоза	Индол	Лецитиназа	Салилин	
1	Y.enterocolitica O9	Тонкий кишечник, брыжеечные лимфатические узлы, кровь поросенка	+	+	+	+	-	2
2	Y.enterocolitica O9	Тонкий кишечник, брыжеечные лимфатические узлы поросенка	+	+	+	+	-	2
3	Y.enterocolitica O3	Тонкий кишечник теленка	+	-	-	-	-	4
4	Y.enterocolitica O3	Корень языка поросенка	+	-	-	-	-	4
5	Y.enterocolitica н/т	Фекалии поросенка	+	+	-	-	-	3
6	Y.enterocolitica н/т	Фекалии поросенка	+	+	+	+	+	1
7	Y.enterocolitica н/т	Комбикорм	+	+	+	+	+	1
8	Y.enterocolitica O3	Свиной язык	+	+	+	+	-	4
9	Y.enterocolitica O3	Свиной язык	+	+	+	+	-	4
10	Y.enterocolitica O3	Замороженная свинина	+	+	-	-	-	4
11	Y.enterocolitica O9	Замороженная свинина	+	+	+	+	+	1

**Примечание:** н/т - нетипируемые.

С учетом того, что Y.enterocolitica могут вызывать желудочно-кишечные расстройства у животных раннего постнатального периода, протекающие как моно-, так и смешанные инфекции, было изучено наличие межвидового антагонизма между иерсиниями и микроорганизмами других видов с использованием метода агаровых блочков.

При этом установили, что рост тест-штаммов Y.enterocolitica подавляли биологически активные вещества (БАВ), продуцируемые E.coli, о чем свидетельствовали четкие зоны задержки роста культур диаметром  $17,5 \pm 0,74$  мм вокруг агаровых блочков. В свою очередь культуры Y.enterocolitica подавляли рост S.typhimurium, зоны задержки роста при этом составили  $19,2 \pm 1,70$  мм.

Культуры Y.enterocolitica, E.aerogenes, C.freundii, P.mirabilis, S.aureus не оказывали взаимного антагонистического влияния друг на друга.

### 3.3. Определение вирулентности и свойств *Y.enterocolitica*, связанных с плазмидой вирулентности

Вирулентность иерсиний определяли на лабораторных мышах массой 14-16 г, которых заражали виутрибрюшинно в дозах 2 млрд.; 400; 80; 16; 3,2 млн. микробных тел, используя по 5 мышей на дозу.

Средняя величина LD<sub>50</sub> варьировала в пределах от 543 млн. до 2 млрд. 374 млн. микробных клеток и не зависела от источника выделения культуры (табл. 4).

Таблица 4

Вирулентность *Y.enterocolitica*

№ культуры	Вид, серовар	Источник выделения	LD <sub>50</sub> , млн.м.к.
1	<i>Y.enterocolitica</i> O9	Патологический материал от поросенка	543,2±68,8
2	<i>Y.enterocolitica</i> O9	Патологический материал от поросенка	591,0±178,9
3	<i>Y.enterocolitica</i> O3	Патологический материал от теленка	660,2±112,6
4	<i>Y.enterocolitica</i> O3	Корень языка поросенка	945,6±74,5
5	<i>Y.enterocolitica</i> н/г	Фекалии поросенка	726,2±85,2
6	<i>Y.enterocolitica</i> н/г	Фекалии поросенка	812,3±96,8
7	<i>Y.enterocolitica</i> н/г	Комбикорм	2374,0±511,2
8	<i>Y.enterocolitica</i> O3	Свиной язык	816,1±92,2
9	<i>Y.enterocolitica</i> O3	Свиной язык	1058,9±111,1
10	<i>Y.enterocolitica</i> O3	Замороженная свинина	722,3±98,8
11	<i>Y.enterocolitica</i> O9	Замороженная свинина	931,2±83,1

При культивировании на специальных жидких и плотных питательных средах культуры *Y.enterocolitica*, содержащие плазмиду вирулентности rYV, проявляют связанные с ней следующие свойства: способность к аутоагглютинации, зависимость бактериального роста от концентрации ионов Ca<sup>2+</sup> в среде при 37 °С, зависимость размеров колоний от температуры. С целью выявления культур *Y.enterocolitica*, содержащих плазмиду вирулентности, выделенные культуры изучали в указанных тестах.

Наличие у культур признака аутоагглютинации считали установленным, если при выращивании в среде Кларка при 37 °С на дне пробирки наблюдали образование рыхлого хлопьевидного осадка. В пробирке, культивированной при 22-28 °С, отмечали равномерное помутнение и небольшой компактный осадок. Свойством аутоагглютинации обладали культуры №1, №2, №3, №5, №10 (табл. 5).

По результатам исследования зависимости роста иерсиний (слабый рост или его отсутствие) от низкой концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в среде и температуры культивирования 37 °С были получены следующие результаты. Культуры *Y. enterocolitica* №1, №2, №3, №5, №10 при указанных условиях через 24 ч либо не давали видимого роста, либо формировали точечные колонии менее 0,1 мм в диаметре. Через 48 ч колонии несколько увеличивались в размере, однако оставались значительно мельче колоний, выросших на той же среде при 22-28 °С (табл. 5).

Таблица 5

Результаты определения свойств, связанных с плазмидой вирулентности

№ культуры	Вид микроорганизмов серовар	Маркеры вирулентности				
		Аутоагглютинация	Зависимость от конц. $\text{Ca}^{2+}$ и 37 °С	Зависимость размеров колоний от температуры		
				Диаметр колоний, мм (M±m), 48 ч		
				22-28 °С	37 °С	t <sub>d</sub>
1	<i>Y. enterocolitica</i> O9	+	+	1,6±0,06	0,7±0,03	13,4
2	<i>Y. enterocolitica</i> O9	+	+	1,8±0,08	1,1±0,05	7,4
3	<i>Y. enterocolitica</i> O3	+	+	1,2±0,07	0,6±0,02	8,2
4	<i>Y. enterocolitica</i> O3	-	-	1,3±0,04	1,4±0,04	2,5
5	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	+	+	1,5±0,08	0,9±0,04	6,7
6	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	-	-	1,6±0,10	1,9±0,10	3,0
7	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	-	-	1,3±0,05	1,8±0,09	5,0
8	<i>Y. enterocolitica</i> O3	-	-	1,4±0,10	1,8±0,07	3,3
9	<i>Y. enterocolitica</i> O3	-	-	1,1±0,09	1,5±0,06	3,7
10	<i>Y. enterocolitica</i> O3	+	+	1,1±0,08	1,2±0,05	1,1
11	<i>Y. enterocolitica</i> O9	-	-	1,2±0,04	1,3±0,03	2,0

**Примечание:** + положительный результат,  
 - отрицательный результат;  
 t<sub>d</sub> коэффициент достоверности различий средних величин.

Для изучения зависимости размеров колоний бактерий от температуры выделенные культуры высевали на плотную питательную среду в чашки Петри и культивировали при 37 и 22-28 °С, что позволяло получить ориентировочную оценку.

С целью более глубокого изучения бактерии выращивали 48 ч на предметных стеклах, фиксировали в парах 25%-го глутарового альдегида,

после чего измеряли диаметр 5-ти типичных колоний. В ходе исследования было установлено, что через 48 ч культивирования диаметр колоний культур *Y. enterocolitica* №1, №2, №3, №5 при 37 °С составил 0,6-1,1 мм, при 22-28 °С - 1,2-1,8 мм (табл. 5) ( $t_d > 4,6$ ;  $P = 0,01$ ). Следует отметить, что при исследовании других культур иерсиний выявленной закономерности не наблюдали.

#### 3.4. Факторы патогенности *Y. enterocolitica* (адгезивность, инвазивность, энтеротоксигенность)

Адгезивность культур иерсиний, выделенных из различных источников, изучали на эритроцитах барана, рассчитывая средний показатель адгезии (СПА). При СПА от 0 до 1,00 микроорганизмы считали неадгезивными; от 1,01 до 2,00 - низкоадгезивными; от 2,01 до 4,00 - среднеадгезивными и от 4,01 и более высокоадгезивными.

Наиболее выраженные адгезивные свойства выявили у культур *Y. enterocolitica* №1, №3, №5, выделенных из патологического материала и фекалий, СПА составил  $4,61 \pm 0,35$ .

К среднеадгезивным отнесли культуры №2 и №10, выделенные из патологического материала и свинины, СПА составил  $3,22 \pm 0,26$ .

Низкоадгезивными были культуры №4, №6, №7, №8, №9, №11, выделенные из фекалий, свинины, свиных языков и комбикорма, при СПА  $1,41 \pm 0,077$ .

Степень инвазивности определяли у культур *Y. enterocolitica* на модели клеточной линии Нер-2. Культуры иерсиний №1 и №2, выделенные из патологического материала, обнаруживали слабую степень инвазивности -  $10,3 \pm 1,6$  бактерий на клетку Нер-2 в сроки от 2-х до 5-ти ч после заражения. Через 24 ч монослои культуры клеток сохранились, цитопатических изменений обнаружить не удалось, количество бактерий в клетках уменьшилось. Культуры, выделенные из фекалий, кормов и продуктов животного происхождения, не проявляли признаков инвазии на данной культуре клеток.

При изучении гемолитической активности *Y. enterocolitica* установили, что ни одна из исследованных культур иерсиний не обладала способностью вызывать гемолиз эритроцитов на МПА с кровью.

Энтеротоксигенность выделенных культур иерсиний изучали в двух тестах: на мышах-сосунках и плантарном на мышах массой 14-16 г.

Культуры *Y.enterocolitica* выращивали при 22-28 °С. Группа мышей, которым вводили стерильный бульон, служила отрицательным контролем, а группа мышей, зараженных надосадочной жидкостью, полученной после центрифугирования (6000 об/мин, 30 мин.) бульонной культуры энтеротоксигенного штамма *E.coli* 727 (O141:K87:K88), - положительным контролем.

Средние показатели коэффициента расширения кишечника у мышей-сосунков находились в пределах от  $0,067 \pm 0,006$  до  $0,116 \pm 0,005$ . Энтеротоксигенными оказались 4 культуры (**№1, №3, №5, №10**), которые вызвали статистически достоверное расширение кишечника по отношению к отрицательному контролю  $t_p > 4,6$  **P=0,01** (табл. 6).

Тест по определению коэффициента расширения кишечника мышей-сосунков является высокочувствительным, но трудоемким в практических условиях.

С целью изучения действия энтеротоксина *in vivo* было проведено определение изменений, развивающихся в тканях тонкого отдела кишечника. Слизистая оболочка тонкого отдела кишечника была гиперемирована и отечна. В просвете кишечника выявлялось небольшое количество серозного экссудата. На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, отмечена слабо выраженная лейкоцитарная инфильтрация поверхностного эпителия и собственной пластинки слизистой оболочки. В целом установлено, что энтеротоксин в кишечнике вызывал развитие общей сосудистой реакции микроциркуляторного русла.

Результаты исследования культур в плантарном тесте согласовывались с результатами предыдущего теста и имели высокую степень корреляции ( $r=0,96$ ). Умеренно и высокотоксигенными оказались культуры **№1, №3, №5, №10**; средняя разность массы лапок опытных и контрольных мышей колебалась в пределах от  $40,33 \pm 3,94$  мг до  $66,33 \pm 8,07$  мг (табл. 6).

Морфологические изменения в тканях плантарной поверхности лап мышей после введения энтеротоксина характеризовались отеком и гиперемией. На гистологических срезах при окраске гематоксилином и эозином в сосочковом слое дермы между волокнами рыхлой волокнистой неоформленной соединительной ткани располагались бледноокрашенные гомогенные массы экссудата. Были обнаружены деструктивные изменения, сосудистые и инфильтративные нарушения.

Сравнивая два использованных теста при определении энтеротоксигенности, можно заключить, что плантарный тест на мышах массой 14-16 г обладает преимуществом перед тестом на мышах-сосунках, так как он является легковоспроизводимым в практических условиях.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что изученные культуры иерсиний обладали адгезивностью, инвазивностью и энтеротоксигенностью в различной степени выраженности:

- культура №1 имела высокую степень адгезивности, была низко инвазивна и умеренно токсигенна;
- культура №2 характеризовалась средней степенью адгезивности, низкой инвазивностью и энтеротоксигенностью;
- культура №3 проявляла высокую степень адгезивности и энтеротоксигенности;
- культура №5 характеризовалась высокой степенью адгезивности и умеренной энтеротоксигенностью;
- культура №10 обладала средней степенью адгезивности и высокой энтеротоксигенностью;
- культуры №4, №6, №7, №8, №9, №11 проявляли низкую степень адгезивности.

Таблица 6

Энтеротоксигенность выделенных культур *Y. enterocolitica*

№ культуры	Вид, серовар	Плантарный тест	Тест на мышках-сосунках	
		Средняя разность массы лапок, мг M±m	Средний показатель расширения кишечника	t <sub>d</sub> *
1	<i>Y. enterocolitica</i> O9	55,67±6,10	0,109±0,008	5,2
2	<i>Y. enterocolitica</i> O9	22,67±4,33	0,070±0,009	0,5
3	<i>Y. enterocolitica</i> O3	66,33±8,07	0,116±0,005	10,2
4	<i>Y. enterocolitica</i> O3	8,67±3,52	0,075±0,007	1,3
5	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	40,33±3,94	0,105±0,007	5,3
6	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	25,00±4,72	0,082±0,005	1,8
7	<i>Y. enterocolitica</i> н/г	6,67±2,56	0,067±0,006	0,3
8	<i>Y. enterocolitica</i> O3	13,67±1,97	0,080±0,008	1,8
9	<i>Y. enterocolitica</i> O3	14,00±2,36	0,068±0,005	0,5
10	<i>Y. enterocolitica</i> O3	65,33±6,88	0,112±0,010	4,7
11	<i>Y. enterocolitica</i> O9	12,67±4,84	0,072±0,007	0,9
12	K(+) <i>E. coli</i> 727	71,67±9,87	0,119±0,009	5,7
13	K(-)	-	0,065±0,003	-

Примечание: \* - коэффициент достоверности различий средних величин по отношению к отрицательному контролю K(-)  $P \leq 0,01$  при  $t_d \geq 4,6$ .

Тест на мышках-сосунках: средний показатель расширения кишечника 0,090 и более - положительный результат.

Плантарный тест: средняя разность массы лапок 15,00-34,00 - слаботоксигенные; 35,00-64,00 - умереннотоксигенные; 65 и более - высокогтоксигенные.

Результаты наших исследований свидетельствуют, что адгезивность, определенная с использованием формализированных эритроцитов, выявлена у всех исследованных культур. У культур с высокой и средней адгезивностью наблюдалась прямая зависимость с наличием культуральных свойств, контролируемых плазмидой вирулентности. Из 11 исследованных культур инвазивность выявлялась у двух культур *Y. enterocolitica* на модели клеточной линии Нер-2, причем в низкой степени. Энтеротоксигенность, определенная в тесте на мышках-сосунках и в плантарном тесте, присутствовала у четырех культур, что свидетельствует о немаловажной роли диарейного синдрома в иерсиниозной инфекции. Традиционный метод определения вирулентности на лабораторных мышках при парентеральном введении бактериальной взвеси не дает объективную оценку патогенности бактерий.

Для решения вопроса о патогенности культуры *Y. enterocolitica* рекомендуется определять культуральные свойства, связанные с плазмидой вирулентности (способность к аутоагглютинации и зависимость бактериального роста от наличия ионов кальция в среде и температуры 37 °С, а как дополнительный признак — определение зависимости размеров колоний от температуры). Учитывая, что *Y. enterocolitica* при определенных условиях может вызывать заболевания желудочно-кишечного тракта животных раннего постнатального периода, клинически проявляющиеся диареей, необходимо определение продукции энтеротоксина у выделенных культур микроорганизмов. Для практического применения рекомендуется использовать плантарный тест.

## ВЫВОДЫ

1. Из патологического материала и фекалий поросят и телят, кормов, замороженной свинины и свиных языков выделены 367 культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе 11 культур *Y. enterocolitica*.

2. Культуры микроорганизмов, идентифицированные как *Y. enterocolitica*, выделены из следующих объектов: 5 культур микроорганизмов - из патологического материала и фекалий поросят; 1 культура - из патологического материала телят; 4 культуры — из свинины и свиных языков; 1 культура — из комбикорма.

3. Для индикации *Y. enterocolitica* из объектов ветеринарно-санитарного надзора оптимальной является среда с бромтимоловым синим (СБТС), которая обладает выраженными ростообеспечивающими свойствами, ингибирует рост грамположительной микрофлоры, позволяет дифференцировать *Y. enterocolitica* от уреазонегативных бактерий.

4. Культуры *Y. enterocolitica* чувствительны к антибиотикам группы фторхинолонов (энрофлону, байтрилу), устойчивы к антибиотикам группы природных и полусинтетических пенициллинов (бензшшенициллину, оксациллину, ампициллину, карбенициллину), олеандомицину, линкомицину, ристомицину.

5. Адгезивной активностью обладают 11 культур *Y. enterocolitica*, из них 3 - высокоадгезивные; 2 - среднеадгезивные; 6 - низкоадгезивные; инвазивность в слабой степени характерна для 2-х культур, гемолитическая активность у всех культур отсутствует; энтеротоксигенность выявлена у 4-х культур микроорганизмов.

6. Плантарный тест является легко воспроизводимым в практических условиях, чувствительным, качественным методом определения энтеротоксигенности культур *Y. enterocolitica*.

#### Практические предложения

1. При бактериологическом исследовании патологического материала от животных раннего постнатального периода, павших от болезней с невыясненной этиологией, следует учитывать как возможность первичной этиологической роли иерсиний, так и вероятность смешанной инфекции, при этом для выявления микроорганизмов *Y. enterocolitica* рекомендуется использовать среду с бромтимоловым синим.

2. Для определения энтеротоксигенности эпизоотических штаммов иерсиний рекомендуется использовать плантарный тест, так как он является простым, чувствительным и легко воспроизводимым в условиях практических ветеринарных лабораторий.

3. Разработаны и применяются в учебном процессе - Иерсиниоз как пищевая токсикоинфекция: Методические указания к самостоятельной работе студентов спец. 310800 - Ветеринария, 072000 - Стандартизация и сертификация. - М.: МГУПБ, 2001. - 28 с.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Довбыш В.С. Активность аминогликозидов, цефалоспоринов, фторхинолонов по отношению к иерсиниям // Актуальные проблемы болезни молодняка в современных условиях: Материалы международной научно-практической конференции. - Воронеж, 2002. - С. 239-240.

2. Довбыш В.С. Критерии дифференциации иерсиний от таксономически близких и сходных видов бактерий // Актуальные проблемы болезни молодняка в современных условиях: Материалы международной научно-практической конференции. - Воронеж, 2002. - С. 240-242.

3. Довбыш В.С. Методы определения патогенных свойств *Y. enterocolitica* // Актуальные проблемы ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарного контроля сельскохозяйственной продукции: Материалы 4-ой международной научно-практической конференции. - М., 2002. - С. 178-180.-

4. Ленченко Е.М., Довбыш В.С. Сравнительная оценка методов количественного учета бактерий // Сельскохозяйственная биология. - 2002. - № 2. - С. 123-125.

5. Довбыш В.С. Оценка активности термостабильного энтеротоксина условно-патогенных энтеробактерий // Практик. - 2003. - №9-10. - С. 30-33.

6. Довбыш В.С. Патогенность и вирулентность *Y. enterocolitica* // Живые системы и биологическая безопасность населения: Материалы 2-ой международной научной конференции студентов и молодых ученых. - М., 2003. - С. 35-37.

Подписано в печать · 12.01.2004 г.      Формат 60x84 1/16  
Печать лазерная.    Объем 1,25 п.л.    Заказ 36      Тираж 50

---

Государственное унитарное полиграфическое предприятие «Печатник»,  
109316 Москва, ул. Талалихина, 33



**Р-1968**

РНБ Русский фонд

2004-4

27342