

## Ветеринарная микробиология, ветеринария

УДК 636.619: [579.62+591.8

### **ХАРАКТЕРИСТИКА ТОКСИГЕННОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ БОЛЕЗНЯХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Е.М. ЛЕНЧЕНКО, Е.А. МАНСУРОВА, А.В. МОТОРЫГИН**

Как известно, у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые занимают существенное место в этиологии неонатальных заболеваний сельскохозяйственных животных, в большинстве случаев отсутствует корреляция между серологической группой и токсигенностью. В связи с этим при диагностике целесообразно либо выявлять бактериальные адгезины, либо непосредственно подтверждать присутствие токсинов на различных лабораторных моделях, что, как правило, достаточно сложно и занимает много времени. Мы оценили токсигенность и вирулентность у патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, выделенных при желудочно-кишечных болезнях молодняка сельскохозяйственных животных (1-5-суточные телята голштинской и чернопестрой пород), и у референтных штаммов с использованием различных тестов на лабораторных животных (беспородные белые мыши, морские свинки линии Self, кролики породы Chinchilla и перепела *Coturnix coturnix*). Доминирующая часть эпизоотических энтеробактерий, выделенных нами от телят (64 из 86 изолятов), идентифицировалась как *Escherichia coli*. Из изолятов *E. coli* 34 не серотипировались по O-антигену. При этом 35,0 % таких изолятов оказались патогенными и 65,0 % — непатогенными в тесте на белых мышах при внутрибрюшинном заражении бактериальной суспензией. В то же время токсигенность была выявлена у 53,9 % изученных изолятов и референтных штаммов энтеробактерий родов *Salmonella* (2 изолята), *Klebsiella* (2 изолята), *Kluyvera* (1 изолят), *Yersinia* (3 изолята), *Escherichia* (13 изолятов). Умеренно токсигенными и слаботоксигенными свойствами характеризовались соответственно 15,4 и 38,5 % изолятов, нетоксигенными — 46,1 %. Гистохимическими методами выявлены структурные изменения в тканях и органах лабораторных животных при экспериментальном моделировании токсемии, вызываемой энтеробактериями. При экспериментальной токсемии, обусловленной токсинами *E. coli* и *Y. pseudotuberculosis*, динамика патологических процессов характеризовалась развитием гидропической дистрофии эпителиоцитов ворсинок в тонком отделе кишечника, а также общей реакции сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке желудка, тонкого и толстого отделов кишечника животных.

**Ключевые слова:** энтеробактерии, желудочно-кишечные заболевания, сельскохозяйственные животные, лабораторные модели, токсемия.

В структуре неонатальной патологии сельскохозяйственных животных, в том числе птицы, существенное место занимают инфекционные болезни, в этиологии которых значительную долю составляют патогенные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *Salmonella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*, *Yersinia*. Реализация взаимоотношений патогенных энтеробактерий с организмом восприимчивого животного обеспечивается спектром специфических факторов патогенности, в том числе благодаря способности продуцировать токсины, принимающие участие в развитии патологического процесса (1-4). Учитывая, что в большинстве случаев корреляция между серологической группой и токсигенностью у энтеробактерий отсутствует, целесообразным представляется выявление либо адгезинов, либо непосредственно токсинов с применением различных лабораторных моделей, как правило, характеризующихся сложностью воспроизведения и чрезвычайной продолжительностью исполнения (5).

Целью работы была оценка токсигенности энтеробактерий, доминирующих при желудочно-кишечных болезнях молодняка сельскохозяйственных животных, с использованием различных лабораторных тестов, а также регистрации гематологических и гистохимических изменений, наблюдаемых при инфицировании лабораторных животных.

**Методика.** Исследовали изоляты энтеробактерий, выделенные из патологического материала, смывов из носовой полости и из фекалий теллят голштинской и черно-пестрой пород в возрасте от 1 до 5 сут ( $n = 70$ ) из хозяйств Кораблинского района Рязанской области. Видовую принадлежность изолятов идентифицировали с использованием дифференциально-диагностических питательных сред: ВСА, Эндо («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия), Rambach agar, XLT-4 agar, Cromocult Coliform agar («Merck KGaA», Германия). Биохимические свойства микроорганизмов изучали с использованием сред Гисса и множественной тест-системы «Пластина биохимическая, дифференцирующая энтеробактерии» («ПБДЭ», НПО «Диагностические системы», г. Нижний Новгород, Россия) и API («BioMérieux S.A.S.», Франция). Для серотипирования *E. coli* по O-антигену применяли диагностические сыворотки (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия) в соответствии с рекомендациями («Наставления по применению агглютинирующих O-коли сывороток». М., 1998). В качестве референтных использовали паспортизированные штаммы *Escherichia coli* O2 № 388, *E. coli* O78:K80 № 320, *E. coli* O138:K81 № 723, *Klebsiella pneumoniae* № 356, *Salmonella typhimurium* № 5715, *Yersinia pseudotuberculosis* I № 290, *Y. enterocolitica* (S- и R-формы) № 383 (получены из коллекции «Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» — ВГНКИ, г. Москва).

Патогенные и токсигенные свойства энтеробактерий изучали общепринятыми методами на лабораторных животных — беспородных белых мышках (живая масса 14-16 г), морских свинок (линия Self, живая масса 200-300 г), кроликах (порода Chinchilla, живая масса 2,5 кг) и перепелах *Coturnix comuni* (6, 7).

При оценке патогенности изолятов заражали беспородных белых мышей внутрибрюшинно взвесью микроорганизмов (по  $0,5 \text{ см}^3$ ; плотность бактериальной суспензии —  $1 \text{ млрд кл/см}^3$ ) ( $n = 60$ ). Для наблюдения за местными изменениями в слизистых оболочках с применением кератоконъюнктивальной пробы морским свинкам ( $n = 6$ ) в конъюнктивальную полость вводили взвесь изучаемых микроорганизмов ( $1 \times 10^9$ – $1 \times 10^{10}$  клеток) (8). При исследовании токсигенных свойств штаммы предварительно выращивали в жидкой среде Хоттингера в течение 24 ч при  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* — при  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ), культуры (S-формы) осветляли центрифугированием (6000 об/мин в течение 30 мин) и супернатант использовали в плантарном тесте и тесте расширения кишечника. В плантарном тесте осветленную культуральную жидкость вводили беспородным белым мышам ( $n = 3$ ) в область плантарной поверхности лапы (в контроле стерильный бульон Хоттингера инъецировали в другую лапу в том же количестве). В тесте расширения кишечника белым беспородным мышам-сосункам 2-3-суточного возраста per rectum вводили надосадочную жидкость в объеме 0,2 мл и рассчитывали коэффициент расширения тонкого кишечника (отношение массы тонкого кишечника с содержанием к остальной массе тела).

С целью исследования клинко-гематологических показателей морским свинкам ( $n = 6$ ) и кроликам ( $n = 6$ ) внутрибрюшинно в дозе  $5 \times 10^9$  клеток вводили 18-часовую бактериальную культуру; в аналогичных контрольных группах животным инъецировали стерильный раствор NaCl (0,9 %). При изучении клинко-гематологических изменений у 10-суточных перепелов *Coturnix comuni* ( $n = 12$ ) птицу интраназально заражали 18-часовой культурой *E. coli* 1111 (O149:K91:K88) в дозе  $5 \times 10^9$  бактериальных клеток. Клинко-гематологические показатели изучали на морских свин-

ках при внутрибрюшинном заражении референтным штаммом *Y. pseudotuberculosis* I и изолятом *E. coli* O115.

Для оценки динамики гибели белых мышей использовали внутрибрюшинное заражение культурой микроорганизмов (500 млн кл/см<sup>3</sup>) и интрагастральное введение 0,5 см<sup>3</sup> токсина, полученного после осветления жидкой культуры. Из животных по принципу аналогов сформировали 6 групп (по 10 гол. в каждой): особям из I и II группы вводили соответственно культуру микроорганизмов и токсин *E. coli* O8 (выделен из фекалий 3-суточного теленка с клиническими признаками диареи; из III и IV — соответственно культуру микроорганизмов и токсин *K. pneumoniae* (референтный штамм № 356); из V групп — внутрибрюшинно ассоциацию (по 250 млн кл/см<sup>3</sup>) культур микроорганизмов *E. coli* O8 и *K. pneumoniae*; из VI группы (контроль) — внутрибрюшинно и интрагастрально стерильный раствор NaCl (0,9 %). Рассчитывали летальность (отношение числа погибших от болезни к числу заболевших) и смертность (отношение числа погибших от болезни к общей численности контролируемой популяции).

Патологоанатомические исследования проводили общепринятыми методами, при гистохимических исследованиях патологический материал от животных и птицы фиксировали 10,0 % формалином и заключали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, по Крантцу и по Лейшману.

В экспериментах использовали анализаторы крови фирмы «Mindray» (Китай); микроскоп модели H604 Trinocular («Unico, Inc.», США) с цифровой фотокамерой Canon Power Shot A 640 (США), цифровую окулярную видеокамеру MA 88 («Night Technology Inc.», США).

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики в соответствии с методическим руководством с применением программы Statgraphics Plus v. 5.0 (9).

**Результаты.** Использование питательных сред Rambach agar, XLT-4 agar, Cromocult Coliform agar при проведении бактериологических исследований позволило идентифицировать и дифференцировать колонии таксономически сходных видов энтеробактерий. Результаты идентификации с применением сред Гисса согласовывались с результатами тест-систем, но последние позволяли сократить сроки и снизить затратность процедуры. Из патологического материала, смывов из носовой полости и фекалий телят, а также смывов, полученных в репродукторных помещениях животноводческих объектов, выделили 86 культур микроорганизмов, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae*, из которых 64 культуры идентифицировались как *E. coli*, 10 — как *Proteus mirabilis*, 9 — *Klebsiella pneumoniae*, 3 — *Salmonella typhimurium*, то есть среди них доминировали эшерихии.

При серологической идентификации с использованием О-копи сывороток из 139 эпизоотических штаммов *E. coli* к группе O8 отнесли 20 штаммов, к O141 — 27, O138 — 18, O9 — 11, O139 — 9 и к O157 — 3. К нетипируемым причислили 34 изолята *E. coli*. По данным литературы, серотипирование *E. coli* по О-антигену затруднено из-за узкого спектра и невысокой чувствительности существующих наборов О-копи сывороток, в частности по О-серогруппе не удалось типировать 49,0 % изолятов *E. coli*, выделенных от птицы, и 22,0 % изолятов *E. coli* от пушных зверей (10, 11).

При идентификации микроорганизмов, не типизируемых по О-антигену, в соответствии с общепринятыми методами определяли патогенные свойства при внутрибрюшинном заражении белых мышей. Из исследо-

ванных нами штаммов энтеробактерий 35,0 % оказались патогенными и 65,0 % — непатогенными. Известно, что парентеральное введение иерсиний мышевидным грызунам из-за естественной восприимчивости последних не дает объективных сведений о наличии факторов патогенности у указанных микроорганизмов и их способности вызвать инфекционный процесс (8). Поэтому для изучения патогенных свойств референтных штаммов *Y. enterocolitica* O9 № 383 и *Y. pseudotuberculosis* № 290 мы апробировали кератоконъюнктивальную пробу. Для сравнения в качестве тест-штамма использовали изолят *E. coli* O8, выделенный из фекалий 2-суточного теленка с клиническими признаками диареи. На морских свинках в течение 1 нед при ежедневном осмотре после введения в конъюнктивальную полость взвеси микроорганизмов (штамм *E. coli* O8, референтные штаммы *Y. enterocolitica* O9 № 383 и *Y. pseudotuberculosis* № 290), регистрируя выраженность признаков конъюнктивита (сужение глазной щели, гиперемия конъюнктивы, отек век, наличие и характер отделяемого) и состояния роговицы, установили следующие различия. Штамм *E. coli* O8 вызывал прогрессирующий конъюнктивит и кератит, характеризующийся склеиванием изъязвленных век, обильным гнойным или гнойно-творожистым экссудатом, сильное помутнение роговицы. В случае референтного штамма *Y. enterocolitica* O9 (S-форма) № 383 отмечался выраженный и прогрессирующий к 5-7-м сут конъюнктивит при незначительном непрогрессирующем помутнении роговицы, в то время как в варианте с референтными штаммами *Y. enterocolitica* (R-форма) № 383 и *Y. pseudotuberculosis* № 290 наблюдали незначительно выраженный конъюнктивит через 2-3 сут после заражения, отсутствие или слабую выраженность кератита через 2-3 сут без прогрессирования или даже с исчезновением помутнения роговицы через 5-7 сут. В целом было установлено, что кератоконъюнктивальная проба может считаться чувствительным и легко воспроизводимым в практических условиях тестом для оценки патогенности иерсиний.

В плантарном тесте на продукцию токсина средняя разность массы лапок у мышей в опыте и контроле через 24 ч колебалась от  $6,66 \pm 4,41$  до  $48,33 \pm 3,54$  мг. У 42,8 % изолятов энтеробактерий получили критерий достоверности  $t_d > 9,9$ , что соответствовало достоверности различий  $P \leq 0,01$ ; у 52,4 % изолятов —  $t_d > 4,3$ , что соответствовало достоверности различий  $P \leq 0,05$ . Из 21 изученной культуры референтных и эпизоотических штаммов энтеробактерий, в том числе эшерихий, не типизируемых набором O-копи сывороток, 42,9 % были умеренно токсигенными, 28,5 % — слаботоксигенными и 33,3 % — нетоксигенными (табл. 1).

#### 1. Результаты оценки токсигенности эпизоотических и референтных штаммов энтеробактерий в плантарном тесте на белых лабораторных мышах

Вид микроорганизма, № штамма (источник выделения)	Токсигенность			$t_d$
	масса лапки, мг		средняя разность массы, мг ( $M \pm m$ )	
	опыт	контроль		
<i>Salmonella typhimurium</i> № 5715 (референтный штамм)	205	160	45,00±2,64	12,4
	215	165		
	205	165		
<i>S. typhimurium</i> (смывы, полученные в репродукторных помещениях)	185	165	23,33±6,43	8,3
	185	160		
	200	175		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 356 (референтный штамм)	190	155	38,33±4,32	7,2
	195	150		
	190	145		

<i>K. pneumoniae</i> (смыв со слизистой оболочки носовой полости телянка)	180	155	28,33±5,04	5,9
	180	155		
	185	150		
<i>Kluyvera ascorbata</i> (патологический материал от телянка)	210	160	46,66±4,35	7,4
	205	160		
	210	165		
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> № 290 (референтный штамм)	180	175	6,66±4,41	6,3
	185	170		
	185	180		
<i>Y. enterocolitica</i> O9 S-форма № 383 (референтный штамм)	210	165	48,33±3,54	4,3
	210	165		
	215	160		
<i>Y. enterocolitica</i> O9 R-форма № 383 (референтный штамм)	180	150	30,00±3,26	8,4
	185	155		
	180	150		
<i>Escherichia coli</i> O78 № 320 (референтный штамм)	190	155	36,66±6,10	15,0
	205	165		
	195	160		
<i>E. coli</i> O115 № 580 (референтный штамм)	210	155	55,00±5,40	12,5
	200	140		
	205	155		
<i>E. coli</i> O35 (фекалии телянка)	185	155	21,66±4,72	6,0
	170	150		
	180	165		
<i>E. coli</i> O115 (фекалии телянка)	155	150	3,33±2,26	10,7
	160	155		
	155	155		
<i>E. coli</i> O8 (фекалии телянка)	185	145	40,00±3,52	9,4
	190	145		
	185	150		
<i>E. coli</i> O115 (фекалии телянка)	205	190	11,66±2,35	14,3
	195	185		
	200	190		
<i>E. coli</i> O26 (фекалии телянка)	195	180	13,33±6,34	4,5
	195	180		
	200	190		
<i>E. coli</i> O35 (фекалии телянка)	195	180	18,33±4,15	12,1
	210	185		
	195	180		
<i>E. coli</i> O8 (фекалии телянка)	190	190	1,66±1,27	5,9
	190	185		
	185	185		
<i>E. coli</i> O35 (фекалии телянка)	205	165	40,00±3,41	13,2
	205	160		
	195	160		
<i>E. coli</i> O8 (фекалии телянка)	225	185	41,66±6,14	11,9
	220	180		
	235	190		
<i>E. coli</i> O115 (фекалии телянка)	180	175	3,33±2,26	11,3
	175	170		
	180	180		
<i>E. coli</i> O115 (фекалии телянка)	175	160	13,33±5,14	8,7
	175	160		
	180	170		

Примечание. При средней разности массы лапок 15,00-34,00 мг штамм характеризуется как слабо-токсигенный; 35,00-64,00 мг — как умеренно токсигенный, 65 мг и более — как высокотоксигенный.

Гистохимические изменения в тканях плантарной поверхности лап при введении токсина *Y. pseudotuberculosis* характеризовались деструкцией ороговевшего слоя эпидермиса кожи и общей сосудистой реакцией, отеком и гиперемией соединительной ткани дермы. В сосочковом слое дермы между волокнами рыхлой волокнистой соединительной ткани располагались гомогенные массы экссудата бледно-красного цвета. Гемоциркуляторные изменения проявлялись в виде полнокровия артериол, венул, капилляров, в просвете сосудов микроциркуляторного русла отмечалась агрегация эритроцитов и нити фибрина, что свидетельствовало о процессе тромбообразования, вдоль эндотелия сосудов наблюдалась так называемая

пограничная локализация лейкоцитов. В сосочковом слое дермы между волокнами рыхлой волокнистой соединительной ткани находились гомогенные массы экссудата бледно-красного цвета, наблюдалась инфильтрация лейкоцитами (рис. 1, а, б).

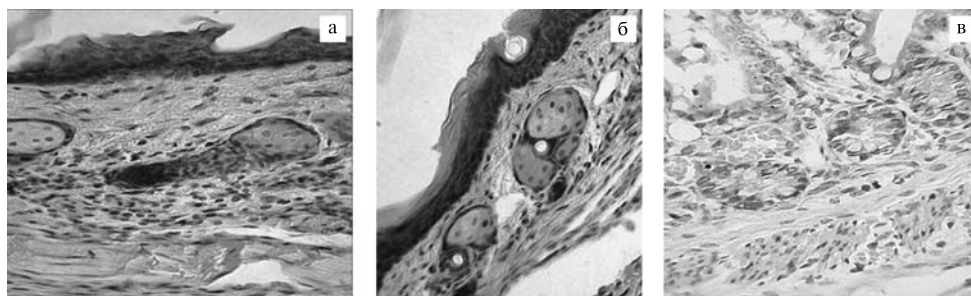


Рис. 1. Морфология тканей у лабораторных мышей после введения бактериальной взвеси референтного штамма *Yersinia pseudotuberculosis* внутрикожно (плантарный тест) и его токсина *per rectum* (осветленная культуральная жидкость, тест расширения кишечника): а — деструкция ороговеющего слоя эпидермиса плантарной поверхности лап, б — инфильтрация лейкоцитами сосочкового слоя дермы плантарной поверхности лап; в — гидропическая дистрофия энтероцитов кишечника. Окрашивание гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 250$ .

В тесте расширения кишечника с использованием надосадочной жидкости *Y. pseudotuberculosis* средние значения коэффициента для тонкого кишечника находились в пределах от  $0,070 \pm 0,009$  до  $0,116 \pm 0,005$ . Из общего числа изученных штаммов 27,7 % характеризовались как токсигенные, 18,1 % — как слаботоксигенные и 54,5 % — как нетоксигенные. Гистохимические изменения при введении токсина энтеробактерий проявлялись в гидропической дистрофии энтероцитов за счет накопления жидкости в цитоплазме клеток, деструктивно-некротических изменениях, во всех оболочках тонкого и толстого отдела кишечника наблюдались сосудистые нарушения и инфильтративные явления (см. рис. 1, в).

В целом результаты теста расширения кишечника и плантарного теста имели высокую степень корреляции ( $r = 0,96$ ). Вместе с тем недостатком теста расширения кишечника на мышах-сосунках следует считать большую чувствительность и гибель животных при транспортировке и содержании, возможность выбраковки при травме кишечника при введении материала. Оценка токсигенности энтеробактерий в плантарном тесте онкометрическим методом с использованием плетизмометра позволяет наблюдать развитие экспериментально вызванной реакции у животных за счет изменения объема вытесняемой жидкости из водной камеры до и через определенный промежуток времени после введения токсина (12).

Оценка динамики гибели белых мышей при внутрибрюшинном заражении и интрагастральном введении токсина изолята *E. coli* O8 и референтного штамма *K. pneumoniae* № 356 показала, что летальность и смертность составили 100 % независимо от способа поступления исследуемого материала в организм. При внутрибрюшинном заражении изолятом *E. coli* O8, выделенным из фекалий 3-суточного теленка с клиническими признаками диареи (I группа), гибель 6 мышей наступила через 24 ч, 4 — через 48 ч, тогда как при интрагастральном введении токсина *E. coli* O8 (II группа) гибель 8 особей регистрировали через 12 ч, 2 — через 24 ч. При внутрибрюшинном заражении культурой микроорганизмов референтным штаммом *K. pneumoniae* № 356 (III группа) гибель 2 мышей зафиксировали через 24 ч, 8 — через 48 ч, тогда как при интрагастраль-

ном введении токсина *K. pneumoniae* № 356 (IV группа) смерть 4 мышей наступила через 12 ч, 6 — через 24 ч. При внутрибрюшинном заражении ассоциацией эшерихий и клебсиелл (V группа) 3 особи погибли через 6 ч, 7 — через 12 ч. В целом при введении токсина животные погибали быстрее, чем при заражении культурой микроорганизмов (рис. 2).

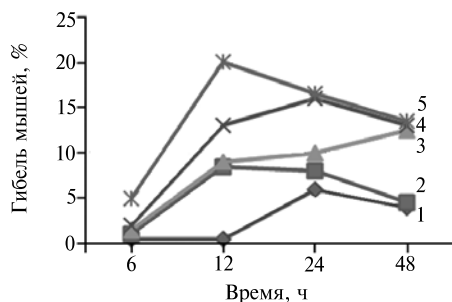


Рис. 2. Динамика гибели лабораторных мышей при внутрибрюшинном заражении культурой энтеробактерий или интрагастральном введении их токсинов: 1 и 2 — I и II группы, соответственно культура и токсин изолята *Escherichia coli* O8 (выделен из фекалий 3-суточного теленка с клиническими признаками диареи); 3 и 4 — III и IV группы, соответственно культура и токсин *Klebsiella pneumoniae* (референтный штамм № 356); 5 — V группа, введение внутрибрюшинно ассоциации *E. coli* O8 и *K. pneumoniae*; 6 — VI группа

(контроль), введение внутрибрюшинно и интрагастрально стерильного раствора NaCl (0,9 %).

При интрагастральном введении токсина *E. coli* O8 и *K. pneumoniae* клинические признаки болезни развивались в первые 6-8 ч в форме общего тремора, судорог, диареи. Патологоанатомические изменения у мышей, погибших через 12 ч после введения токсина, проявлялись полнокровием печени, почек и селезенки. У всех подопытных животных наблюдали увеличение селезенки и мезентериальных лимфатических узлов в 2-3 раза по сравнению с контролем. У части животных отмечались единичные мелкоточечные кровоизлияния в легких и кровянистое содержание в желчном пузыре. У животных, погибших через 24 ч после поступления токсина, наблюдались явления энтеросорбции, характеризующиеся резким и неравномерным вздутием петель кишечника, скоплением жидкости в просвете желудка и кишечника. При гистохимическом исследовании патологический процесс при введении токсина характеризовался сочетанием общей сосудистой реакции с дистрофическими и некротическими изменениями во всех внутренних органах. Гемоциркуляторные изменения проявлялись полнокровием сосудов микроциркуляторного русла, отмечались признаки серозного отека и лейкоцитарная инфильтрация эпителия и собственной пластинки слизистой оболочки всех отделов кишечника, в тонком кишечнике зафиксировали проявления гидропической дистрофии энтероцитов (см. рис. 1, в). Наиболее выраженные изменения обнаруживались в печени, селезенке и лимфатических узлах. В печени регистрировали признаки токсической дистрофии (зернистость и неравномерное окрашивание цитоплазмы гепатоцитов). У части гепатоцитов наблюдалась гипертрофия ядра. В паренхиме имелись многочисленные некротические очажки овальной формы, инфильтрированные полиморфноядерными лейкоцитами. Отмечалось расширение и полнокровие центральной вены, внутридольковые синусоидные капилляры были заполнены студенистой массой бледно-красного цвета. В селезенке и лимфатических узлах лимфоидные фолликулы были мелкого размера без признаков антигенной реакции.

Учитывая данные литературы о восприимчивости лабораторных животных к энтеробактериям (13), клинико-гематологические показатели при внутрибрюшинном заражении референтным штаммом *Y. pseudotuberculosis* исследовали на морских свинках, изолятом *E. coli* O115 — на кроликах. Клинические признаки болезни у морских свинок отмечали на 2-е сут после заражения в виде потери аппетита и отказа от корма, конъю-

юнктивита, повышения температуры тела до 40 °С, прогрессирующей диареи, через 5 сут у животных наблюдались судороги и паралич конечностей. У кроликов клинические признаки болезни регистрировали через 5 сут после заражения *E. coli* O115 (отсутствие аппетита, жажда, цианоз слизистых оболочек, прогрессирующая диарея). Гематологические и биохимические показатели крови и сыворотки крови у животных при заражении *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* O115 характеризовались снижением содержания гемоглобина, альбумина и глюкозы, повышением гематокрита, числа лейкоцитов, количества билирубина, аланинаминотрансферазы (АлАТ), аспартатаминотрансферазы (АсАТ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ), креатинина,  $\alpha$ -амилазы (табл. 2).

**2. Изменение гематологических и биохимических показателей при заражении морских свинок референтным штаммом *Yersinia pseudotuberculosis* и кроликов изолятом *Escherichia coli* O115 ( $M \pm m$ )**

Показатель	Группа лабораторных животных ( $n = 6$ )			
	морские свинки		кролики	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Гемоглобин, г/л	76,0 $\pm$ 1,5	115,0 $\pm$ 0,7	98,0 $\pm$ 1,2	145,0 $\pm$ 0,2
Гематокрит, %	56,8 $\pm$ 0,5	38,7 $\pm$ 1,3	54,7 $\pm$ 0,6	32,6 $\pm$ 1,3
Лейкоциты, тыс/мкл	28,2 $\pm$ 1,6	11,5 $\pm$ 3,2	15,7 $\pm$ 0,1	9,3 $\pm$ 0,3
Эозинофилы, %	2,4 $\pm$ 0,3	2,5 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,6	3,1 $\pm$ 0,6
Базофилы, %	3,3 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,6	2,6 $\pm$ 0,7	3,6 $\pm$ 0,5
Нейтрофилы, %	5,6 $\pm$ 0,3	3,2 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,4	6,3 $\pm$ 0,4
Лимфоциты, %	86,4 $\pm$ 0,8	68,8 $\pm$ 0,7	38,6 $\pm$ 0,6	36,1 $\pm$ 0,8
Моноциты, %	2,0 $\pm$ 0,5	4,6 $\pm$ 0,4	6,1 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,6
Билирубин общий, мкмоль/л	1,3 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 1,5	16,2 $\pm$ 1,6	1,2 $\pm$ 2,6
АсАТ, ед/л	518,0 $\pm$ 0,2	347,0 $\pm$ 0,5	156,0 $\pm$ 1,2	111,0 $\pm$ 1,9
АлАТ, ед/л	135,0 $\pm$ 0,3	76,0 $\pm$ 1,5	113,0 $\pm$ 0,1	75,0 $\pm$ 0,5
ЛДГ, ед/л	685,0 $\pm$ 0,7	456,0 $\pm$ 1,4	201,0 $\pm$ 1,1	130,0 $\pm$ 1,7
Мочевина, моль/л	10,3 $\pm$ 1,3	9,1 $\pm$ 0,7	9,2 $\pm$ 1,1	8,1 $\pm$ 1,5
Креатинин, мкмоль/л	54,7 $\pm$ 1,3	46,5 $\pm$ 1,3	57,8 $\pm$ 1,0	47,5 $\pm$ 2,3
Общий белок, г/л	25,0 $\pm$ 1,8	47,0 $\pm$ 1,4	45,0 $\pm$ 1,9	53,0 $\pm$ 0,3
Альбумин, г/л	38,9 $\pm$ 0,6	25,7 $\pm$ 1,3	53,8 $\pm$ 1,0	27,6 $\pm$ 1,7
Щелочная фосфатаза, ед/л	98,0 $\pm$ 0,5	125,0 $\pm$ 1,2	10,5 $\pm$ 1,3	15,0 $\pm$ 1,9
$\alpha$ -Амилаза, ед/л	1179,0 $\pm$ 0,4	786,0 $\pm$ 1,1	1235,0 $\pm$ 0,3	325,0 $\pm$ 0,5
Глюкоза, моль/л	5,0 $\pm$ 0,9	7,0 $\pm$ 1,9	4,0 $\pm$ 1,9	7,0 $\pm$ 1,5

Пр и м е ч а н и е. АсАТ — аспартатаминотрансфераза, АлАТ — аланинаминотрансфераза, ЛДГ — лактатдегидрогеназа.

$P \leq 0,001$ .

После интраназального заражения 10-суточных перепелов *Coturnix coturnix* ( $n = 12$ ) референтным штаммом *E. coli* 1111 (O149:K91:K88) клинические признаки болезни наблюдали через 3 сут в виде прогрессирующей депрессии, жажды, отсутствия аппетита, цианоза слизистых оболочек, в последующие 4-5 сут развивались признаки диареи. Патологоанатомические изменения, обусловленные подострой септикотоксемией, характеризовались геморрагическим энтеритом, серозно-фибринозным перигепатитом, атрофией фабрициевой бурсы, серозно-фибринозным аэросаккулитом, серозно-фибринозным перитонитом.

При гистохимическом исследовании в слизистой оболочке желудка и тонкого отдела кишечника у птиц отмечали разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, окрашивающейся по Ван-Гизону в красный цвет. В собственной пластинке ворсинок кишечника были видны скопления бактериальных клеток, окрашенных по Крантцу и Лейшману. На всем протяжении кишечника наблюдалась резкая гиперемия, выраженный отек подслизистой основы, множественные кровоизлияния, инфильтрация мононуклеарами и псевдоэозинофилами, диффузная лимфоидная пролиферация. В печени выявляли расширение и полнокровие сосудов порталных трактов и центральных вен долек, в расширенных синусоидных капиллярах имелись скопления гиалиноподобной массы и не-



многочисленные зерна гемосидерина. В фабрициевой бурсе отмечали набухание многорядного призматического эпителия складок слизистой оболочки; в некоторых клетках встречались мелкие вакуоли; в собственном слое слизистой оболочки регистрировали признаки отека. Корковое вещество лимфатических фолликулов было истончено, имелись просветленные участки; в мозговом веществе наблюдали очаги деструкции и лизиса лимфоцитов с явлениями кариопикноза и кариорексиса. При большом увеличении микроскопа в корковом веществе лимфатических фолликулов обнаруживались близкорасположенные лимфоциты, мозговое вещество характеризовалось более светлой окраской. Селезенка была вишневого цвета, кровенаполненная, отмечали отек и частичное разволокнение капсулы. В отдельных участках наблюдались опустошения пульпы (как результат нарушения структурных связей элементов), выявлялись гигантские макрофаги. Венозные синусы красной пульпы были расширенными. В белой пульпе вокруг центральной артерии не отмечали формирования плотного кольца из лимфоцитов, слои оболочек артерий были разволокненными, в центрах размножения происходила пролиферация лимфоцитов. У подопытных перепелов по сравнению с контрольными повышалось число лейкоцитов (соответственно  $33,9 \pm 2,6$  и  $28,3 \pm 3,6$  тыс. кл/мкл), лимфоцитов ( $18,8 \pm 0,7$  и  $15,7 \pm 0,8$  %), моноцитов ( $2,8 \pm 0,4$  и  $2,0 \pm 0,5$  %) и эозинофилов (соответственно  $3,08 \pm 0,63$  и  $1,80 \pm 0,64$  %).

При прогрессирующей диарее на 3-5-е сут после заражения цыплят наблюдались нарушения водно-электролитного баланса. Так, показатели по  $\text{Na}^+$  (ммоль/л) составили в опыте  $128,11 \pm 0,32$ , в контроле —  $154,21 \pm 0,33$ ; по  $\text{K}^+$  (ммоль/л) — соответственно  $33,81 \pm 0,23$  и  $3,97 \pm 0,13$ ; по  $\text{Cl}^-$  (ммоль/л) —  $102,66 \pm 0,31$  и  $101,16 \pm 0,42$ . В первую очередь при потерях ионов натрия развивались компенсаторные изменения кислотно-щелочного состояния, при тяжелой дегидратации — гиперкалиемия. Такие нарушения относятся к тяжелым патоморфологическим синдромам, особенно при средней и тяжелой степени дегидратации, и будучи нераспознанными и неустраненными, во многом определяют выраженность клинических признаков, течение и исход заболевания. Ранее мы сообщали, что при доминировании токсигенных энтеробактерий в микробиоценозах кишечника поросят гематологические показатели характеризовались повышением показателя гематокрита, фагоцитарной активности и общей окислительно-восстановительной способности лейкоцитов крови (14). Наши результаты изучения изменений, происходящих при патологических процессах, в целом согласуются с данными других исследователей: например, установлено, что токсины энтеробактерий, адсорбируясь на эпителиальных клетках ворсинок тонкого кишечника, стимулируют аденилатциклазу, поэтому увеличивается концентрация аденозинмонофосфата, усиливающего гиперсекрецию воды и хлоридов в просвет кишечника и угнетающего резорбцию натрия. Как следствие, просвет кишки переполняется жидкостью, активируется перистальтика кишечника и развивается диарея (15, 16).

Таким образом, при идентификации энтеробактерий, не типизируемых по O-антигену, общепринятая схема бактериологического исследования завершается биологической пробой. Восприимчивость лабораторных моделей зависит от вирулентности возбудителя, дозы, метода введения, чувствительности к термолабильным и термостабильным токсинам. Так, при внутрибрюшинном введении белым беспородным мышам бактериальной взвеси результаты воспроизведения болезни на лабораторных и

естественно восприимчивых животных не коррелируют (16). Установлено, что энтеротоксигенные (ЕТЭС) штаммы *E. coli* продуцируют два типа энтеротоксинов — термолабильный (ТЛЭ) и термостабильный (ТСЭ), различающиеся по структуре, молекулярной массе, иммуногенности, механизмам действия. В настоящее время для оценки ТЛЭ применяют тест отека лап у белых мышей, кожную пробу на кроликах, реакции агрегации тромбоцитов, в случае ТСЭ — инокуляцию 15-суточных куриных эмбрионов и анальную пробу на 15-суточных мышатах-сосунах (5, 16). Однако вследствие того, что оценка токсического эффекта на лабораторных моделях сопряжена с определенными трудностями, перспективными для этих целей признаны тест-системы, основанные на методе обратной пассивной латексной агглютинации, методы иммунодиффузии, позволяющие быстро определить наличие термостабильного и термолабильного токсинов.

Итак, в наших опытах при оценке токсигенных свойств изолятов *Escherichia coli* с применением лабораторных моделей наличие энтеротоксина выявлено у 53,9 % изолятов, при этом умеренно токсигенными и слаботоксигенными свойствами характеризовались соответственно 15,4 и 38,5 % изолятов, нетоксигенными — 46,1 %. При экспериментальной токсемии, обусловленной токсинами *E. coli* и *Yersinia pseudotuberculosis*, динамика патологических процессов характеризовалась развитием гидропической дистрофии эпителиоцитов ворсинок тонкого отдела кишечника и развитием общей реакции сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки желудка, тонкого и толстого отделов кишечника животных.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Светоч Э.А. Факторы патогенности возбудителей эшерихиозов сельскохозяйственных животных. Автореф. докт. дис. М., 1992.
2. Пирожков М.К. Биологические препараты для специфической профилактики и терапии эшерихиоза животных. Автореф. докт. дис. М., 2002.
3. Поздеев О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей /Под. ред. Р.В Федорова. М., 2007.
4. Baines D., Masson L., McAllister T.A. Rapid, sensitive method for testing the activity of *Escherichia coli* 0157: H7 secreted cytotoxins against epithelial cells from the jejunum and descending colon of cattle. *Canad. J. Anim. Sci.*, 2008, 88(1): 51-55.
5. Скородумов Д.И., Субботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. М., 2005.
6. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. М., 2000.
7. Методические рекомендации по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями. М., 1999.
8. Инструкция: эпидемиология, лабораторная диагностика иерсиниозов, организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий. М., 1990.
9. Шмойлова Р.А., Минашкин В.Г., Садовникова Н.А., Шувалова Е.Б. Теория статистики. М., 2006.
10. Капустин А.В. Этиологическая структура эшерихиоза кур. Канд. дис. М., 2001.
11. Толпыгин М.А. Этиологическая структура эшерихиоза пушных зверей и кроликов. Канд. дис. М., 2006.
12. Зиямухамедова М.М., Назарова З.А., Файзуллаева Н.С. Получение жидкого экстракта ханделии волосолистной. *Химико-фармацевтический журнал*, 2006, 40(10): 45-47.
13. Полоцкий Ю.Е., Ценева Г.Я., Ефремов В.Е., Клеганов В.К. Моделирование псевдотуберкулезной инфекции. *Тр. Института имени Пастера «Болезни с природной очаговостью»*, 1983, 60: 91-103.
14. Волкова Е.А., Ленченко Е.М. Перспективы совершенствования лабораторной диагностики желудочно-кишечных болезней поросят, вызываемых энтеробактериями (Мат. Межд. науч.-практ. конф. «Современные средства и методы диагностики, профилактики и лечения инфекционных, протозойных и микотических болезней сельскохозяйственных и промысловых животных, рыб и пчел»). *Тр. ВИЭВ (М.)*, 2009, 75: 127-132.
15. Зароза В.Г. Эшерихиоз телят. М., 1991: 103-106.

16. Тимченко Н.Ф., Недашковская Е.П., Долматова Л.С., Сомова-Исачкова Л.М. Токсины *Yersinia pseudotuberculosis*. Владивосток, 2004.

ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств,  
109316 Россия, г. Москва, ул. Талалихина, 33,  
e-mail: hystology@yandex.ru

Поступила в редакцию  
3 февраля 2013 года

## CHARACTERIZATION OF TOXIGENIC *Enterobacteriaceae* FROM FARM ANIMALS WITH GASTROINTESTINAL DISEASES

*E.M. Lenchenko, E.A. Mansurova, A.V. Motorygin*

Moscow State University of Food Industry, 33, ul. Talalikhina, Moscow, 109316 Russia, e-mail hystology@yandex.ru  
Received February 3, 2013

### Abstract

In most *Enterobacteriaceae* family bacteria, being the main etiological agents of the diseases in young farm animals, there is no strict correlation between a serological group and toxic activity. Thus, when diagnosing the diseases, a direct identification of the bacterial adhesins or the toxin detection with the laboratory animals are conducted, and of these two procedures the animal test is usually long and difficult. We evaluated toxins and virulence in the pathogenic and opportunistic bacteria isolated from 1-5 days Holstein and Black Mottled calves with the diarrhea syndrome, and in the reference strains using different tests with the laboratory animals (white mice, the Self line guinea pigs, Chinchilla rabbits, and quail *Coturnix coturnix*). Most of the samples (64 of 86 isolates) were identified as *Escherichia coli*. In 34 *E. coli* isolates the O-antigen was not detected. In the test on white mice, infected intraperitoneally with a bacterial suspension, 35.0 % and 65.0 % of the bacteria were identified as pathogenic and nonpathogenic, respectively. Nevertheless, the toxins were detected in 53.9 % of the studied isolates and reference strains of *Salmonella* (2 strains), *Klebsiella* (2 strains), *Kluyvera* (a strain), *Yersinia* (3 strains), *Escherichia* (13 strains) genera. Moderate and low toxic properties were identified in 15.4 % and 38.5 % of these isolates, respectively, and in 46.1 % no toxigenic activity was found. By the histochemical methods, the histomorphological changes in tissues and organs of the laboratory animals were revealed under the experimental toxicoinfection caused by *Enterobacteriaceae*. At experimental toxemia, induced by *E. coli* and *Y. pseudotuberculosis* strains, a hydropic dystrophy of the villus epithelium cells developed in the small intestine, and a generalized microvascular reaction occurred in the gastric mucosa and in the mucosa of small and large intestines.

Keywords: enterobacteriaceae, gastroenteric diseases, agricultural animals, laboratory models, toxication.

### Новые книги

Зыкин Л.Ф., Хапцев З.Ю., Спирихина Т.В. **Современные методы в ветеринарной микробиологии**. М.: изд-во «КолосС», 2011, 109 с.

В учебном пособии для вузов описаны современные микробиологические методы применительно к задачам ветеринарных бактериологических, вирусологических и серологических лабораторий. Основное внимание уделено ИФА, РИА, ПЦР и др. Подробно изложена техника постановки этих реакций, подчеркнуты их преимущества перед традиционными методами, приведены примеры их практического использования. Большой раздел отведен современным селективным средам, тест-системам для изучения биохимических свойств микроорганизмов, а также методам определения их чувствительности к антибиотикам. Для студентов вузов по специальности «Ветеринария», практикующих ветеринарных врачей.

Лысов В.Ф., Костина Т.Е., Максимов В.И. **Этология животных**. М.: изд-во «КолосС», 2010, 296 с.

Учебник освещает систематизированную совокупность современных знаний по этологии животных. Весь материал разделен на четыре части. Первая часть посвящена изложению общей этологии, вторая — частной этологии сельскохозяйственных животных, третья — частной этологии домашних животных, четвертая — методике выполнения лабораторных и практических работ по этологии. Материал второй и третьей частей разделен на основные рубрики по видам животных: этология крупного рогатого скота, овец, лошадей, свиней, кроликов, птиц, собак, кошек, как взрослых особей, так и их детенышей. Для студентов высших учебных заведений по специальностям «Зоотехния» и «Ветеринария», других биологических специальностей, слушателей факультетов повышения квалификации.