

Козловская А.В., кандидат ветеринарных наук¹
Ивченко В.М., доктор ветеринарных наук²
Скибицкий В.Г., доктор ветеринарных наук¹
Борисевич Б.В., доктор ветеринарных наук¹
Солонин П.К., кандидат ветеринарных наук¹

¹Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины, г. Киев

²Белоцерковский национальный аграрный университет, г. Белая Церковь

ЭНТЕРОТОКСИГЕННОСТЬ ШТАММОВ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Резюме

В статье изложены результаты изучения энтеротоксигенности штаммов *Yersinia enterocolitica*, выделенных из продуктов убоя животных и молока. В экспериментах на морских свинках (заражение в изолированную петлю кишечника) определено, что 8 среди 14 исследованных штаммов возбудителя иерсиниоза (57%) обладали выраженными энтеротоксигенными свойствами, обуславливали накопление жидкости в изолированных сегментах тонкой кишки (индекс дилатации 1 и выше) и патоморфологические, макро- и микроструктурные изменения в органах и тканях подопытных животных. Энтеротоксигенные штаммы *Yersinia enterocolitica* принадлежали к различным сероварам (O:3, O:9, O:6.30).

Summary

The article presents the results of studying the enterotoxigenicity of strains of *Yersinia enterocolitica* isolated from the products of slaughter of animals and milk. In experiments on guinea pigs (infection in an isolated intestinal loop), it was determined that 8 of 14 strains of the yersiniosis pathogen (57%) had pronounced enterotoxigenic properties, caused accumulation of fluid in isolated segments of the small intestine (dilatation index 1 and above) and morphological, macro- and microstructural changes in the organs and tissues of experimental animals. Enterotoxigenic strains of *Yersinia enterocolitica* belonged to different serovars (O:3, O:9, O:6.30).

Поступила в редакцию 18.01.2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Экологические и биологические особенности *Yersinia enterocolitica*, в частности, способность относительно легко «переключаться» из сапрофитного к паразитическому существованию и наоборот, создают довольно сложную медико-ветеринарную проблему.

Иерсиниоз (кишечный иерсиниоз) у человека и животных может протекать в виде типичного манифестационного инфекционного заболевания или же иметь характер пищевой токсикоинфекции [1–4, 6, 7, 8].

Несмотря на наличие достаточно эффективных средств и методов диагностики, разработанных и внедренных в практику рекомендаций по профилактике иерсиниоза у человека и животных [10], существует необходимость дальнейшего изучения ряда элементов, касающихся, в частности, ток-

сигенных свойств штаммов возбудителя, изолированных из различных источников.

Целью настоящего исследования являлось изучение энтеротоксигенных свойств штаммов *Yersinia enterocolitica*, выделенных из животноводческого сырья и пищевых продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась на базе кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Национального университета биоресурсов и природопользования Украины и кафедры диагностики инфекционных заболеваний Белоцерковского национального аграрного университета. Некоторые исследования осуществлены в отделе молекулярной диагностики Украинской лаборатории качества и безопасности продукции АПК (г. Киев).

Бактериологические исследования образцов мяса, мясных продуктов, молока и молочных продуктов с целью выделения *Y. enterocolitica* проводили, используя ранее апробированные методики [5].

Отобранные на основе характерных для *Y. enterocolitica* морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств изоляты идентифицировали в ПЦР [9].

Серотипирование выделенных штаммов *Yersinia enterocolitica* осуществляли путем постановки РА с диагностическими монорецепторными сыворотками крови (производство НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, г. Санкт-Петербург, РФ).

Энтеротоксигенные свойства выделенных штаммов *Y. enterocolitica* изучали, используя методику «изолированной петли кишечника» на морских свинках [6]. При этом в изолированные сегменты двенадцатиперстной кишки вводили 48-часовую агаровую культуру исследуемого штамма *Y. enterocolitica* в дозе 0, 1 см³ (500 тыс. КОЕ), в контрольные сегменты – по 0,1 см³ 0,85%-го раствора натрия хлорида. Спустя 24 ч определяли наличие и количество жидкости в экспериментальных и контрольных сегментах, рассчитывали индекс дилатации (ID), используя формулу:

$$ID = P / D, \text{ где}$$

P – объем жидкости (см³);

D – длина сегмента кишечника (см).

Штаммы *Y. enterocolitica*, имеющие индекс дилатации 1 и выше, относили к энтеротоксигенным. Анализировали также макро- и микроскопические изменения в органах и тканях подопытных животных.

Патологоанатомическое вскрытие производили методом частичной эвисекции в общепринятой последовательности. Для гистологического исследования отбирали кусочки почек, сердца, печени, селезенки, легких, тимуса, поджелудочной железы, соматические и висцеральные лимфатические узлы, а также участки тонкого и толстого кишечника. Материал фиксировали 10%-м раствором нейтрального формалина, осуществляли заливку в парафин, получали срезы толщиной 7–10 мкм и окрашивали гематоксилином Караци и эозином (Горальский Л.П. и др. 2005).

Эксперименты на животных осуществлены согласно требованиям биоэтики (Страсбург, 1986). Выведение животных из экспериментов производили путем эвтаназии с помощью эфира для наркоза (Коцюмбас И.Я. и др., 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При исследовании 892 образцов материалов, отобранных из животноводческого сырья и продуктов животноводства, реализуемых в условиях продовольственных рынков, были изолированы 50 штаммов *Yersinia enterocolitica*. Кроме того тринадцать изолятов определены как *Yersinia spp.* (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования животноводческого сырья и продуктов животноводства на контаминацию возбудителем иерсиниоза

№ н/п	Исследуемый материал	Количество исследованных образцов	Выделены микроорганизмы рода <i>Yersinia</i>			
			<i>Yersinia enterocolitica</i>		<i>Yersinia spp.</i>	
			к-во	%	к-во	%
1	2	3	4	5	6	7
1	продукты убоя скота	260	15	5,8	10	3,8
2	продуктов убоя свиней	408	26	6,4	3	0,7
4	фарш мясной	20	1	5,0	-	-
5	мясные продукты из свинины	25	-	-	-	-
6	молоко коровье	85	5	5,9	-	-
7	молочные продукты	94	3	3,2	-	-
Всего		892	50	5,6	13	1,45

Типированные с помощью имеющихся в распоряжении авторов диагностических сывороток штаммы *Yersinia enterocolitica* относились к сероварам O:3, O:9 и O:6.30. Принадлежащий к серовару O:3 штамм *Y. enterocolitica* был изолирован из продуктов убоя свиней. К серовару O:9 были отнесены 2 штамма, выделенные из продуктов убоя телят и 1 штамм, изолирован-

ный из молока. Три штамма *Y. enterocolitica*, выделенные из продуктов убоя телят, и 4 – из продуктов убоя свиней принадлежали к серовару O:6.30.

При исследовании 14 штаммов *Y. enterocolitica*, выделенных из продуктов убоя животных, молока и мясного фарша, энтеротоксигенными оказались 8 (57%) штаммов.

Таблица 2 – Результаты определения энтеротоксигенности *Y. enterocolitica* на морских свинках

№ штамма	Источник выделения штамма	ИД<1	ИД≥1
122	печень теленка		+
139	л/у теленка	+	
142	печень теленка	+	
560	молоко коровье	+	
614	загл. л/у свиные		+
616	язык свиной	+	
652	печень свиная		+
656	язык свиной		+
670	загл. л/у свиные		+
744	язык свиной	+	
816	язык свиной		+
986	печень свиная		+
1086	фарш со свинины	+	
511	молоко коровье		+
Всего		6	8

При патологоанатомическом вскрытии трупов подопытных морских свинок наиболее выраженные макроскопические изменения, характерные для катарально-геморрагического воспаления, были обна-

ружены в тонкой кишке (рисунок 1). Отмечены также изменения в сердце, печени и почках. Сердце было увеличено за счет правой стороны. В печени и почках имели место дистрофические изменения.

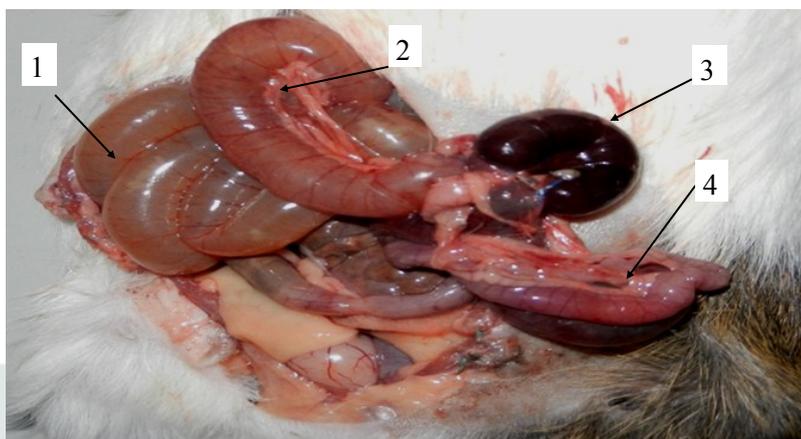


Рисунок 1 – Признаки энтеротоксигенности штаммов *Y. enterocolitica* (у морской свинки):
1, 2 – сегменты кишки наполнены жидкостью (штаммы №122, №511);
3 – некроз участка кишечника (штамм №614),
4 – контрольный сегмент – признаки энтеротоксигенности отсутствуют

При микроскопии срезов зарегистрированы выраженные гистоструктурные изменения в кишечнике, в сердце, печени, се-

лезенке, почках, в поджелудочной железе, в соматических и висцеральных лимфатических узлах (рисунок 2, 3, 4).

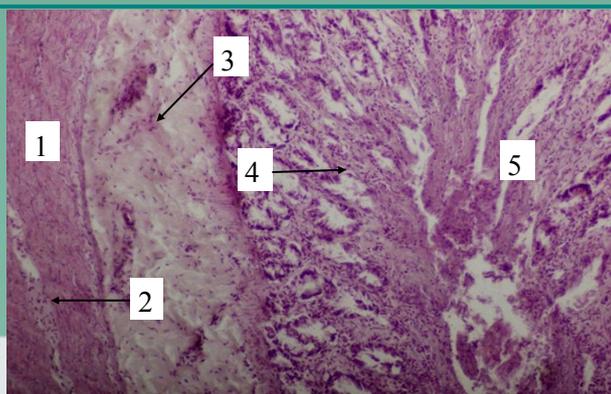


Рисунок 2 – Микроструктура тощей кишки инфицированной морской свинки: 1 – зернистая дистрофия гладких мышечных клеток; 2 – отек между внутренним и внешним слоями мышечной оболочки; 3 – отек в подслизистом слое; 4 – признаки разрушения энтероцитов на ворсинках; 5 – некроз клеток стромы ворсинки и разрушение ее верхушки. Окраска гематоксилин Карацци и эозин, × 80

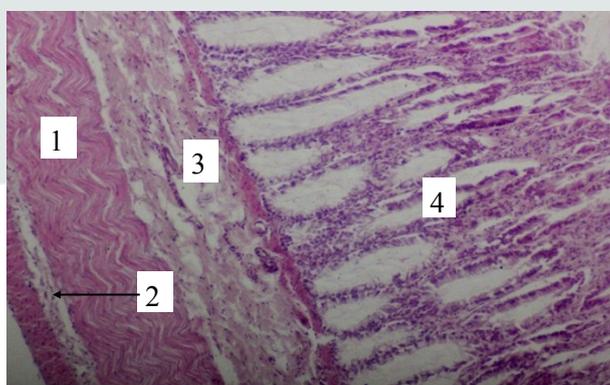


Рисунок 3 – Ободочная кишка: 1 – зернистая дистрофия гладких мышечных клеток; 2 – отек между внутренним и внешним слоями мышечной оболочки; 3 – отек подслизистой основы; 4 – слизистая оболочка. Гематоксилин Карацци и эозин, ×80

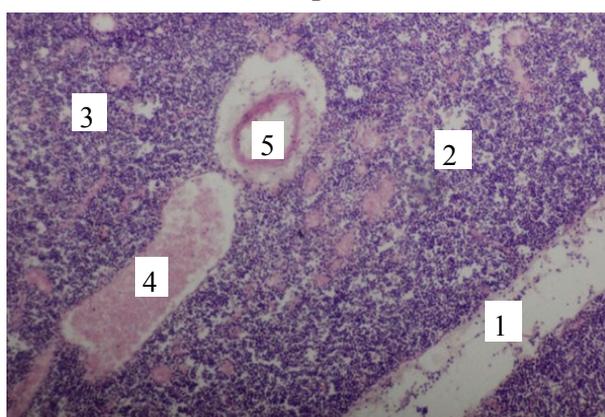


Рисунок 4 – Тимус морской свинки: 1- отек междольковой соединительной ткани; 2-корковое вещество; 3 – мозговое вещество; 4-расширенная, переполненная кровью вена; 5 – интенсивный отек вокруг расширенной вены. Гематоксилин Карацци, эозин, × 80

У контрольных (не зараженных) морских свинок, подвергаемых аналогичным манипуляциям, подобные макро- и микроструктурные изменения не обнаруживались.

Отсутствовали они и в контрольных изолированных сегментах кишечника подопытных животных. При бактериологическом исследовании образцов крови, внутренних

органов и соматических лимфоузлов подопытных животных микроорганизмы не обнаружены, что свидетельствует о токсигенном происхождении выявленных гистологических изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди исследованных факторов патогенности *Yersinia enterocolitica* наиболее выраженным агрессивным действием обладают экзотоксины, в частности, термостабильные энтеротоксины YST-1 и YST-11 [11, 12].

Известно, что молекулы термостабильного энтеротоксина *Y. enterocolitica* подобно энтеротоксинам других энтеробактерий [13] взаимодействуют с рецепторами клеточных мембран, что в итоге приводит к активации гуанилатциклазного комплекса, локализованного на плазматической мембране энтероцитов и обуславливает преобразование гуанозин-3,5-трифосфата (ГТФ) в циклический гуанозин-3, 5-монофосфат

(цГМФ). Последнее вызывает гиперсекрецию жидкости в просвет кишечника, дегидратацию организма, которая, несомненно, является важным патогенетическим элементом развития описанных выше структурных повреждений в организме при иерсиниозе.

Дальнейшее изучение способности циркулирующих в природе штаммов *Y. enterocolitica* к токсинообразованию, изучение обстоятельств, способствующих накоплению токсинов в пищевых продуктах, познание сущности явлений, обуславливающих описанные патоморфологические изменения, необходимы для разработки средств терапии и профилактики иерсиниоза, внедрения системы надежного контроля пищевой безопасности человека и животных. Авторы данного сообщения продолжают изучение циркулирующих в природе штаммов *Y. enterocolitica* в упомянутом аспекте.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Возианова, Ж.И. Заболевания, вызываемые иерсиниями / Ж.И. Возианова // Инфекционные и паразитарные болезни. – Киев: Здоровье, 2000. – Т. 1. – С. 458–497.
- 2 Головчак, Г.С. Состояние заболеваемости населения Украины иерсиниозами и клинико-эпидемиологические особенности проявления инфекции / Г.С. Головчак // Медицина сегодня и завтра. – 1999. – №1. – С. 91–93.
- 3 Зыкин, Л.Ф. Иерсиниоз и псевдотуберкулез сельскохозяйственных животных / Л.Ф. Зыкин, А.А. Щербаков, З.Ю.Хапцев // Саратов, 2002. – 67 с.
- 4 Козловська, Г.В. Іерсиніозна токсикоінфекція / Г.В. Козловська / К.: Нічлава, 2012. – 148 с.
- 5 Методичні рекомендації з лабораторної діагностики кишкового іерсиніозу тварин, виявлення *Yersinia enterocolitica* у харчових продуктах, кормах для тварин та об'єктах довкілля / С.Д. Мельничук, В.Г. Скибіцький, Г.В. Козловська [та ін.] // К.: ЗАТ «Нічлава», 2013. – 37 с.
- 6 Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине: справочное пособие / А.Н. Головкин, [и др.]; под ред. А.Н. Головкин. – Х. «НТМТ», 2007. – 512 с.
- 7 Поліщук, Н.М. Епідеміологічні та епізоотологічні аспекти іерсиніозів / Н.М. Поліщук // *Annals of Mechnicov Institute*, 2008. – №4. – Р. 5–8.
- 8 Скибіцький, В.Г. Збудник кишкового іерсиніозу. – *Yersinia enterocolitica* та пов'язані з ним проблеми / В.Г. Скибіцький, Г.В. Козловська // Гуманітарні та ресурсні проблеми національної безпеки України. – К.: ВПК «Експрес-Поліграф», 2012. – Книга 1. – С. 19–31.
- 9 Скибіцький, В.Г. Збудник кишкового іерсиніозу у продуктах забою свиней // В.Г. Скибіцький, Г.В. Козловська [та ін.] // *Ветеринарна медицина України*. К. – №11(213). – 2013. – С.19–21.
- 10 Ушкалов, А.В. Епізоотична та епідеміологічна характеристика іерсиніозів / А.В. Ушкалов // *Ветеринарна медицина України*, 2013. – №11(213). – С.15–18.
- 11 Bielecka, Z. *Temperatura-dependent production of enterotoxin by Yersinia enterocolitica isolated from healthy swines* / Z. Bielecka [et al.] // *Med. Dosw. I microbial.* –1988. – vol. 40. – №3. – P.124–129.
- 12 Francis, D. *Enterotoxin production and thermal resistance of Yersinia enterocolitica in milk* / D. Francis, P. Spaulding, J. Lovelt // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1980. – vol. 40. – P. 174–176.
- 13 Sears, C.L. *Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion* / C.L. Sears, J.B. Kaper // *Microbiol. Rev.* – 1996. – vol. 60. – P. 167–215.