

Ветеринарная микробиология, ветеринария

УДК 636:619: /579.62+591.8

doi: 10.15389/agrobiology.2014.2.94rus

**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 черно-пестрой 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 coturni*). Доминирующая часть эпизоотических энтеробактерий, выделенных нами от телят (64 из 86 изолятов), идентифицировалась как *Escherichia coli*. Из изолятов *E. coli* 34 не серотипировались по О-антителу. При этом 35,0 % таких изолятов оказались патогенными и 65,0 % — непатогенными в teste на белых мышах при внутрибрюшинном заражении бактериальной супензией. В то же время токсигенность была выявлена у 53,9 % изученных изолятов и референтных штаммов энтеробактерий родов *Salmonella* (2 изолятов), *Klebsiella* (2 изолятов), *Kluuyvera* (1 изолят), *Yersinia* (3 изолятов), *Escherichia* (13 изолятов). Умеренно токсигенными и слаботоксигенными свойствами характеризовались соответственно 15,4 и 38,5 % изолятов, не-токсигенными — 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 оболочки 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, наблюдавшихся при инфицировании лабораторных животных.

Методика. Исследовали изоляты энтеробактерий, выделенные из патологического материала, смызов из носовой полости и из фекалий телят 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: BCA, Эндо («HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.», Индия), Rambach agar, XLT-4 agar, Crotocult 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 О-антителу применяли диагностические сыворотки (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия) в соответствии с рекомендациями («Наставления по применению агглютинирующих О-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 мышах (живая масса 14–16 г), морских свинках (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 см³; плотность бактериальной суспензии — 1 млрд кл/см³) ($n = 60$). Для наблюдения за местными изменениями в слизистых оболочках с применением кератоконъюнктивальной пробы морским свинкам ($n = 6$) в конъюнктивальную полость вводили взвесь изучаемых микроорганизмов (1×10^9 – 1×10^{10} клеток) (8). При исследовании токсигенных свойств штаммы предварительно выращивали в жидкой среде Хоттингера в течение 24 ч при 37 °C (*Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* — при 28 °C), культуры (S-формы) освещали центрифугированием (6000 об/мин в течение 30 мин) и супернатант использовали в плантарном тесте и тесте расширения кишечника. В плантарном тесте освещенную 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 на-досадочную жидкость в объеме 0,2 мл и рассчитывали коэффициент расширения тонкого кишечника (отношение массы тонкого кишечника с содержимым к остальной массе тела).

С целью исследования клинико-гематологических показателей морским свинкам ($n = 6$) и кроликам ($n = 6$) внутрибрюшинно в дозе 5×10^9 клеток вводили 18-часовую бактериальную культуру; в аналогичных контрольных группах животным инъецировали стерильный раствор NaCl (0,9 %). При изучении клинико-гематологических изменений у 10-суточных перепелов *Coturnix comuni* ($n = 12$) птицу интраназально заражали 18-часовой культурой *E. coli* 1111 (O149:K91:K88) в дозе 5×10^9 бактериальных клеток. Клинико-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/см³) и интрагастральное введение 0,5 см³ 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 — внутрибрюшно ассоциацию (по 250 млн кл/см³) культур микроорганизмов *E. coli* O8 и *K. pneumoniae*; из VI группы (контроль) — внутрибрюшно 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 Кранцу 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 окularную видеокамеру MA 88 («Hight 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-коли 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-антителу затруднено из-за узкого спектра и невысокой чувствительности существующих наборов О-коли 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 типируемых по О-антителу, 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 вызывать инфекционный процесс (8). Поэтому для изучения патогенных свойств референтных штаммов *Y. enterocolitica* O9 № 383 и *Y. pseudotuberculosis* № 290 мы aproбировали 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 выраженнуюность 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 гноино-творожистым экссудатом, сильное помутнение роговицы. В случае референтного штамма *Y. enterocolitica* O9 (S-форма) № 383 отмечалась 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 выраженнуюность 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 teste 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 типируемых набором О-коли 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 teste на белых лабораторных мышах

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

Продолжение таблицы 1

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

П р и м е ч а н и е. При средней разности массы лапок 15,00-34,00 мг штамм характеризуется как слаботоксигенный; 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).

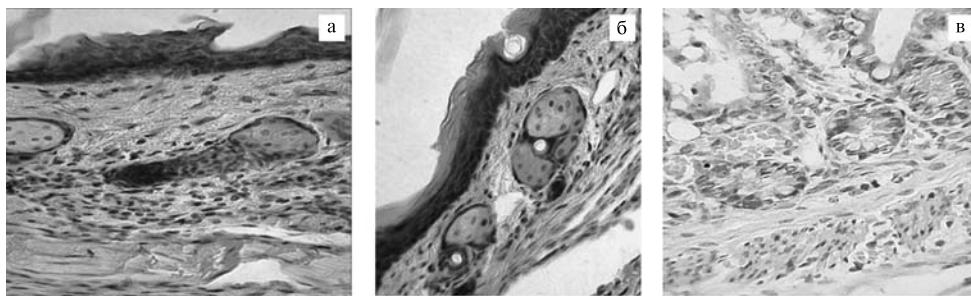


Рис. 1. Морфология тканей у лабораторных мышей после введения бактериальной взвеси референтного штамма *Yersinia pseudotuberculosis* внутрикожно (плантарный тест) и его токсина *regrectum* (осветленная культуральная жидкость, тест расширения кишечника): а — деструкция ороговевшего слоя эпидермиса плантарной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

В teste 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 teste онкометрическим методом с использованием плетизометра 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).

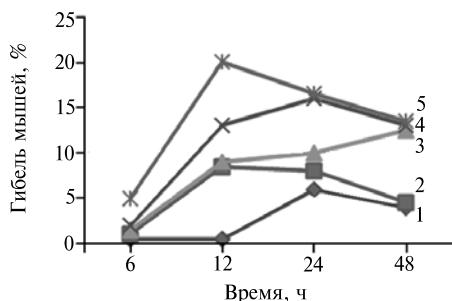


Рис. 2. Динамика гибели лабораторных мышей при внутрибрюшинном заражении культурой энтеробактерий или интрагастральном введении их токсинов: 1 и 2 — I и II группы, соответственно культура и токсин изолята *Escherichia coli* O8 (выделен из фекалий 3-суточного теленка с клиническими признаками диареи);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

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, α -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±1,5	115,0±0,7	98,0±1,2	145,0±0,2
Гематокрит, %	56,8±0,5	38,7±1,3	54,7±0,6	32,6±1,3
Лейкоциты, тыс./мкл	28,2±1,6	11,5±3,2	15,7±0,1	9,3±0,3
Эозинофилы, %	2,4±0,3	2,5±0,2	1,8±0,6	3,1±0,6
Базофилы, %	3,3±0,3	1,4±0,6	2,6±0,7	3,6±0,5
Нейтрофилы, %	5,6±0,3	3,2±0,5	8,4±0,4	6,3±0,4
Лимфоциты, %	86,4±0,8	68,8±0,7	38,6±0,6	36,1±0,8
Моноциты, %	2,0±0,5	4,6±0,4	6,1±0,3	5,2±0,6
Билирубин общий, мкмоль/л	1,3±0,2	0,6±1,5	16,2±1,6	1,2±2,6
АсАТ, ед/л	518,0±0,2	347,0±0,5	156,0±1,2	111,0±1,9
АлАТ, ед/л	135,0±0,3	76,0±1,5	113,0±0,1	75,0±0,5
ЛДГ, ед/л	685,0±0,7	456,0±1,4	201,0±1,1	130,0±1,7
Мочевина, моль/л	10,3±1,3	9,1±0,7	9,2±1,1	8,1±1,5
Креатинин, мкмоль/л	54,7±1,3	46,5±1,3	57,8±1,0	47,5±2,3
Общий белок, г/л	25,0±1,8	47,0±1,4	45,0±1,9	53,0±0,3
Альбумин, г/л	38,9±0,6	25,7±1,3	53,8±1,0	27,6±1,7
Щелочная фосфатаза, ед/л	98,0±0,5	125,0±1,2	10,5±1,3	15,0±1,9
α -Амилаза, ед/л	1179,0±0,4	786,0±1,1	1235,0±0,3	325,0±0,5
Глюкоза, моль/л	5,0±0,9	7,0±1,9	4,0±1,9	7,0±1,5

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

P ≤ 0,001.

После интраназального заражения 10-суточных переполов *Coturnix comuni* ($n = 12$) 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 аэро-саккулитом, 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 Кранцу 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 портальных 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 Na^+ (ммоль/л) составили в опыте $128,11 \pm 0,32$, в контроле — $154,21 \pm 0,33$; по K^+ (ммоль/л) — соответственно $33,81 \pm 0,23$ и $3,97 \pm 0,13$; по 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 неустранимыми, 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 аденоzinмонофосфата, 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 типируемых по О-антителу, 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 (ETEC) 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.

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

Поступила в редакцию
3 февраля 2013 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 2, pp. 94–104

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 histology@yandex.ru
Received February 3, 2013

doi: 10.15389/agrobiology.2014.2.94eng

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 comuni*). 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 tox-ins 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.

R E F E R E N C E S

1. Svetoch E.A. *Faktory patogennosti vozбудитеlei esherikhioz sel'skokhozyaistvennykh zhivotnykh. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Pathogenic factors of farm animal escherichiosis infections. DSc Thesis]. Moscow, 1992.
2. Pirozhkov M.K. *Biologicheskie preparaty dlya spetsificheskoi profilaktiki i terapii esherikhioza zhivotnykh. Avtoreferat doktorskoi dissertatsii* [Biopreparations for prophylaxis and therapy of animal escherichiosis infections. DSc Thesis]. Moscow, 2002.
3. Pozdeev O.K. *Enterobakterii: rukovodstvo dlya vrachei /Pod. red. R.V. Fedorova* [Enterobacteriaceae: a guide for physicians. R.V. Fedorov (ed.)]. Moscow, 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. Skorodumov D.I., Subbotin V.V., Sidorov M.A., Kostenko T.S. *Mikrobiologicheskaya diagnostika bakterial'nykh boleznei zhivotnykh* [Microbiological diagnostics of animal bacterial infections]. Moscow, 2005.
6. *Metodicheskie ukazaniya po bakteriologicheskoi diagnostike kolibakterioza (esherikhioza) zhivotnykh* [Guideline on bacteriological diagnostics of colibacteriosis (escherichiosis) in animals]. Moscow, 2000.
7. *Metodicheskie rekomendatsii po bakteriologicheskoi diagnostike smeshannoi kishechnoi infektsii molodnyaka zhivotnykh, vyzvayemoi patogennymi enterobakteriyami* [Recommendations on bacteriological diagnostics of mixed intestinal infections in young animals caused by pathogenic Enterobacteriaceae]. Moscow, 1999.
8. *Instruktsiya: epidemiologiya, laboratornaya diagnostika iersiniozov, organizatsiya i provedenie profilakticheskikh i protivoepidemicheskikh meropriyatiy* [Epidemiology, diagnostics of *Yersinia*, prophylaxy and antiepidemic measures: instructions]. Moscow, 1990.
9. Shmoilova R.A., Minashkin V.G., Sadovnikova N.A., Shuvalova E.B. *Teoriya statistiki* [Theory of statistics]. Moscow, 2006.
10. Kapustin A.V. *Etiologicheskaya struktura esherikhioza kur. Kandidatskaya dissertatsiya* [Etiological structure of escherichiosis in hens. PhD Thesis]. Moscow, 2001.
11. Tolpygin M.A. *Etiologicheskaya struktura esherikhioza pushnykh zverei i krolikov. Kandidatskaya dissertatsiya* [Etiological structure of escherichiosis in fur-bearing animals and rabbits. PhD Thesis]. Moscow, 2006.
12. Ziyamukhamedova M.M., Nazarova Z.A., Faizullaeva N.S. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 2006, 40(10): 45-47.
13. Polotskii Yu.E., Tseneva G.Ya., Efremov V.E., Kleganov V.K. *Trudy Instituta imeni Pastera «Bolezni s prirodnoi ochagovost'yu»*, 1983, 60: 91-103.
14. Volkova E.A., Lenchenko E.M. *Trudy VIEV (Moscow)*, 2009, 75: 127-132.
15. Zaroza V.G. *Esherikhioz telyat* [Escherichiosis in calves]. Moscow, 1991: 103-106.
16. Timchenko N.F., Nedashkovskaya E.P., Dolmatova L.S., Somova-Isachkova L.M. *Toksiny Yersinia pseudotuberculosis* [Toxins of *Yersinia pseudotuberculosis*]. Vladivostok, 2004.