

ГНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ Я.Р. КОВАЛЕНКО

На правах рукописи

ВОЙТЕНКО АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STAPHYLOCOCCUS HYICUS*
И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ СВИНЕЙ**

(16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук



Москва – 2006

Работа выполнена в Белгородском отделе Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, лаборатории стафилококковых инфекций ГУ Научно - исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, институте фармакологии и токсикологии и лаборатории бактериологии института гигиены и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных Университета Юстуса Либига (г. Гиссен, Германия).

Научные руководители: доктор ветеринарных наук
Владимир Николаевич Скворцов

кандидат медицинских наук
Ольга Александровна Дмитренко

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Валентин Александрович Бурлаков
(МГАВМиБ им. К.И. Скрябина);

кандидат биологических наук
Нина Аркадьевна Соколова
(МГУПБ)

Ведущая организация - ГНУ Всероссийский НИИ патологии, фармакологии и
терапии

Защита диссертации состоится «27» сентября 2006 года в ^{15³⁰} часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук при ГНУ Всероссийский научно - исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, 24/1, ВИЭВ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко.

Автореферат разослан «23» августа 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор ветеринарных наук,
профессор



Н.П. Овдиенко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность темы. В настоящее время повышение эффективности свиноводства сдерживается наличием инфекционных болезней, многие из которых являются ещё недостаточно изученными.

В свиноводческих хозяйствах не редко встречается заболевание с признаками экссудативного эпидермита (мокнущей экземы) – болезни, наносящей существенный экономический ущерб свиноводству из-за высокой летальности поросят, снижения прироста живой массы у переболевших животных, значительных затрат на лечебно-профилактические мероприятия. Заболевание протекает в генерализованной форме преимущественно в виде острой или подострой инфекции, чаще у поросят - сосунов или поросят - отъемышей; локализованная форма встречается реже и проявляется в основном у поросят более старшего возраста, а также у подсвинков и откормочных свиной (Sieverding E., 1988; Гельвиг Э.-Г., 2003).

В Европе экссудативный эпидермит свиной ещё в 60-70-х г.г. прошлого века приводил к достаточно большим экономическим потерям в свиноводстве (Sieverding E., 1988), хотя и сегодня проблема всё ещё является не решенной.

Возбудителем болезни является *Staphylococcus hyicus*, который впервые был выделен, описан и назван Sompolynsky D. в 1953 году как *Micrococcus epidermidis*, а в конце 70-х годов прошлого века стал официально признанным отдельным видом семейства стафилококков (Devriese L. et al., 1978).

Комплексное изучение биологических свойств стафилококков и продуцируемых ими биологически активных веществ лежит в основе представления о патогенезе вызываемых ими заболеваний и является базой, на которой в дальнейшем строится диагностика и разрабатываются схемы профилактики и терапии.

В нашей стране исследования биологических свойств *Staphylococcus hyicus* в достаточной мере не проводились, а его роль в этиологии инфекционных заболеваний свиной полностью не изучена.

1.2. Цель и задачи исследований. Целью нашей работы явилось изучение биологических свойств *Staphylococcus hyicus* и его роли в патологии свиной. Исходя из этого, перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить экологию, биологические свойства и чувствительность выделенных культур *Staphylococcus hyicus* к антимикробным препаратам.
2. Изучить факторы патогенности выделенных культур *Staphylococcus hyicus*.
3. Изучить патогенные свойства *Staphylococcus hyicus* для поросят.

4. Разработать метод идентификации *Staphylococcus hyicus* полимеразной цепной реакцией.

1.3. Научная новизна. Проведены исследования по выделению *Staphylococcus hyicus* из различных источников, в том числе с кожи здоровых и больных экссудативным эпидермитом поросят, а также от других видов животных и птиц.

Изучены биологические свойства и определена *in vitro* чувствительность 40 штаммов *Staphylococcus hyicus* к 17 антимикробным препаратам.

Изучены факторы патогенности данных бактерий.

Впервые в Российской Федерации проведено исследование выделенных изолятов *S. hyicus* на наличие генов, детерминирующих синтез эксфолиативных токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC* и *exhD* полимеразной цепной реакцией. Обнаружено, что штаммы *Staphylococcus hyicus*, выделенные от свиней с признаками экссудативного эпидермита в свиноводческих хозяйствах Белгородской области, содержат ген *exhD*, детерминирующий синтез эксфолиативного токсина D.

Разработан метод идентификации *Staphylococcus hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы полимеразной цепной реакцией.

1.4. Практическая значимость работы. Показано носительство *Staphylococcus hyicus* несколькими видами сельскохозяйственных животных, а также птиц, доказана роль *Staphylococcus hyicus* в патологии свиней.

Разработан метод идентификации *Staphylococcus hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы полимеразной цепной реакцией.

По материалам работы разработаны «Методические рекомендации по идентификации и определению факторов патогенности *Staphylococcus hyicus* – возбудителя экссудативного эпидермита (мокнущей экземы) свиней», одобренные на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН 30 марта 2006 г. протокол № 1).

1.5. Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты изучения экологии и биологических свойств *S. hyicus*;
- результаты изучения факторов патогенности *S. hyicus*;
- результаты изучения патогенности *S. hyicus* для лабораторных животных и поросят;
- метод идентификации *S. hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо-специфичной супероксиддисмутазы полимеразной цепной реакцией.

1.6. Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены на:

- IX и X Международной научно - производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения» (г. Белгород, 2005 г., 2006 г.);

- Международной научно - практической конференции «Повышение эффективности лечения и профилактики акушерско - гинекологических заболеваний и биотехники размножения животных» (г. Киров, 2005 г.);

- Международной научно - практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных» (г. Москва, 2006);

- XVIII Международной межвузовской научно - практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии» (г. Санкт-Петербург, 2006 г.)

1.7. Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

1.8. Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, практические предложения и список литературы. Работа иллюстрирована одним графиком, одной дентрограммой, четырьмя рисунками, 10 таблицами и восемью фотографиями. Список использованной литературы включает 175 иностранных и 18 отечественных источников.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы

Работа выполнена в 2003 - 2006 г.г. в Белгородском отделе Всероссийского научно - исследовательского института экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко, лаборатории стафилококковых инфекций ГУ Научно - исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, институте фармакологии и токсикологии и лаборатории бактериологии института гигиены и инфекционных заболеваний Университета Юстуса Либига (г. Гиссен, Германия), а также в птицеводческих и животноводческих хозяйствах Белгородской области. В лабораторных опытах использовано 18 поросят, 30 белых мышей и 5 щенков.

Исследования методом полимеразной цепной реакции выполнены совместно с О.А. Дмитренко (ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН), К. Лэмплером, Й. Альбером и Т. Канбар (институт фармакологии и

токсикологии Университета Юстуса Либига, г. Гиссен, Германия), за что автор выражает им глубокую признательность.

Для выделения *S. hyicus* из различных образцов патологического материала в своей работе мы использовали питательные среды, применяемые в повседневной лабораторной практике для выделения микробов рода *Staphylococcus*: ЭСА (элективный солевой агар), ЖСА (желточно - солевой агар), МПА (мясо - пептонный агар), МПБ (мясо - пептонный бульон), кровяной агар.

После изучения морфологических свойств полученных чистых культур, отнесенных к бактериям рода *Staphylococcus*, проводили определение их видовой принадлежности с помощью набора «STAPHYtest 16» («PLIVA – Lachema a.s.», Врно, Чехия), представляющего собой микротитровальные стриппированные пластинки, содержащие 16 биохимических тестов: уреазы, аргининдегидролаза, орнитин, β - галактозидаза, β - глюкононидаза, нитраты, фосфатаза, пирролидонил - амилаза, эскулин, сахароза, трегалоза, маннит, ксилоза, мальтоза, манноза и тест глюкоза - новобиоцин.

Определение лецитиназной (лецитовителлазной) активности у исследуемых культур стафилококков проводили на желточно - солевом агаре (ЖСА) (А.М. Смирнова, 1977).

Определение фибринолитической активности (наличия фермента стафилокиназы) у исследуемых культур *S. hyicus* проводили на мясо - пептонном агаре с добавлением стерильной человеческой плазмы.

Определение продукции ацетона (реакция Фогес - Проскауера) проводили с помощью VP - теста («PLIVA – Lachema a. s.», Врно, Чехия), по описанной в инструкции методике. Использование теста позволяет значительно быстрее, по сравнению с другими традиционными методами, определить продукцию ацетона микроорганизмами.

Определение наличия цитохромоксидазы (цитохрома С) у изучаемых бактерий проводили с помощью ОХI - теста («PLIVA – Lachema a. s.», Врно, Чехия), представляющего собой полоски с зоной индикации, содержащей N, N-диметил-1,4-фенилэтидиамин и α - нафтол, в присутствии цитохромоксидазы вступающие друг с другом в цветную реакцию с образованием индофенолового синего.

Пигментообразование у исследуемых культур стафилококков определяли на молочно - солевом агаре (Смирнова А.М., 1977).

Определение ДНК-азной активности (наличия фермента дезоксирибонуклеазы) *S. hyicus* осуществляли путём посева чистой исследуемой культуры

стафилококка на ДНК - агар, для приготовления которого использовали готовую сухую питательную среду «DNAse test agar».

Определение гиалуронидазной активности (наличия фермента гиалуронидазы) у стафилококков осуществляли по методике Winkle (1979) путём посева чистой исследуемой культуры стафилококка на ВНИ – агар.

Плазмокоагулирующую активность *S. hyicus* проверяли с применением цитратной плазмы человека и нескольких видов животных - кролика, свиньи, лошади, барана и крупного рогатого скота, а также с куриной цитратной плазмой в разведении 1:5.

Определение хлопьеобразующего фактора производили с цитратной кроличьей плазмой, используемой нами при постановке реакции плазмокоагуляции, в разведении 1:5.

Определение гемолитической активности исследуемых культур *S. hyicus* проводили по методике Skalka B. et al. (1979) на кровяном агаре с добавлением 5 % стерильной цитратной крови барана, а также 5 % стерильной цитратной крови человека.

Способность роста *S. hyicus* в анаэробных условиях проверяли на МИА. Чашки с исследуемой культурой помещали в цилиндрическую пластиковую колбу диаметром 12 см, после чего туда вкладывали пакет с увлажненным 35 мл дистиллированной воды реагентом «Anaerocult А» («Merck», Darmstadt, Германия), плотно закрывали колбу крышкой и помещали в термостат на 72 часа, после чего производили учет роста бактерий.

Чувствительность исследуемых культур *S. hyicus* к 17 антимикробным препаратам определяли дискодиффузионным методом, пользуясь методическими указаниями МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Постановку полимеразной цепной реакции для определения наличия у исследуемых культур *S. hyicus* генов, детерминирующих синтез эксфолиативных токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC* и *exhD* проводили по методике P. Ahrens и L.O. Andresen (2004).

В качестве контролей были использованы референтные штаммы *S. hyicus*, содержащие гены, детерминирующие синтез эксфолиативных токсинов различных типов. Данные культуры были предоставлены нам коллегами из Дании и Германии.

Таблица 1

Олигонуклеотиды (праймеры), используемые для определения наличия генов, детерминирующих синтез эксфолиативных токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC* и *exhD* у *S. hyicus* полимеразной цепной реакцией

Целевой ген	Название праймера	5' – 3' нуклеотидная последовательность	Автор(ы)
<i>exhA</i>	MU4A	GCT ACG GGT TTT GTA GTT TCA C	P. Ahrens и L.O.Andresen (2002)
	MU3A	GTA ACC TAC AAC TCT TAG AAC C	
<i>exhB</i>	F2EB	AAC ACG CCA ATA GAG AAT GTA CTA C	P. Ahrens и L.O.Andresen (2002)
	MU3B	TAT CAA ATC TTA TAC CAG TTA GAA TAT CTC C	
<i>exhC</i>	MU3C	GAA TAA ATA TTA TGG AGT CTC TCC TGA TC	P. Ahrens и L.O.Andresen (2002)
	MU4C	CCA TAG TAT TTC AAT CCA AAA TCA GTA C	
<i>exhD</i>	F2D	GAA CAA ATA TAA TGG AAG AAA CCC AC	P. Ahrens и L.O.Andresen (2002)
	MU3D	GAT TTC CCT ACG TGA ATA CCT ACA ATA C	

Температурный режим ПЦР для обнаружения эксфолиативных токсинов у *S. hyicus*:

94 °С – 3 мин., 1 цикл;

(94 °С – 1 мин.; 57 °С – 1 мин.; 72 °С – 1 мин.) 31 цикл;

72 °С – 7 мин., 1 цикл

Выделение ДНК проводили по методике, описанной Дмитренко О.А. с соавт. (2004).

Одной из задач наших исследований была разработка метода идентификации *S. hyicus* полимеразной цепной реакцией. В принцип идентификации мы заложили обнаружение гена *sodA* видоспецифичной супероксиддисмутазы – фермента - металлоэнзима, который катализирует супероксид с образованием кислорода и перекиси водорода. Подобные ферменты обнаружены у большинства аэробных и анаэробных микроорганизмов и играют ключевую роль в защите клетки от окислительного стресса. Эти энзимы обычно классифицируют на основе ионов металла, выступающего в роли ко-фактора, и имеют у каждого вида микроорганизмов свою нуклеотидную последовательность.

При изучении возможности применения ПЦР для идентификации *S. hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы, а также при постановке других реакций и определений, в качестве позитивного контроля мы использовали референтные штаммы *S. hyicus* A2869C/70 и S3588/70, предоставленные нам Ж. Роде (Центр инфекционной медицины Института

микробиологии Ветеринарного института г. Ганновер (Германия); референтные штаммы *S. hyicus* 1289-D и 842A-88, полученные от Л.О. Андресена (Датский институт кормовых и ветеринарных исследований). Для контроля наших результатов мы также использовали 19 референтных культур коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков, не относящихся к виду *S. hyicus*, которые были получены нами из коллекции бактериальных культур Института фармакологии и токсикологии Университета Юстуса Либига (г. Гиссен, Германия) и из Департамента патологии, бактериологии и болезней птиц, факультета ветеринарной медицины Университета Генга (г. Мерельбек, Бельгия) от Е. де Граф и Л.А. Девриз. Автор выражает искреннюю признательность коллегам, предоставившим нам контрольные штаммы.

При разработке нуклеотидной последовательности специфичных гену *sodA* *S. hyicus* олигонуклеотидов (праймеров), а также дендрограммы, были использованы компьютерные программы ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw), Oligo 4.0 и Boxshade (www.ch.embnet.org).

Для контроля наличия ДНК в реакционной смеси ПЦР применялись олигонуклеотиды (праймеры), специфичные участку 16S - 23S рибосомальной ДНК, универсальные для всех видов бактерий рода *Staphylococcus*.

Для выяснения этиологического значения в возникновении экссудативного эпидермита у поросят в условиях Белгородского отдела ВИЭВ был проведен опыт по заражению поросят штаммами *S. hyicus*, содержащими гены, детерминирующие синтез эксфолиативных токсинов различных типов. В опыт было взято 18 поросят 6 - недельного возраста.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1. Выделение *S. hyicus* из различных источников

Бактериологическому исследованию на предмет выделения *S. hyicus* подвергли 371 пробу материала от различных животных, как с патологиями, так и без них, в том числе 328 проб от сельскохозяйственных животных (свиней, поросят и коров), 30 проб от птиц (30 куриц в возрасте 360 - 420 дней), 13 проб от собак.

На наличие *Staphylococcus hyicus* исследовали: соскобы с кожи поросят с признаками экссудативного эпидермита (78 проб) и здоровых поросят (56 проб), смывы с конъюнктивы глаз поросят (43 пробы), мазки из влагалищной полости свиноматок без признаков патологии (33 пробы), смывы с сосков вымени (33 пробы) от больных маститом коров, мазки слизистой носовой полости поросят (24

пробы), пробы из внутренних органов павших и вынужденно убитых поросят с признаками экссудативного эпидермита (11 проб) и пневмонии (6 проб), пробы молока (9 проб) от больных маститом коров, а также пробы гноя (9 проб) от больных эндометритом коров.

Кроме того, были исследованы смывы конъюнктивы и мазки ротовой полости (30 проб) от куриц без патологии, гной раневого содержимого от собак (5 проб) и коров (11 проб), соскобы с кожи собак (8 проб) и коров (15 проб) без патологии.

В таблице 2 приведена характеристика исследованных нами штаммов по виду животных, от которых они выделены, источнику выделения и клиническим проявлениям, если таковыми данными мы обладали.

Как видно из таблицы, большинство исследованных нами штаммов (36, или 78 %) были выделены от поросят и свиней, из них от поросят с признаками экссудативного эпидермита – 18 штаммов (42 %). От коров с признаками субклинического и клинического мастита и эндометрита выделено 4 (8,6 %) культуры *S. hyicus*, от птиц без патологии – 1 (2,2 %), от собак без патологии – 1 штамм (2,2 %).

2.2.2. Биологические свойства *S. hyicus*

2.2.2.1. Морфологические свойства *S. hyicus*

Изучение биологических свойств выделенных культур *S. hyicus* показало то, что они обладают многими свойствами, типичными для других представителей рода *Staphylococcus*.

В данной работе исследованы биологические свойства 43 культур *S. hyicus*, 26 из которых были выделены нами в различных животноводческих /25 штаммов/ и птицеводческом /1 штамм/ хозяйствах Белгородской области, а 17 получены из Лаборатории бактериологии Института гигиены и инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных Университета Юстуса Либига (г. Гиссен, Германия). Из 26 культур 18 (69 %) были изолированы от поросят, больных экссудативным эпидермитом, от поросят с признаками пневмонии – 2 культуры (7,7 %), от поросят и свиноматок без патологии – 3 культуры (11,5 %), от коров, больных клиническим и субклиническим маститом и эндометритом – 3 культуры (11,5 %) случаев, от птиц без патологии – 1 культура (3,8 %).

Кроме того, стоит отметить, что при отборе проб патматериала с кожи поросят, больных экссудативным эпидермитом, выделяемость данного стафилококка составляла 100%.

Патогенетическое значение штаммов, полученных нами для исследования из Германии, к сожалению, было не известно.

Таблица 2

Происхождение 43 штаммов *Staphylococcus hyicus*

Страна	Вид животного	Источник выделения	Клинические признаки	Кол-во штаммов	Шифр штамма (ов)
Р О С С И Я	поросята	кожа	экссудативный эпидермит	13	K-1, P-1, P-3, P-4, P-7, P-8, P-9, P-10, P-11, P-12, P-13, P-14, F-1
		кожа	отсутствовали	1	GR-1
		конъюнк- тива	экссудативный эпидермит	1	P-5
		легкие	пневмония	1	FQ-2
		легкие	пневмония + экссудативный эпидермит	1	P-6
		селезенка	экссудативный эпидермит	2	K-5, P-2
		почки	экссудативный эпидермит	1	K-10
	свиноматка	влагалище	отсутствовали	2	K-2; K-3
	кураца	гортань	отсутствовали	1	RB-1
	корова	матка	эндометрит	2	273/05; 278/05
	корова	молоко	мастит	1	272/05
	Г Е Р М А Н И Я	поросята	селезенка	не известны	1
почки			1		2706/78
свинья		кожа	6		6247/01, 6343/01, 6344/01, 6407/01, 6393/01, 6416/01
		почки	2		P 5472, 709/02
		легкие	1		6418/01
		кал	1		5285/01
свиноматка		влагалище	2		P 8546/01, P 8587/01
корова		вымя	2		5019/05, 4811/05
собака		спинно- мозговая жидкость	1		2941/78

Культуры *S. hyicus*, изолированные от различных животных и птиц, по культурально - морфологическим, биохимическим и патогенным свойствам соответствовали своему роду.

Они хорошо росли как на элективных (ЭСА, ЖСА), так и на простых питательных средах при температуре +37 °С в течение 18 – 24 часов. На твердых питательных средах (МПА, ЭСА, ЖСА, кровяном агаре) росли в виде округлых, с ровными краями, слабовыпуклых, блестящих колоний, достигающих через 48 - 74 ч культивирования диаметра от 3 до 5 мм. Колонии в первые сутки роста были более крупными на обычных питательных средах - около 2 мм, и более мелкими на средах с содержанием NaCl – около 1 - 1,5 мм. Нередко обсемененность бактериями была очень высокой, то есть вся поверхность чашки со средой полностью покрывалась характерными колониями, особенно это касается посевов с кожи поросят, пораженных экссудативным эпидермитом. При культивировании *S. hyicus* на обычных жидких питательных средах при температуре + 37 °С уже через 4 часа в пробирках происходило равномерное помутнение среды, а через 12 - 14 часов – выпадение небольшого, легко встряхиваемого белого осадка.

В основном они росли в виде чистых культур, особенно при первичном посеве исследуемого материала на элективные питательные среды (ЖСА, ЭСА), которые оказались более благоприятными, по сравнению с обычными (кровяной агар, МПА) питательными средами. Посевы на последних иногда сопровождались загрязнением и трудностью отивки чистых культур стафилококков, иногда требовалась их дополнительная очистка на ЭСА или ЖСА.

По морфологическим свойствам в мазках, окрашенных по Грамму, *S. hyicus* представлял собой кокки (диаметром 0,6 - 1,2 мкм), располагавшиеся беспорядочными скоплениями, по форме чаще напоминающими гроздь винограда, реже парно или тетрадами, неподвижные, спор и капсул не образовывали, хорошо красились анилиновыми красителями, грамположительные. На морфологию *S. hyicus* количество пассажей на средах не влияло.

2.2.2.2. Культурально – биохимические свойства *S. hyicus*

В культуральной характеристике штаммов *S. hyicus*, выделенных из различных источников, особых отличий не выявлено. Стоит лишь отметить, что на агаре с содержанием 15 % NaCl рост либо отсутствовал вовсе, либо был еле заметным. Удовлетворительным можно было назвать рост только одного штамма (RB-1).

Культуры *S. hyicus* не были термофильными, то есть не росли при температуре +45 °С, слабо и медленно развивались при температуре +15 °С.

Все выделенные культуры *S. hyicus* обладали каталазной активностью.

При изучении биохимических свойств нами было установлено, что все культуры *S. hyicus* восстанавливали нитраты, интенсивно росли в аэробных условиях, в том числе на агаре с 7,5% NaCl, не образовывали пигмент, показали отрицательные реакции на продукцию ацетона (реакция Фогес – Проскауера) и цитохромоксидазы (цитохрома С), положительные результаты по тесту «фосфатаза», ферментировали маннозу, трегалозу, сахарозу и не ферментировали маннит (кроме штамма 273/05), мальтозу и ксилозу. Следует отметить различные показатели по гидролизу мочевины (47 % культур дали положительную реакцию), а также то, что часть штаммов (51 %) дали положительный результат при определении β - глюкозидазы.

Пигментом исследуемые культуры не обладали.

2.2.2.3. Чувствительность *S. hyicus* к антимикробным препаратам.

Нами проведены исследования по определению дискодиффузионным методом чувствительности 40 штаммов *S. hyicus* к 17 антимикробным препаратам (таблица 3).

Результаты исследований показали, что все культуры *S. hyicus*, независимо от источника изоляции, были чувствительны к гентамицину, 97 % культур проявили чувствительность к препаратам пенициллинового ряда (пенициллин, ампициллин и оксациллин), 90 % - к рифампицину. Достаточно высокую эффективность показали также неомицин и фуразолидон (77,5 и 74 % штаммов соответственно оказались чувствительными к данным препаратам).

Менее чувствительными исследуемые культуры были к фторхинолонам (от 57 до 62 % чувствительных культур), клиндамицину, линкомицину, левомицетицу (от 47 до 60 % чувствительных культур), препаратам тетрациклинового ряда (37 % чувствительных культур). К эритромицину проявили чувствительность лишь 13 % штаммов.

2.2.2.4. Изучение факторов патогенности *S. hyicus*

При исследовании гемолитической активности выяснилось, что как при первичном посеве, так и при многократном пассировании исследованных культур на агаре с добавлением 5% стерильной дефибринированной или цитратной крови барана, самостоятельный гемолиз ни у одной из культур не проявлялся. Напротив, при исследовании гемолитической активности изучаемых бактерий по методике CAMP - теста (тест на синергетический гемолиз), описанном В. Skalka et al. (1979),

Таблица 3

Чувствительность *Staphylococcus hyicus* к антимикробным препаратам

Антимикробный препарат	Чувствительных штаммов		Промежуточно-чувствительных штаммов		Резистентных штаммов	
	Кол-во	%	Кол-во	%	Кол-во	%
Ампициллин	39	97	0	0	1	3
Пенициллин	39	97	0	0	1	3
Оксациллин	39	97	0	0	1	3
Неоминцил	31	77,5	5	12,5	4	10
Гентамицин	40	100	0	0	0	0
Доксициклин	15	37	5	13	20	50
Тетрациклин	15	37	0	0	26	63
Ципрофлоксацин	23	57	1	3	16	40
Офлоксацин	25	63	0	0	15	37
Пефлоксацин	25	62,5	1	2,5	14	35
Норфлоксацин	23	57	0	0	14	43
Линкомицин	19	47,5	2	5	19	47,5
Эритромицин	5	13	19	48	16	39
Клиндамицин	20	50	1	2,5	19	47,5
Левомецетин	24	60	0	0	16	40
Фуразолидон	30	74	3	8	7	18
Рифампицин	36	90	0	0	4	10

нами было выявлено наличие δ - гемолизина у большинства (82,5 %) исследованных культур.

Самостоятельный гемолиз большинство исследованных культур проявляли на агаре с добавлением 5 % кроличьих и человеческих эритроцитов.

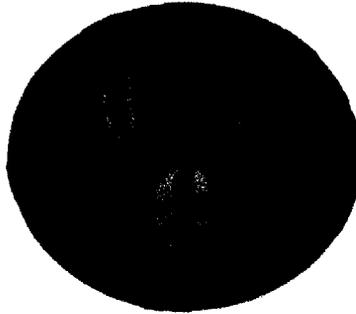


Рис. 1. CAMP-like тест на кровяном агаре с бараными эритроцитами, применяемый для определения гемолитической активности бактерий рода *Staphylococcus*: в центре - β -гемолиз *S. intermedius*, снизу - α -гемолиз *S. aureus*, наверху слева - α, β -гемолиз *S. aureus*, наверху справа - δ -гемолиз *S. hyicus*.

В опыте по изучению плазмокоагулирующей активности находилось 26 штаммов *S. hyicus*. Выяснилось, что всего четыре штамма показали плазмокоагулирующую активность в отношении цитратной кроличьей плазмы в разведении 1:5.

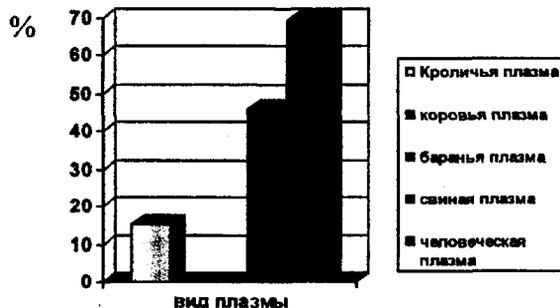


График 1. Плазмокоагулирующая активность *Staphylococcus hyicus* в отношении некоторых видов цитратных плазм (в %).

Цитратную человеческую плазму коагулировало 18 культур *S. hyicus*, количество положительных реакций было 18 (разведение 1:5), а в отношении цитратной свиной плазмы - 12 положительных результатов.

В отношении цитратной бараньей и коровьей плазмы положительных результатов получено не было.

Кроме того, все исследованные культуры *S. hyicus* продуцировали ферменты гиалуронидазу (рис. 2) и ДНК - азу.

Часть исследованных культур (65 %) обладало фибринолитической активностью. Ни один из исследованных штаммов не дал положительных результатов при определении наличия фактора хлопьеобразования (*Clumping* - фактора) и фермента лецитиназы.

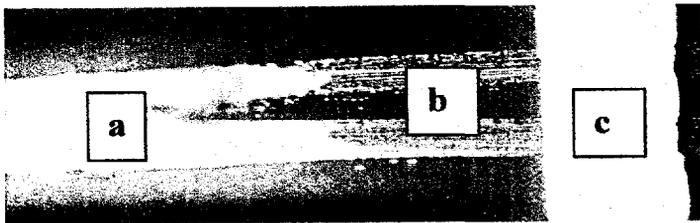


Рис. 2. Положительная реакция при определении гиалуронидазной активности *S. hyicus* на ВНИ – агаре (а – зона капсулированного роста *S. equi* subsp. *equi*; б – зона некапсулированного роста *S. equi* subsp. *equi* вследствие действия гиалуронидазы *S. hyicus*; с – зона роста *S. hyicus*).

В результате исследований наличия генов, детерминирующих синтез эксфолиативных токсинов различных типов у 40 исследуемых штаммов *S. hyicus*, мы получили следующие данные: у 21 штамма (52,5 %) выявлено наличие гена *exhD* и у 1 штамма (2,5 %) – гена *exhC*. Наличие генов *exhA* и *exhB* у исследованных нами штаммов обнаружено не было.

Таким образом, вышеизложенные результаты по определению факторов патогенности изученных культур *S. hyicus* свидетельствуют о том, что большинство штаммов показали плазмокоагулирующую активность в отношении цитратной свиной и человеческой плазмы, все культуры обладают ферментами ДНК-азой и гиалуронидазой и 65 % - фибринолитической активностью.

Самостоятельный гемолиз на агаре с барьными эритроцитами изученные бактерии не проявляют. Напротив, при изучении гемолитической активности по методике САМР – теста (теста на синергетический гемолиз) у большинства штаммов обнаружено наличие δ – гемолизиннов.

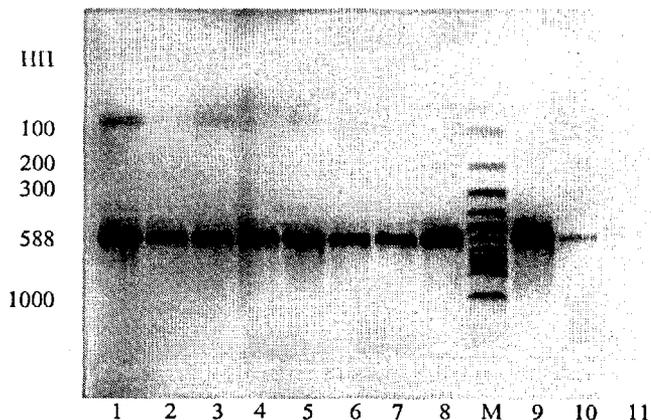


Рис. 3. Типичные ампликоны гена *exhD* (величина генного продукта 588 нуклеотидных пар), детерминирующего синтез эксфолиативного токсина D у *S. hyicus*: 1 – позитивный контроль, штамм *S. hyicus* A2869C/70; 2 – штамм *S. hyicus* K-1; 3 – штамм *S. hyicus* K-10; 4 – штамм *S. hyicus* P-1; 5 – штамм *S. hyicus* P-2; 6 – штамм *S. hyicus* P-3; 7 – штамм *S. hyicus* P-4; 8 – штамм *S. hyicus* P-5; 9 – штамм *S. hyicus* P-11; 10 – штамм *S. hyicus* P-13; 11 – негативный контроль: *S. aureus*; M – маркер молекулярной массы ДНК (Serva, Heidelberg, Германия).

2.2.2.5. Изучение патогенных свойств *Staphylococcus hyicus* для поросят и лабораторных животных

Патогенность *S. hyicus* обусловлена, в первую очередь, их эксфолиативными токсинами.

Экспериментальное заражение поросят. Для исследования взяли 18 поросят в возрасте шести недель, разбили на шесть групп (четыре опытных и две контрольных), по три поросенка в каждой.

Поросят заражали суточными культурами *S. hyicus*: первую группу – референтным штаммом DSM 20459 (ATCC 11249, NCTC 10350), с наличием гена *exhA*; вторую группу – референтным штаммом 1289D - 88, с наличием гена *exhB*; третью группу - штаммом 6407/01, с наличием гена *exhC*; четвертую группу – штаммом K - 10, с наличием гена *exhD*.

Основные факторы патогенности 40 исследованных штаммов *Staphylococcus hirsutus*

№ n/n	Штамм	ДНКаза	Фибринолизин	Гиалуронидаза	Фактор хлорье-образования	δ - гемолиз	<i>exhA</i>	<i>exhB</i>	<i>exhC</i>	<i>exhD</i>
1	K-1	+	+	+	-	+	-	-	-	+
2	K-2	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	K-3	+	+	+	-	+	-	-	-	-
4	K-5	+	+	+	-	-	-	-	-	+
5	K-10	+	+	+	-	+	-	-	-	+
6	F-1	+	-	+	-	-	-	-	-	+
7	FO-2	+	-	+	-	+	-	-	-	+
8	GR-1	+	-	+	-	+	-	-	-	-
9	P-1	+	-	+	-	+	-	-	-	+
10	P-2	+	+	+	-	+	-	-	-	+
11	P-3	+	+	+	-	+	-	-	-	+
12	P-4	+	-	+	-	+	-	-	-	+
13	P-5	+	+	+	-	+	-	-	-	+
14	P-6	+	-	+	-	-	-	-	-	+
15	P-7	+	-	+	-	+	-	-	-	+
16	P-8	+	-	+	-	+	-	-	-	+
17	P-9	+	-	+	-	-	-	-	-	+
18	P-10	+	-	+	-	-	-	-	-	+
19	P-11	+	-	+	-	+	-	-	-	+
20	P-12	+	-	+	-	+	-	-	-	+
21	P-13	+	-	+	-	+	-	-	-	+
22	P-14	+	+	+	-	-	-	-	-	+
23	RB-1	+	+	+	-	+	-	-	-	-
24	2300/79	+	+	+	-	+	-	-	-	+
25	2941/78	+	+	+	-	+	-	-	-	-
26	2706/78	+	+	+	-	-	-	-	-	-
27	5019/05	+	+	+	-	+	-	-	-	-
28	4811/05	+	+	+	-	+	-	-	-	-
29	5285/05	+	+	+	-	+	-	-	-	-
30	P5472	+	+	+	-	+	-	-	-	-
31	709/02	+	+	+	-	+	-	-	-	-
32	6247/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
33	P8546/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
34	P8587/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
35	6344/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
36	6343/01	+	+	+	-	+	-	-	-	+
37	6407/01	+	+	+	-	+	-	-	+	-
38	6393/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
39	6416/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-
40	6418/01	+	+	+	-	+	-	-	-	-

Все указанные культуры микроорганизмов были изолированы в разное время от поросят, больных экссудативным эпидермитом. За зараженными поросятами наблюдали в течение двух недель.

Подопытных поросят заражали подкожно в области уха в дозе 10 млрд. микробных тел в объеме 1,0 мл суточной культурой, выращенной на плотной питательной среде (МПА) при обычных условиях культивирования (+37 °С) с доступом воздуха и суспензированной в стерильном физиологическом растворе.

Первую контрольную группу поросят (группа № 5) заражали штаммом *S. hyicus* К - 2, не обладающим генами, детерминирующими синтез каких-либо эксфолиативных токсинов.

Вторую контрольную группу (группа № 6) не заражали.

Клинические признаки заболевания начали проявляться у всех зараженных поросят одновременно, независимо от типа эксфолиативного токсина. Первые симптомы появились на второй день. У поросят наблюдалась сильная гиперемия в месте введения суспензии.

На третий день после введения инокулята началась эксфолиация эпителия, у поросенка, зараженного штаммом с наличием гена *exhB* на внутренней поверхности левого бедра начали проявляться поражения в виде пустул, заполненных экссудатом.

На 5 день появились обширные некротические поражения кожного покрова у всех зараженных животных практически на всех участках тела, но больше всего в области живота и головы.

Животные контрольных групп, которым не вводилась суспензия стафилококка и вводилась суспензия штамма, не обладающего эксфолиативными токсинами, не заболели.

Не удалось выявить патогенное влияние штаммов *S. hyicus*, обладающих генами, детерминирующими синтез эксфолиативных токсинов, для мышей и щенков, у которых не наблюдалось никаких признаков экспериментального стафилококкоза. Это, по нашему мнению, говорит о видоспецифичности токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC* и *exhD* для свиней.

2.2.3. Результаты полимеразной цепной реакции при разработке метода идентификации *S. hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы

Изучение возможности видовой диагностики *S. hyicus* по обнаружению гена *sodA* мы провели на 43 штаммах *S. hyicus* и 19 референтных штаммах других видов стафилококков.

В качестве контроля наличия в реакционной смеси ДНК стафилококков использовали специфичные для всех видов бактерий рода *Staphylococcus* праймеры участка 16S - 23S рДНК.

Определение видовой специфичности гена *sodA* *S. hyicus*

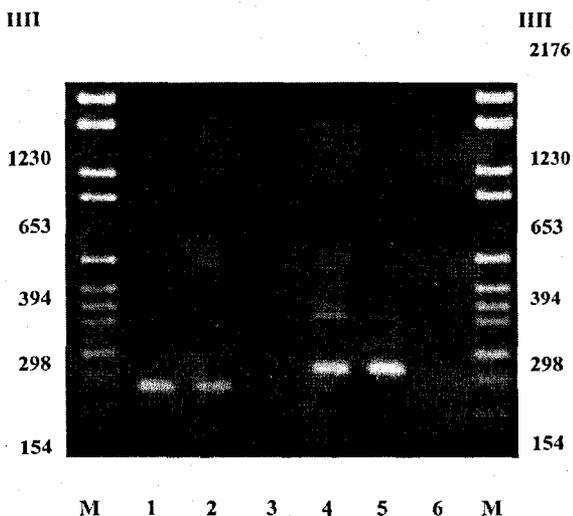
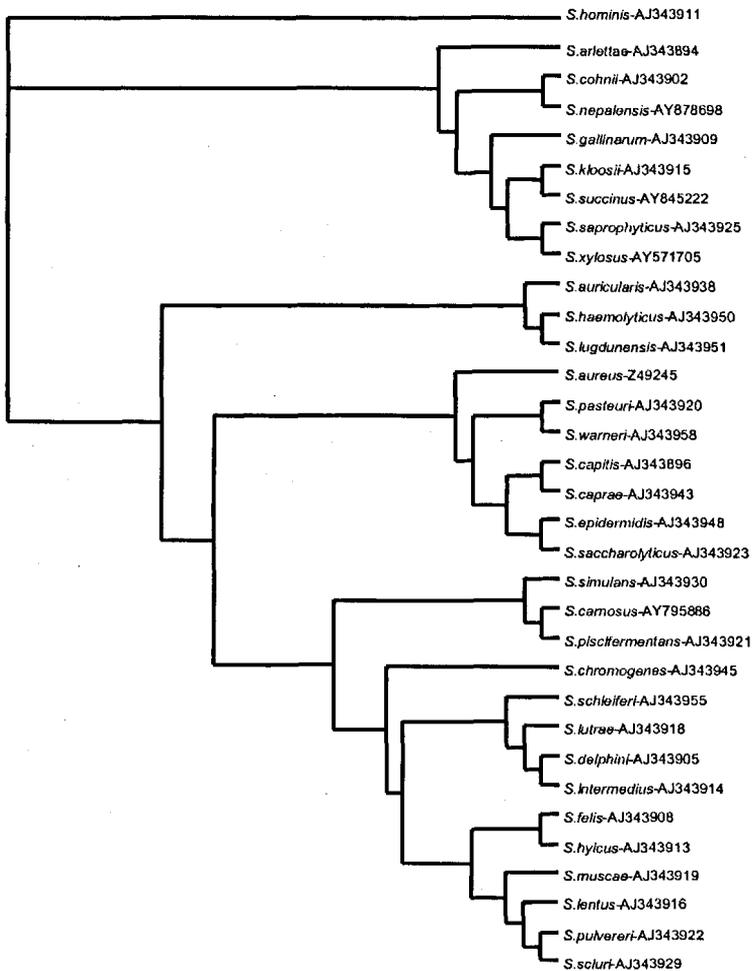


Рис. 4. Типичные ампликоны *sodA* - гена (1,2) и участка 16S - 23S рибосомальной ДНК (4,5) *S. hyicus*. Негативный контроль: *S. aureus* (3,6). М – маркер молекулярной массы ДНК.

Специфические ампликоны были получены только с ДНК *S. hyicus* (размер ампликона - 205 п.н.) (фотография 1, дорожки 1, 2).



Дендрограмма 1. Анализ близости нуклеотидных последовательностей генов *sodA* видо-специфичной супероксиддисмутазы различных видов стафилококков (анализ проводился с помощью компьютерной программы Clustalw).

При изучении 45 культур *S. hyicus* специфические для *S. hyicus* ампликоны *sodA* - гена размером 205 н.п. получены в 45 случаях, то есть исследуемые культуры *S. hyicus* были правильно идентифицированы в 100 % случаев.

При исследовании остальных 19 культур стафилококков 19 различных видов, ампликонов размером 205 н.п. (*S. hyicus*) не были обнаружены ни в одном случае.

Специфические для всех бактерий рода *Staphylococcus* ампликоны размером 250 н.п. (16S - 23S рДНК) получены в 62 случаях, что говорит о том, что во всех случаях в реакционной смеси содержалась ДНК стафилококков.

Полученные результаты исследований позволяют полагать, что по гену *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы, *S. hyicus* можно дифференцировать от других видов стафилококков (дентрограмма 1).

Все вышеуказанное говорит о том, что данную методику целесообразно применять при необходимости дифференциации *S. hyicus* от других видов стафилококков, как современный экспресс - метод лабораторной диагностики, особенно в случаях, когда обычные лабораторные методики не дают 100 % точного результата.

3. ВЫВОДЫ

1. При исследовании 371 пробы материала из различных источников *S. hyicus* был выделен в 26 случаях (7 %). Из 26 культур 18 (69 %) были изолированы от поросят, больных экссудативным эпидермитом, от поросят с признаками пневмонии – 2 культуры (7,7 %), от поросят и свиноматок без патологии – 3 культуры (11,5 %), от коров, больных клиническим и субклиническим маститом и эндометритом – 3 культуры (11,5 % случаев), от птиц без патологии – 1 культура (3,8 %). При этом, от поросят, больных экссудативным эпидермитом, от свиноматок и птиц без патологии, а также коров, больных клиническим маститом и эндометритом, *S. hyicus* выделен и идентифицирован в нашей стране впервые.

2. Изоляцию *S. hyicus* следует проводить в обычном термостате при температуре +37 °С как на селективных для рода *Staphylococcus* питательных средах с содержанием 7,5 % хлорида натрия (ЭСА, ЖСА), так и на простых питательных средах (МПА, кровяной агар).

3. При исследовании методом ПЦР культур *S. hyicus*, выделенных от поросят, больных экссудативным эпидермитом, у 100 % штаммов обнаружено наличие гена *exfD*, детерминирующего синтез эксфолиативного токсина D, что и обуславливает появление кожных поражений у поросят при экссудативном эпидермите.

4. Экспериментальное заражение поросят штаммами *S. hyicus*, обладающих генами, детерминирующими синтез эксфолиативных токсинов различных типов, доказывает этиологическое значение токсино-продуцирующих штаммов *S. hyicus* в возникновении экссудативного эпидермита у поросят. Напротив, штаммы *S. hyicus*, не обладающие генами, детерминирующими синтез эксфолиативных токсинов, инфекцию у поросят не вызывают.

5. Большинство исследованных культур *S. hyicus* показали плазмо-коагулирующую активность в отношении цитратной свиной и человеческой плазмы в разведении 1:5 и, напротив, не показали таковой активности в отношении цитратной плазмы барана и коровы. В отношении цитратной кроличьей плазмы положительные результаты были получены в 15,3 % случаев.

6. При определении хлопьеобразующего фактора с применением цитратной кроличьей плазмы положительных результатов получено не было. Все штаммы *S. hyicus* продуцируют ферменты гиалуронидазу и ДНК - азу, 65 % штаммов обладают фибринолитической активностью.

7. Гемолитическая активность *S. hyicus* проявляется при постановке CAMP-теста (теста на синергетический гемолиз) на агаре с добавлением дефибринированной или цитратной крови барана. Самостоятельный гемолиз на указанном агаре не проявляется. Это говорит о наличии у *S. hyicus* δ - гемолизинов и отсутствии α - и β - гемолизинов.

8. Большинство штаммов *S. hyicus* коагулируют человеческую цитратную плазму, гемолизируют человеческие эритроциты и проявляют фибринолитическую активность на агаре с добавлением человеческой плазмы, что говорит о потенциальной опасности данного микроба для человека.

9. Культуры *S. hyicus* проявляли высокую чувствительность к препаратам пенициллинового ряда (ампициллин, пенициллин, оксациллин), к неомицину, фуразолидону и гентамицину. Указанные препараты могут быть эффективными при лечении заболеваний, вызываемых *S. hyicus*.

10. Апробированная нами методика определения наличия у *S. hyicus* генов, детерминирующих синтез эксфолиативных токсинов *exhA*, *exhB*, *exhC*, *exhD* методом ПЦР может быть рекомендована при диагностике экссудативного эпидермита свиней.

11. Разработанная и апробированная нами идентификация *S. hyicus* по обнаружению гена *sodA* видо - специфичной супероксиддисмутазы может быть рекомендована для практического использования при идентификации *S. hyicus* полимеразной цепной реакцией.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

По результатам исследований разработаны «Методические рекомендации по идентификации и определению факторов патогенности *Staphylococcus hyicus* – возбудителя эксудативного эпидермита (мокнущей экземы) свиней», рассмотренные и одобренные на заседании секции «Инфекционная патология животных» Отделения ветеринарной медицины РАСХН 30 марта 2006 г. протокол № 1.

5. СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Войтенко А.В. Биологические свойства *Staphylococcus hyicus*, выделенных от свиней / А.В. Войтенко // Материалы Международной научно-практической конференции «Повышение эффективности лечения и профилактики акушерско-гинекологических заболеваний и биотехники размножения животных», 8-9 июля, 2005 г. Киров. – С. 37.

2. Войтенко А.В. Эксудативный эпидермит свиней / А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов // Материалы IX Международной научно-производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения». – 12-14 мая, 2005 г., Белгород. – С. 86.

3. Войтенко А.В. Изучение патогенности *Staphylococcus hyicus* для поросят / В.Н. Скворцов, А.В. Войтенко, А.А. Балбуцкая // Материалы X Международной научно-производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения». Том II. – 15-19 мая, 2006 г., Белгород. – С. 52.

4. Войтенко А.В. Биохимические свойства коагулазоположительных стафилококков, выделенных от больных маститом и эндометритом коров / А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов, Н. Образцова // Материалы X Международной научно-производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения». – 15-19 мая 2006 г., Белгород. – С. 53.

5. Войтенко А.В. Плазмокоагулирующая активность *Staphylococcus hyicus* – возбудителя эксудативного эпидермита свиней / А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов, Е. Щепкина // Материалы X Международной научно-производственной конференции «Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения». – 15-19 мая 2006 г., Белгород. – С. 6.

6. Войтенко А.В. Чувствительность *Staphylococcus hyicus* к антимикробным препаратам / В.Н. Скворцов, А.В. Войтенко, А.А. Титов, О.В. Папчук, А.А.

Балбуцкая // Материалы XVIII Международной научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии». – 16-19 мая 2006 г., Санкт-Петербург. – С. 69.

7. Войтенко А.В. Идентификация *Staphylococcus hyicus* методом полимеразной цепной реакции по обнаружению гена супероксиддисмутазы *sodA* / А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов, К. Лэммлер и др. // Материалы Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных». – 16-17 мая 2006 г., Москва. – С. 452-456.

8. Войтенко А.В. Экспериментальное заражение поросят токсин-продуцирующими штаммами *Staphylococcus hyicus* / А.В. Войтенко, В.Н. Скворцов, А.А. Балбуцкая // Ветеринарная патология. – № 3. – 2006. – С. 80-83.

9. Voytenko A.V. Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *sodA* / A.V. Voytenko, T. Kanbar, J. Alber, C. Laemmler et al. // *Vet. Microbiol.* – 2006. – Aug. 25. – 116 (1-3). – P. 211–216.

**АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ
ВОЙТЕНКО**

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *STAPHYLOCOCCUS HYICUS*
И ЕГО РОЛЬ В ПАТОЛОГИИ СВИНЕЙ**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать 17.08.06 г. Усл.п.л. 1,5
Заказ № 286. Тираж 120

ООО ИПЦ «ПОЛИТЕРРА»
308002, г. Белгород, ул. Курская, 4, офис 5.
Тел/факс (0722) 26-26-82
Тел. 8-9103601499

