

На правах рукописи

АНТОНОВА АЛИНА НИКОЛАЕВНА

**ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ЭШЕРИХИОЗА ТЕЛЯТ**

**06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

МОСКВА 2017

Работа выполнена на кафедре «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» Министерства образования и науки РФ

Научный руководитель: **Ленченко Екатерина Михайловна**,
доктор ветеринарных наук, профессор
ФГБОУ ВО «МГУПП», профессор кафедры
«Ветеринарная медицина»

Официальные оппоненты: **Пирожков Михаил Константинович**,
доктор ветеринарных наук,
профессор ФГБУ «ВГНКИ»,
Ведущий научный сотрудник
лаборатории качества и стандартизации
бактериальных лекарственных средств
для ветеринарного применения

Маннапова Рамзия Тимергалеевна,
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВПО Российский государственный
аграрный университет - МСХА имени
К.А. Тимирязева, профессор кафедры
«Микробиология и иммунология»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение высшего образования «Пермская
государственная сельскохозяйственная академия
имени академика Д.Н. Прянишникова»

Защита состоится « » 2017 г. в « » часов на заседании
диссертационного совета Д 212.203.32 при ФГАОУ ВО «Российский
университет дружбы народов» (117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8/2,
зал № 2).

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном
информационно-библиографическом центре Российского университета
дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

Автореферат размещен на сайтах РУДН – www.rudn.ru, <http://vak.ed.gov.ru>.
Автореферат разослан 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук,
доцент

Куликов Евгений Владимирович

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. При реализации системы содержания крупного рогатого скота, концентрации поголовья на ограниченных площадях, комплектовании хозяйств животными одного вида и возраста, наличие морфофункциональных особенностей организма раннего постнатального периода, увеличение числа и спектра патогенных убиквитарных микроорганизмов способствуют распространению инфекционной патологии телят, массовая доля сальмонеллеза составляет 2,3–3,8 %, эшерихиоза – 70,0 – 82,0 % (Каврук Л.С., 1994; Сидоров М.А. и соавт., 1998; Макаров В.В., 2009; 2017; Пирожков М. К., 2011; Сидорчук А.А., 2012; Субботин В. В., 2013; Ленченко Е. М. и соавт., 2014; Шахов А.Г., 2015; Джупина С.И., 2016; Маннапова Р.Т., 2016).

Социальная значимость проблемы определяется тем, что при многократных пассажах возбудителей через восприимчивый организм, атипическом проявлении клинико-морфологических признаков болезней, персистенция бактерий сопровождается контаминацией пищевого сырья, например, говядины – 19,0 – 33,6 %, в том числе *Salmonella spp.* – 19,0 – 27,3 %; энтерогеморрагические эшерихии – 7,3 – 8,4 %; БГКП – 17,8–31,2 % (Шадрова Н.Б., 2012; Быков Г.Т. и соавт., 2016; Костенко Ю.Г., 2016; Татарникова Н.А., Чугунова Е.О., 2016).

Наличие сходных ферментов, популяционная изменчивость, множественность факторов вирулентности, разнообразие лабораторных моделей обуславливают трудоемкость, продолжительность, ретроспективность дифференциации эпизоотических штаммов. Серологическая идентификация сопряжена с вариабельностью поверхностных антигенов: род *Salmonella* объединяет более 2200 серовариантов; *E. coli* – 180 серогрупп – О-антиген, 104 – К-антиген, 56 – Н-антиген; молекулярно-генетическая диагностика – с гомологией нуклеотидных последовательностей энтеробактерий (92,0 %), селекцией и трансмиссией генетических элементов (Самуйленко А.Я. и соавт., 2014; Пирожков М. К., 2016; Афонюшкин В.Н. и соавт., 2017; Ленченко Е. М. и соавт., 2017; *Gast R.K.*, 2016).

Степень разработанности темы. Снижение колонизационной резистентности кишечника животных и адгезия бактерий, формирующих биопленки, замедляют диффузию антибактериальных препаратов, наблюдается тенденция роста множественной лекарственной устойчивости бактерий (Ленченко Е. М. и соавт., 2017; Пахомов Ю.Д., 2016; *Raczkowska A.*, 2011; *Kot B. et al.*, 2011). Устойчивость к антибиотикам группы пенициллинов достигает 42,4 – 57,6%; аминогликозидов – 77,8–100,0 %, фторхинолонов – 56,1 – 80,0 %, тетрациклинов – 14,8 – 81,5 %; рифампицинов – 7,4 – 85,2 % (Пименов Н.В., 2016; Куликовский А.В., Панин А.Н., 2017; *Kumar T.S.*, 2015).

Для практической реализации научных достижений, в том числе, разработки препаратов антигенной и иммуногенной активности, широкого спектра действия, универсальных для животных разных видов и регионов, приоритетным направлением научных изысканий, является исследование этиологической структуры патологии животных, систематическая идентификация микроорганизмов, оценка и управление опасными факторами, при организации контроля критических точек технологии животноводства, пищевых и биотехнологических производств.

Цель исследований: изучить этиологическую значимость факторов вирулентности энтеробактерий, доминирующих в микробиоценозах кишечника телят и циркулирующих в животноводческих хозяйствах, для оптимизации схемы бактериологической диагностики сальмонеллеза и эшерихиоза.

Задачи исследований:

- изучить этиологическую структуру, напряженность эпизоотического процесса, временные и географические границы распространения сальмонеллеза и эшерихиоза при территориальном ранжировании Тамбовской области;

- оценить эффективность диагностических и противоэпизоотических мероприятий для предупреждения распространения возбудителей сальмонеллеза и эшерихиоза телят;

- изучить структурно-функциональные особенности формирования биопленок, популяционную изменчивость, патогенные свойства энтеробактерий, доминирующих в микробиоценозах кишечника при болезнях органов пищеварения телят;

- определить чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам различных классов и профилей антибиотикорезистентности бактерий различных таксономических групп.

Научная новизна. Научно обоснована и экспериментально подтверждена эффективность применения селективной среды, специфичность – 80,6 – 97,4 %, для оценки колонизационной резистентности кишечника телят. Установлены структурно-функциональные особенности гетерогенной структуры популяции и формирования биопленок бактерий, выявлена коррелятивная зависимость ($r=0,89$) показателей оптической плотности биопленок и степени адгезивности бактерий, циркулирующих в животноводческих хозяйствах при массовых болезнях органов пищеварения телят. При территориальном ранжировании Тамбовской области установлена напряженность эпизоотического процесса, характеризующаяся тенденцией возрастания индекса эпизоотичности (1,0), коэффициента очаговости (18,97), летальности (100,0 %); массовая доля сальмонеллеза – 8,1–14,9 %; эшерихиоза – 83,1 – 97,9 %; этиологическая структура: *S.dublin* (9,5 %); *S.typhimurium* (1,7 %); *S.enteritidis* (1,5 %); *E. coli* (52,8 %): O86:A20; O26:A20; O86:F41; O20:K99; O9:A20; O26:F41; O78:K99; O119:A20.

Теоретическая и практическая значимость работы. Апробирован алгоритм определения профилей устойчивости к антибиотикам эпизоотических штаммов с определением корреляции результатов тестов ($r=0,87 – 0,90$), для проведения мониторинга распространения антибиотикорезистентных микроорганизмов; 55,8 – 77,3 % штаммов, циркулирующих среди поголовья животных и объектов репродукторных помещений, были устойчивы к полусинтетическим пенициллинам и цефалоспорином III поколения за счет продукции β -лактамаз расширенного спектра, обуславливающих тенденцию роста множественной лекарственной резистентности. Разработаны «Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации болезней органов пищеварения телят, вызываемых патогенными энтеробактериями», утвержденные УМО РАЕ по классическому университетскому и техническому образованию.

Методология и методы исследования. При апробации методов исследования и анализе результатов репрезентативных выборок животноводческих объектов, соблюдая принципы рандомизации, учитывали

критерии, имеющие эпизоотологическое значение, временные и географические границы распространения инфекционной патологии телят.

Методологические подходы основаны на применении многоуровневых алгоритмов диагностики с использованием комплекса бактериологических, биохимических, иммунохимических тестов, применяемых в виде микроанализа, электронно-микроскопических, морфометрических, и статистических методов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- результаты изучения этиологической структуры, многолетней динамики показателей напряженности эпизоотического процесса, факторов риска, временных и географических границ распространения сальмонеллеза и эшерихиоза, и оценки эффективности диагностических и противоэпизоотических мероприятий, направленных на предупреждение распространения возбудителей инфекционных болезней среди восприимчивых животных, объектов внешней среды репродукторных помещений, пищевого сырья;

- результаты изучения адаптационного потенциала, структурно-функциональных особенностей формирования биопленок и процессов диссоциации однородной популяции энтеробактерий;

- результаты изучения профилей антибиотикорезистентности, продукции β-лактамаз расширенного спектра бактерий различных таксономических групп, циркулирующих в животноводческих хозяйствах среди поголовья животных и объектов репродукторных помещений при болезнях органов пищеварения телят.

Апробация материалов диссертации. Результаты диссертационной работы доложены и одобрены на заседании кафедры «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО МГУПП; Международной научно-практической конференции «Разработка инновационных инструментальных методов исследования внутренних болезней животных» (М., 2015); Международной научной конференции «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК (М., 2016); Международной научно-практической конференции «Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука» (Москва, 2017).

Публикация результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, в т. ч. 3 – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, библиографии, приложений; изложена на 156 страницах компьютерного текста, содержит 16 таблиц, 39 рисунков. Библиографический список включает 207 источников, из них 91 иностранных автора.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена с 2014 по 2017 гг. на кафедре «Ветеринарная медицина» ФГБОУ ВО «МГУПП». В опытах были использованы референтные штаммы микроорганизмов *Salmonella enteritidis* № 204; *Escherichia coli* O78 №320; *Citrobacter freundii* ATCC 43864; *Proteus vulgaris* ATCC 13315; *Klebsiella pneumoniae* № 24; *Yersinia enterocolitica* ATCC 35669; *Lactobacterium acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium longum* BB536; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Mycobacterium B5* № 12.

Диагноз устанавливали на основании бактериологических исследований, с учетом эпизоотологических и клинико-морфологических данных (Сидоров М.А. и соавт., 1995; Каврук Л.С., 2004; Сидорчук А.А., и соавт., 2007; Макаров В.В. и соавт., 2013).

Идентификацию микроорганизмов проводили общепринятыми методами в соответствии с классификационной системой «*Bergey's manual* 1984–1989. Исследовали смывы из носовой (n=30) и ротовой (n=30) полостей, *feces* (n=30) телят породы «Симментальская» 14-суточного постнатального онтогенеза; патматериал (n=12); смывы со стен репродукторных помещений (n=20), поилок (n=20), пробы кормов для животных: силос (n=10); сенаж (n=10); сено (n=10), ЗЦМ сухой (n=10).

Формирование биопленок бактерий изучали, культивируя в 96-ти луночных планшетах, 24 часа при 37 – 38°C. Из лунок удаляли жидкость, трижды промывали фосфатно-солевым раствором (рН 7,2), фиксировали при 60°C в течение 60 минут.

В каждую лунку вносили по 200,0 мкл 0,1% раствора кристаллвиолета и окрашивали в течение 20 минут, трижды промывали буферным раствором, подсушивали и вносили в лунки по 200,0 мкл 95° этилового спирта на 30 минут (Чеботарь И.В., 2013; *Kot B.*, 2011).

Оптическую плотность (D) жидкости в лунках планшета определяли при 490 нм (*Immunochem-2100 Microplate Reader*, НТИ, США).

При изучении факторов вирулентности и признаков бактерий, связанных с плазмидой вирулентности, применяли общепринятые методы. Наличие токсинов определяли, учитывая достоверность разности отека лап белых лабораторных мышей (*oedema*) – «эдематозный тест»; массы тонкого кишечника с содержанием к массе тела – тест «дилатация кишечника»; разность массы легких опытных и контрольных животных – тест «проницаемость сосудов» (Биргер М.О., 1982; Светоч Э.А., 2017; Ленченко Е.М., 2014).

Для выявления бактериофагов исследуемый материал фильтровали через фильтр Зейтца и вносили в пробирки, содержащие 18 – 24 ч культуры микроорганизмов культивировали при 30 – 35°C в течении 24 ч. При наличии бактериофагов выявляли просветление среды. При нанесении капель бактериофагов на чувствительные культуры микроорганизмов, на МПА, оценивали наличие зон лизиса.

Изучение антибиотикорезистентности проводили в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04, профиль антибиотикограмм учитывали с использованием компьютерной программы «*WHONET 5.6*» (WHO, 2017).

Для морфологических исследований применяли оптический микроскоп «*Eclipse 90i*» (Japan); стереоскопический микроскоп «*Nikon SMZ44*» (Japan); настольный сканирующий электронный микроскоп «*TM 3030 plus*» (Holland).

Для статистического анализа результатов экспериментов применяли компьютерные программы «*STATGRAPHICS PLUS*», «*Advanced Grapher*» (Alentum Software).

Выражаем благодарность сотрудникам бактериологического отдела ТОГБУ «Тамбовская областная ветеринарная лаборатория»; животноводческого хозяйства Тамбовской области ФГУП Племзавод «Комсомолец» за оказание консультативной помощи при проведении ретроспективного анализа данных статистической отчетности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Результаты эпизоотологических и клинико-морфологических исследований болезней органов пищеварения телят

Анализ эпизоотической ситуации в животноводческих хозяйствах Тамбовской области свидетельствует, что удельный вес болезней бактериальной этиологии за 2011 – 2016 годы составляет 85,2 – 94,1 %; массовая доля сальмонеллеза – 8,1–14,9 %; эшерихиоз – 83,1 – 97,9 %.

При определении широты распространения по распределению административно-территориальных единиц установили, что удельный вес неблагополучных пунктов составляет 36,97 – 63,27 %, удельный вес больных животных – 61,28 – 75,72 %. Из 23 районов области неблагополучные пункты регистрировались в 15, ежегодно – 8 районах. Наибольшее число больных животных – коэффициент очаговости – 11,01–18,97 регистрировали в Тамбовском, Рассказовском, Петровском районе. Из общего числа 15 неблагополучных пунктов при территориальном ранжировании в 4 пунктах регистрировался сальмонеллез; 11 – эшерихиоз; 3 пунктах – одновременно два указанных заболевания (рис. 1).

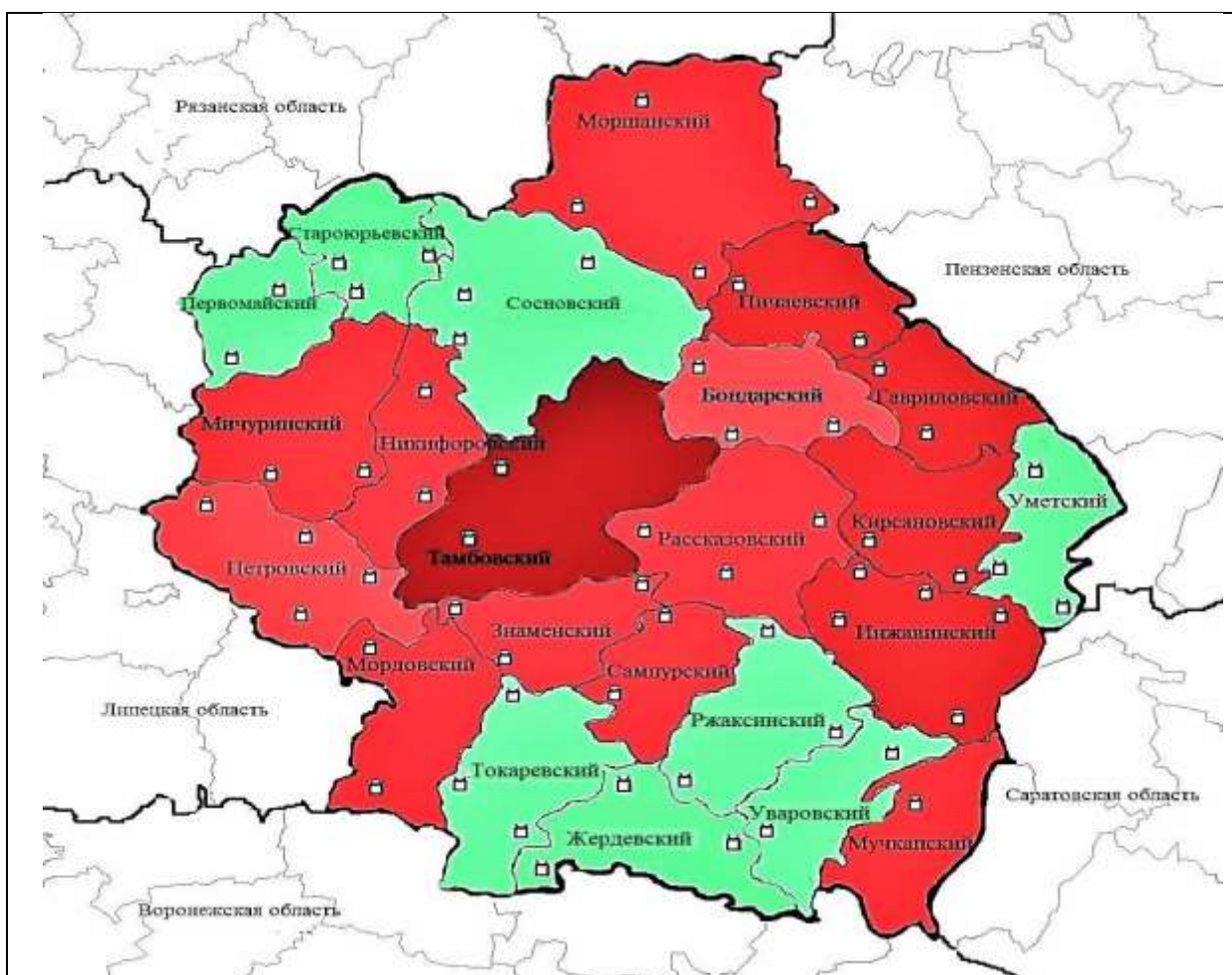


Рис. 1. Эпизоотологическое районирование, коэффициент очаговости:
15,0-20,0 – ■ ; 14,9-10,0 – ■ ; 9,9-5,0 – ■ ; 4,0-0,1 – ■ ;
не регистрируют – ■

Динамика изменения нозологического профиля характеризуется преобладанием доли эшерихиоза: 90,6 % – 2011 год; 93,7 %– 2012; 88,9 % – 2013; 86,3 % – 2014; 83,1–2015 %; 97,9 % – 2016. Формирование сопряженных очагов обусловлено природными и хозяйственно-экономическими факторами специализированных хозяйств, в структуре деятельности которых удельный вес крупного рогатого скота составляет не менее 66,6 – 75,0 %.

Учитывая отношение числа лет, в течение которых на данной территории регистрировались вспышки болезней, к общему числу лет в исследуемом периоде, установили возрастание показателей индекса эпизоотичности: 0,2– 2011 год; 0,3 – 2012; 0,6 – 2013; 0,6– 2014; 0,7– 2015; 1,0 – 2016. При учете интенсивных показателей напряженности эпизоотического процесса выявлено возрастание показателей заболеваемости, смертности, летальности, инцидентности, превалентности (табл. 1).

Таблица 1

Показатели напряженности эпизоотического процесса, %

Показатели	Годы					
	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Заболеваемость	<u>0,19</u> 0,37	<u>0,029</u> 0,41	<u>0,005</u> 0,20	<u>0,45</u> 0,32	<u>0,017</u> 0,37	<u>0,46</u> 0,52
Смертность	<u>0,002</u> 0,04	<u>0,002</u> 0,08	<u>0,13</u> 0,10	<u>0,44</u> 0,07	<u>0,013</u> 0,09	<u>0,35</u> 0,09
Летальность	<u>80,00</u> 89,09	<u>80,00</u> 87,65	<u>87,14</u> 76,12	<u>86,51</u> 88,76	<u>91,11</u> 97,13	<u>100,00</u> 89,98
Инцидентность	<u>0,03</u> 0,02	<u>0,05</u> 0,07	<u>0,21</u> 0,09	<u>0,05</u> 0,06	<u>0,05</u> 0,04	<u>0,30</u> 0,13
Превалентность	<u>0,009</u> 0,014	<u>0,011</u> 0,013	<u>0,017</u> 0,026	<u>0,015</u> 0,031	<u>0,014</u> 0,033	<u>0,013</u> 0,035

Примечание: числитель – сальмонеллез, знаменатель – эшерихиоз

Оценка факторов эпизоотологического риска выявила избыточную заболеваемость, относительный риск – 0,098; степень отношения между воздействием фактора риска и заболеваемостью – непосредственный риск – 0,93. Формирование стационарных очагов, в которых вспышки болезней повторялись через различные промежутки времени, связано с сохранением условий, обеспечивающих циркуляцию эпизоотических штаммов *S.dublin*, *S.typhimurium*, *S.enteritidis*; *E.coli* K99 – 7,75 %; K99:A20–6,44 %; K99:F41–3,80 %; F41:A20 – 2,17 %, продуцирующих адгезивные антигены, токсины, гемолизины, бактериоцины. Популяции риска восприимчивости: сальмонеллез от 10 суток до 2 – 3 месяцев, число заболевших – 21 (35,14 %), эшерихиоз – период новорожденности до 7 суток, 72 (87,29 %), соответственно.

Учитывая время действия факторов риска – отношение числа заболевших животных в каждом месяце к среднемесячному числу больных животных за ряд лет установили, за все сезонов года, преимущественно в период массовых отелов (февраль – май) по май заболело всего 14,14 – 19,87 % животных. При учете расположения неблагополучных пунктов, установили тенденцию возрастания индекса эпизоотичности (1,0), коэффициента очаговости (18,97),

летальности (100,0 %), что свидетельствует об активизации эпизоотического процесса, возможности возникновения новых случаев болезней, угрозе формирования энзоотичной зоны и снижении эффективности диагностических и противоэнзоотических мероприятий. Установлена обратная корреляционная зависимость между плотностью расположения населенных пунктов в неблагополучной местности, загрязнением почвы химическими соединениями и снижением содержания микроэлементов, неустойчивыми погодными условиями с длительными заморозками и заболеваемостью животных (коэффициент ранговой корреляции, $r = 0,88 - 0,91$). Наблюдалась прямая коррелятивная зависимость ($r=0,86$) между распространенностью болезней органов размножения маток – 34,54% и болезнями органов пищеварения и дыхания, составляющими 26,76 % и 64,98 %, соответственно. Удельный вес болезней органов пищеварения составляет 85,2 – 94,1 %, заболеваемость телят до 10-суточного возраста – 60,7 – 71,2 %, при остром течении болезни наблюдается депрессия, сменяющаяся возбуждением, судорогами, парезами и параличами конечностей, слабостью, адинамией, нарушением сердечной деятельности, учащенным и поверхностным дыханием, интоксикацией. Подострое и хроническое течение инфекционного процесса характеризовалось диареей, дегидратацией, истощением, отеками подкожной клетчатки, конъюнктивитами, артритами. В тканях и органах иммунной системы выявляли диссеминированный тромбоз, периваскулярный отек, признаки макрофагальных реакций, застойной гиперемии.

На основании анализа географических и временных границ распространения инфекционной патологии телят установили, что за 2011 – 2016 год удельный вес болезней бактериальной этиологии составляет 85,2 – 94,1 %; массовая доля сальмонеллеза – 8,1–14,9 %; эшерихиоза – 83,1 – 97,9 %.

3.2. Результаты индикации и идентификации бактерий при снижении колонизационной резистентности кишечника телят

Для исследования колонизационной резистентности кишечника клинически здоровых телят (контроль) и при болезнях органов пищеварения (опыт), наряду с общепринятым способом серийных разведений, использовали 0,7 % МПА и тест-пластины «*Petrifilm Aerobic Plate Count*», что позволило сократить расход питательных сред, стерильной бактериологической посуды и времени проведения анализа. Количество микроорганизмов (КОЕ) составило: опыт – $7,49 \pm 0,15 - 11,40 \pm 0,17$; контроль – $2,23 \pm 0,15 - 7,49 \pm 0,15$, доминирующими являлись грамотрицательные бактерии.

Снижение популяционного уровня бактерий наблюдалось на среде «*MRS agar*», так количество КОЕ микроорганизмов, формирующих гладкие белые или бесцветные колонии, $d=1,5 - 3,0$ мм, составило $4,35 \pm 0,07$, опыт. Грамположительные палочки размером $(4,0 - 15,0) \times (0,5 - 0,6)$ мкм, изогнутые и булабовидной формы, неспорообразующие, неподвижные, не образующие каталазу, не разжижающие желатину, ферментирующие глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сорбит с образованием молочной кислоты, не восстанавливающие нитраты в нитриты, не продуцирующие индол и сероводород бактерии были отнесены к роду *Lactobacterium*. На среде «*Blaurock medium*» также наблюдалось снижение количества бактерий: опыт –

разведение 10^{-5} – 10^{-6} ; контроль – 10^{-7} – 10^{-9} . Грамположительные неспорообразующие бактерии, имеющие форму изогнутых палочек с разветвлениями или утолщениями на концах, ферментирующие сахарозу, галактозу, фруктозу, мальтозу, мелибиозу, раффинозу, лактозу с образованием кислоты без газа, не разжижающие желатин, не восстанавливающие нитраты в нитриты, не образующие сероводород, не продуцирующие фенол – род *Bifidobacterium*.

Количество колоний увеличивалось ($5,34 \pm 0,10$, опыт) на среде «Желточно-солевой агар», содержащей 10,0 % натрия хлорида. Грамположительные бактерии формировали выпуклые непрозрачные колонии белого, золотистого, оранжевого, желтого цвета, $d=2,0$ – 2,5 мм. При наличии плазмокоагуляции сыворотки крови, содержащей 1,0 – 4,0 % цитрата натрия с образованием на предметном стекле сгустка, бактерии, растущие в присутствии 15,0 % хлорида натрия или 40,0% желчи, ферментирующие глюкозу, маннит в анаэробных условиях, продуцирующие аммиак, свертывающие и пептонизирующие молоко, не ферментирующие дульцит, салицин, инулин, относили к роду *Staphylococcus*.

Количество КОЕ спорообразующих бактерий также увеличивалось – $5,34 \pm 0,10$ (опыт). Грамположительные бактерии были представлены палочками, при окраске метиленовым синим обнаруживали споры эллипсоидной формы. Бактерии, разжижающие желатин, продуцирующие амилазу, ацетилметилкарбинол, ферментирующие глюкозу, мальтозу, сахарозу, глицерин, лактозу, галактозу, инулин, дульцит, декстрин, редуцировали нитраты в нитриты, отнесены к роду *Bacillus*.

Выявлено доминирование грамотрицательных факультативно-анаэробных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: опыт – $7,55 \pm 0,14$; контроль – $2,23 \pm 0,15$ – $4,45 \pm 0,11$; индекс колонизации – 0,841 %. Каталазаположительные, оксидазаотрицательные, ферментирующие D-глюкозу и многоатомные спирты с образованием кислоты и газа. Подвижные штаммы сальмонелл при 42°C мигрировали в полужидкой среде «MSRV agar», содержащей хлорид магния, малахитовый зеленый, новобиоцин, образуя светлую зону роста, при пересеве на среду «XLD-agar» формировали черные колонии, окруженные слегка прозрачной зоной красноватого цвета, что обусловлено продукцией сероводорода при ферментации лизина. Эшерихии и колиформные бактерии дифференцировали на среде «Chromocult coliform agar» за счет наличия в составе среды хромогенных субстратов «Salmon-GAL», «X-glucuronide». Иерсинии формировали колонии розового цвета с четко очерченным центром и прозрачными краями вследствие изменения цвета индикатора за счет образованием кислоты при ферментации маннита (рис. 2).

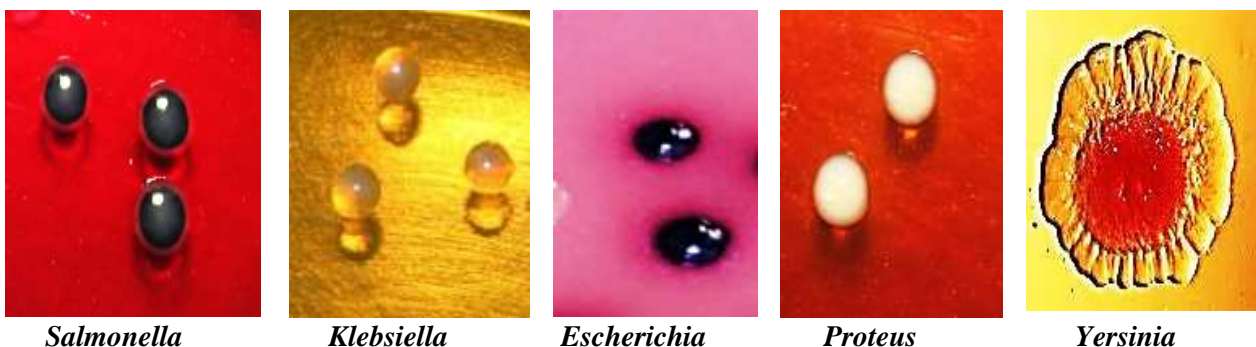


Рис. 2. Дифференциально-диагностические признаки бактерий

Из 97 идентифицированных штаммов 17 изолятов выделено из патматериала телят (сердце, легкие, печень, желчный пузырь, тонкий отдел кишечника, мезентериальные лимфатические узлы); 26 – *feces*; 8 – кормов; 9 – смывов с объектов репродукторных помещений. Бактерии *S.dublin* составили 9,5 %; *S.typhimurium* (1,7 %); *S.enteritidis* (1,5%); *E. coli* (52,8 %); *K.pneumoniae* (11,7 %); *K.oxytoca* (10,8%); *P.vulgaris* (8,4 %); *E.aerogenes* (2,0 %); *Y. enterocolitica* (1,6 %).

Серогрупповую принадлежность эшерихий определяли в реакции агглютинации с групповыми поливалентными сыворотками и моновалентной сывороткой O157. Для разрушения поверхностных термолабильных L- и В-антигенов микроорганизмы прогревали при 100 °С в течение 1 ч, термостабильного А-антигена – при 120 °С 2 ч. Диагностические сыворотки разводили в двух рядах пробирок (1 ряд – О, 2 – К). Для определения О-антигена в каждую пробирку первого ряда вносили по 2 капли инактивированной кипячением суспензии в концентрации 2×10^9 кл./мл. Для выявления К-антигена в каждую пробирку второго ряда вносили по 2 капли живых культур микроорганизмов, выдерживали при 37 °С 18 – 20 ч. При наличии агглютинации с одной из поливалентных сывороток проводили реакцию агглютинации на стекле с каждой типовой моновалентной сывороткой в разведениях 1:5 – 1:10, затем в пробирочной реакции агглютинации в разведениях 1:25, 1:50, 1:100 и так далее.

Из 28 (46,87 %) идентифицированных изолятов 3 (6,7 %) положительно реагировали с поливалентной сывороткой «группы №1» – серогруппа O78; 17 (46,6 %) – «группы №2» – серогруппы O9, O20, O26, O119, 14 – «группы №3» (35,5 %). Адгезивные антигены продуцировали 7 (15,7 %), в том числе O86:A20 (6,73%); O26:A20 (4,81 %); O86:F41 (4,81 %); O20:K99 (2,88 %); O9:A20 (0,96 %); O26:F41 (0,96 %); O78:K99 (0,96 %); O119:A20 (0,96 %).

Всего было идентифицировано 97 культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *S.dublin* (9,5 %); *S.typhimurium* (1,7 %); *S.enteritidis* (1,5 %); *E.coli* (52,8 %): O86:A20; O26:A20; O86:F41; O20:K99; O9:A20; O26:F41; O78:K99; O119:A20; *K.oxytoca* (10,8%); *K. pneumoniae* (11,7 %); *P.vulgaris* (8,4 %); *E.aerogenes* (3,6 %); *Y.enterocolitica* (1,6 %).

3.3. Исследование формирования биопленок бактерий при болезнях органов пищеварения телят

Исследование структурно-функциональных особенностей формирования биопленок энтеробактерий, циркулирующих в животноводческих хозяйствах при массовых болезнях органов пищеварения телят, и референтных штаммов выявило общие закономерности. При формировании биопленок наблюдались этапы: седиментация (оседание); фиксация (первичное прикрепление); формирование монослоя, межклеточных связей – коагрегация, рост микроколоний; формирование кластеров и архитектоники биопленки; дисперсия. На первом этапе исследований через 6 – 8 ч выявляли седиментацию

(оседание) – адгезия вегетативных форм бактерий, имеющих типичную для вида палочковидную форму и размеры (0,3–0,6×0,6–1,0). Как правило, через 10 – 12 ч выявлялась фиксация бактерий – первичное, так называемое обратимое прикрепление клеток к субстрату, наблюдалась упорядоченность расположения клеток в виде отдельных ветвистых структур, состоящих из 4 – 5 бактериальных клеток, объединенных матриксом в цепочки, выявляли формирование тонких покровов, под которыми хорошо дифференцировались бактериальные клетки. Выявляли образование не только коротких цепочек, но и длинных нитей. Формирование монослоя бактерий выявлялось в виде диффузного слоя через 24 – 36 ч, наблюдали уплотненные участки биопленки, в которой отмечено большое скопление клеток как палочковидной, так и округлой формы. В отдельных участках за счет межклеточных связей (коагрегация) формировались микроколонии, представленные замкнутыми структурами различной величины, состоящими из плотно упакованных и объединенных межклеточным матриксом клеток. За счет образования связей между клетками отмечалась иммобилизация популяции.

Часть клеток через 48–72 ч формировали вторичные микроколонии, связанные с первичными, и разделённые матричными пустотами. Синтез внеклеточного матрикса (сложные подвижные структуры в виде геля), объединяющего клетки микроколоний, обеспечивает формирование архитектоники биопленки, экзоцеллюлярные вещества выявлялись на поверхности бактерий в виде полимерных сетей, обеспечивающих механическую стабильность биоплёнок. В центральной части микроколоний биопленки более развиты, чем на периферии; между бактериальными клетками выявлялись анастомозы, длинные тонкие нитевидные структуры, на поверхности или внутри которых обнаружены клетки (0,25 – 0,30 мкм) шаровидной формы, участвующие в формировании микроколоний. При реализации межклеточных коммуникаций наблюдали слияние микроколоний и образование кластеров, по линиям формирования которых выявлялись округлые каналы, содержащие жидкость. Через 72 – 96 ч отмечали дисперсию микроколоний, что сопровождалось разрушением межклеточного матрикса и отделением клеток, способных прикрепляться к поверхности и образовывать новые колонии (рис. 3).

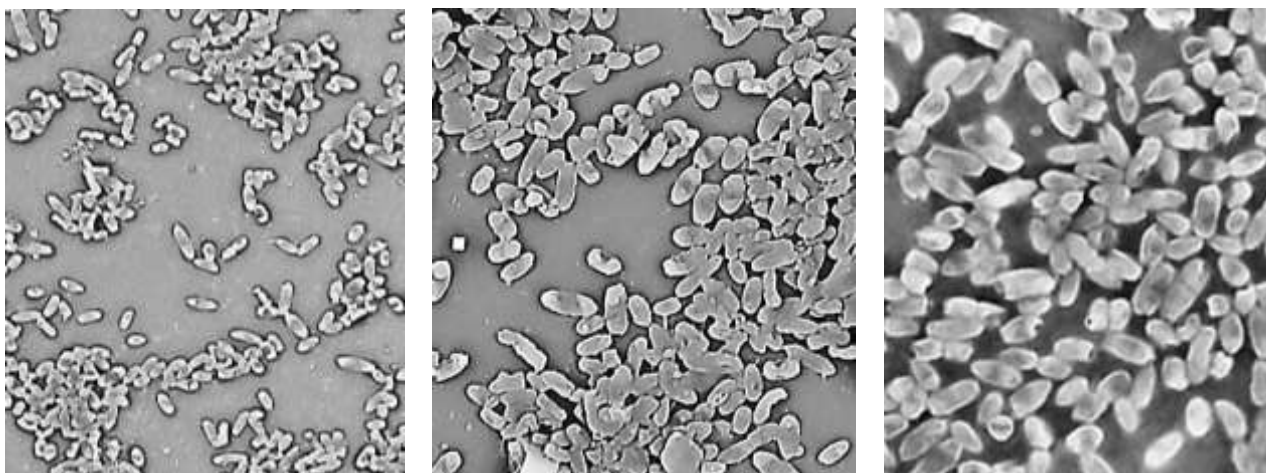


Рис. 3. Формирование биопленок бактерий; СЭМ, х 3000, 5000

Диссоциация однородной популяции при изменении формы и снижении метаболизма бактериальной клетки вызывает переход популяции в «некультивируемое состояние». Выявлялись деструктурированные, частично или полностью автолизированные клетки, утрачивающие морфологическую и физиологическую целостность. Наблюдалось образование кокковидных форм, покрытых слоем биопленок, увеличением светопреломления и снижением оптической плотности. Выявлялись многослойные мембраны, везикулы, клетки с дефектной клеточной стенкой, сферопласты, протопласты, L-формы, игольчатые и гигантские структуры, клетки-ревертанты. Учитывая абсолютные величины оптической плотности (*Density*, *D*) бактерии разделили на 2 группы: слабые продуценты биопленок – оптическая плотность образца (D_s) превышает оптическую плотность контроля (D_c) менее чем в 2 раза ($D \leq 0,197$); умеренные продуценты биопленок – оптическая плотность образца превышает оптическую плотность контроля в 2 – 4 раза ($D=0,279–0,571$) (табл. 2).

Таблица 2

Результаты изучения оптической плотности биопленок бактерий

Бактерии	Оптическая плотность				Адгезивные свойства	
	D_s			D_c	СПА	t_d
	1	2	3			
<i>S. enteritidis</i>	0,449	0,474	0,488	0,99	4,5±0,34	4,6
<i>E. coli</i>	0,542	0,571	0,550	0,101	3,9±0,11	4,2
<i>K. pneumoniae</i>	0,514	0,493	0,502	0,101	3,6±0,41	4,4
<i>P. vulgaris</i>	0,279	0,287	0,282	0,100	3,1±0,02	4,2
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0,350	0,311	0,297	0,98	4,4±0,27	4,1
<i>Y. enterocolitica</i> S-форма	0,315	0,344	0,329	0,102	4,9±0,32	4,8
R-форма	0,196	0,184	0,197	0,100	2,4±0,14	4,5

Примечание: D_c – D контроль; D_s – D исследуемый образец; t_d – коэффициент достоверности

При взаимодействии с клетками крови микроорганизмы были отнесены к высокоадгезивным: СПА – 3,7±0,15 – 3,9±0,14, низкоадгезивным – 2,6±0,75. Установлена коррелятивная зависимость ($r=0,89$) показателей оптической плотности ($D \leq 0,514$) и СПА – 4,49±0,24 – 4,8±0,35; $D \leq 0,197$ и СПА – 1,37±0,16 – 2,5±0,14, соответственно. При воздействии цефтаролина (30,0 мкг/мл) наблюдалось статистически значимое снижение КОЕ жизнеспособных клеток, формирующих колонии при посеве на плотные питательные среды: 67,07±0,11 – 94,5±0,51 (контроль) 13,2±0,25 – 16,8±0,19 (опыт). Изученные микроорганизмы формировали 4 типа колоний: S-формы, $d=2,0 – 5,0$ мм; R-формы, $d \geq 3,0$ мм; M-формы, $d=1,5 – 3,0$ мм; d-формы (*Dwarf* – карликовые), $d=0,2 – 0,5$ мм. Диссоциированные колонии иерсиний составляли 87,9 %, других энтеробактерий – 1,6 %.

Для избирательного выделения и дифференциации S-, R-форм колоний разработана питательная среда, содержащая гидролизат панкреатический, маннит, L-аспарагин и глицерин. При 22 – 28 °C через 18 – 48 ч наблюдалось формирование прозрачных округлых колоний с ровными краями (КОЕ 57,8±1,7 – 63,5±1,3); количество шероховатых колоний (КОЕ 2,33±0,7 – 4,07±0,9) составляло 1,2 – 2,6 %, специфичность среды 80,4 – 97,4 %.

3.4. Результаты изучения патогенности и признаков, связанных с плазмидами вирулентности энтеробактерий

При идентификации бактерий, не типизируемых по O-антигену, установили, что 84,9 % изолятов были патогенными. Штаммы *S.typhimurium*, *E.coli* O138:K81, *K.pneumoniae*, *P.vulgaris*, *Y.enterocolitica* S-форма продуцировали термостабильные токсины (61,3 %), показатели коэффициента средних величин отек лап мышей ($K \geq 40,0$) колебались в пределах от $40,12 \pm 2,90$ до $69,17 \pm 5,42$. Штаммы *E. coli*, *P.vulgaris* продуцировали термолабильные токсины (23,5 %), *E.coli* – цитотоксины (54,8 %), средние показатели коэффициента расширения кишечника ($K \geq 0,090$) – от $0,106 \pm 0,003$ до $0,123 \pm 0,005$, коэффициент проницаемости кровеносных сосудов ($K \geq 1,07$) – $1,07 \pm 0,12$ – $1,29 \pm 0,17$. При внесении суспензии патматериала телят в лунки микропланшета тест-системы «VET-RPLA», основанной на реакции обратной пассивной латекс-агглютинации, выявляли агрегаты латексных частиц, что позволяло проводить индикацию токсинов с чувствительностью 100 мг в течение 15-20 мин. Из числа изученных микроорганизмов 12,8 % продуцировали и термостабильные и термолабильные токсины.

Бактерии *E.coli* (61,6 %) продуцировали α - β -гемолизины; *K.pneumoniae* (73,4 %) α -гемолизины; *P.vulgaris* (58,9%) – β -гемолизины. Тиолзависимые гемолизины продуцировали бактерии *E.coli* (45,5%), *C.freundii* (52,0 %). Выявлена коррелятивная зависимость токсигенных свойств и D-маннозорезистентной активности: при добавлении к взвеси эритроцитов суспензии бактерий и 1,5 % D-маннозы отмечали агрегацию эритроцитов.

При воздействии бактериоцинов рост тест-штаммов ($d = 1,0 - 3,0$ мм) выявляли через 8 – 10 ч, показатели оптической плотности $D = 0,109 - 0,134$ (опыт); $D = 0,507 - 0,744$ (контроль); зоны задержки роста бактерий $d = 4,0 - 11,0$ мм. При 37°C через 18 ч эшерихии ингибировали рост бактерий в разведениях $10^{-1} - 10^{-3}$ ($r = 0,7$). При апробации способа «наслоения» эшерихии ингибировали рост указанных выше энтеробактерий, зоны задержки роста – 6,7 – 10,1 мм. Энтеробактерии не вызывали зоны задержки роста псевдомонад, стафилококков, микобактерий.

Наличие бактериофагов сальмонелл сопровождалось просветлением жидких питательных сред; на плотных питательных средах отмечали прозрачные зоны лизиса ($d = 1,7 - 3,3$ мм) с прозрачным центром, ореолом частичного просветления и ровными краями, количество негативных колоний составило $7,1 \times 10^7 - 1,2 \times 10^8$. Лизис исследуемых культур микроорганизмов наблюдался в разведениях $10^{-6} - 10^{-5}$.

Аутоагглютинация – признак иерсиний, при 37 °C отмечали образование рыхлого хлопьевидного осадка, при 22 – 28 °C – небольшой компактный осадок. При нанесении пиразинкарбоксиамида, 1,0%-ного водного раствора железистого сульфата аммония цвет колоний не изменялся. При 37°C на кальцийдефицитной среды колонии были в 1,5 – 3,0 раза мельче колоний, выросших при 22 °C ($t_d > 4,6$; $p = 0,01$).

3.5. Результаты изучения чувствительности к антибактериальным препаратам энтеробактерий

Антибиотикограммы эпизоотических штаммов с антибиотиками: «амоксциллин+ клавуланат», «цефтазидим + клавуланат», «цефподоксим + клавуланат» свидетельствовали о продукции β -лактамаз расширенного спектра штаммами, резистентными к одному из цефалоспоринов III поколения.

Смещение зон задержки роста ($d=14,7 - 19,9$ мм) в сторону дисков, содержащих амоксициллин/клавуланат за счет подавления роста в зоне одновременной диффузии препаратов. В участке пересечения зоны подавления роста и тест-полоски «Е-тест» установлены значения минимальной ингибирующей концентрации, «МИК» – 32,0–64,0 мг/мл. Бактерии *S. enteritidis* (67,2 %), *E. coli* (78,0 %), *K. pneumoniae* (73,3 %) устойчивы к цефазолину, цефотаксиму, ампициллину, оксациллину, карбенциллину; *C. freundii* (55,8 %) – цефазолину, цефотаксиму, ампициллину, *Y. enterocolitica* (60,1 %) – цефазолину, цефотаксиму, карбенциллину, *C. freundii* (61,8 %) – оксациллину, карбенциллину, ампициллину, $r=0,87 - 0,90$.

Сравнение результатов исследований позволяло вычислить коэффициент корреляции результатов тестов (r), анализируя профили антибиотикорезистентности бактерий различных таксономических групп с учетом диаграммы соотношения диаметров зон задержки роста, $12,50 \pm 0,6 - 27,10 \pm 1,2$ мм, дифференцировали резистентные, $d \leq 15,0$; умеренно чувствительные, $d = 16,0 - 20,0$; чувствительные, $d \geq 21,0$ штаммы.

Заключение

При территориальном ранжировании Тамбовской области, учитывая критерии, имеющие эпизоотологическое значение, установлено: напряженность эпизоотического процесса характеризуется тенденцией возрастания индекса эпизоотичности (1,0), коэффициента очаговости (18,97), летальности (100,0 %); недостаточная эффективность диагностических и противоэпизоотических мероприятий обуславливает наличие сопряженных очагов и угрозы формирования энзоотичной зоны; на основе выявления структурно-функциональных особенностей формирования биопленок гетерогенной популяции бактерий, апробации многоуровневых алгоритмов индикации, в том числе биохимических, иммунохимических тестов, применяемых в виде микроанализа, оптимизирована схема бактериологической диагностики (специфичность идентификации 80,4 – 97,4 %); при снижении колонизационной резистентности кишечника телят установлена этиологическая значимость факторов вирулентности эпизоотических штаммов, продуцирующих адгезивные антигены, бактериоцины, гемолизины, термолабильные, термостабильные токсины, β -лактамазы расширенного спектра, обуславливающие тенденцию роста множественной лекарственной устойчивости к цефалоспорином III поколения (цефотаксим, цефтазидим, цефподоксим).

ВЫВОДЫ

1. При инфекционной патологии телят удельный вес болезней бактериальной этиологии составляет 85,2 – 94,1 %; массовая доля сальмонеллеза – 8,1–14,9 %; эшерихиоза – 83,1 – 97,9 %.
2. При снижении колонизационной резистентности кишечника наблюдалось доминирование бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: опыт – 7,55±0,14; контроль – 2,23±0,15 – 4,45±0,11; индекс колонизации – 0,841 %.
3. На основе апробации и подборе эффективных дифференциально-диагностических сред и тест-систем идентифицировано 97 культур микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *S.dublin* (9,5 %); *S.typhimurium* (1,7 %); *S.enteritidis* (1,5 %); *E. coli* (52,8 %): O86:A20; O26:A20; O86:F41; O20:K99; O9:A20; O26:F41; O78:K99; O119:A20; *K.oxytoca* (10,8%); *K.pneumonia* (11,7 %); *P.vulgaris* (8,4 %); *E.aerogenes* (3,6 %); *Y.enterocolitica* (1,6 %).
4. При формировании биопленок энтеробактерий при оптической и сканирующей электронной микроскопии выявлены этапы: седиментация; фиксация; формирование монослоя, межклеточных связей – коагрегация, рост микроколоний; формирование кластеров и архитектоники биопленки; дисперсия.
5. Установлена коррелятивная зависимость ($r=0,89$) степени формирования биопленок и показателей адгезии бактерий: оптическая плотность – $D \leq 0,514$ и СПА – 4,49±0,24–4,8±0,35; $D \leq 0,197$ и СПА – 1,37±0,16 – 2,5±0,14, соответственно.
6. Для видовой идентификации и дифференциации S-форм бактерий установлена эффективность питательной среды, содержащей гидролизат панкреатический, маннит, в качестве репарирующих веществ L-аспарагин и глицерин, специфичность – 80,4 – 97,4 %.
7. Эпизоотические штаммы продуцировали адгезивные антигены – 15,7%, термостабильные токсины – 61,3 %, термолабильные токсины – 23,5 %, одновременно термостабильные и термолабильные токсины – 12,8 %, цитотоксины – 54,8 %; α -, β -гемолизины – 58,9% – 73,7 %, тиолзависимые гемолизины (45,5 – 52,0 %) бактериоцины (87,4 %); чувствительны к литическому действию бактериофагов (76,2 %), количество негативных колоний – $7,1 \times 10^7$ – $1,2 \times 10^8$; характеризовались аутоагглютинацией, кальций- и температурозависимым ростом, не продуцировали пиразинамидазу.
8. Бактерии *S.enteritidis* (67,2 %), *E.coli* (78,0 %), *K.pneumoniae* (73,3 %) устойчивы к цефазолину, цефотаксиму, ампициллину, оксациллину, карбенциллину; *C.freundii* (55,8 %) – цефазолину, цефотаксиму, ампициллину, *Y.enterocolitica* (60,1 %) – цефазолину, цефотаксиму, карбенциллину, *C. freundii* (61,8 %) – оксациллину, карбенциллину, ампициллину.
9. Профили антибиотикограмм штаммов распределяли по категориям: резистентные, $d \leq 15,0$; умеренно чувствительные, $d = 16,0$ – $20,0$; чувствительные, $d \geq 21,0$, корреляция результатов исследований, $r = 0,87$ – $0,90$.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

- Для видовой идентификации и дифференциации S-форм бактерий рекомендуется использование питательной среды, содержащей гидролизат панкреатический, маннит, в качестве репарирующих веществ L-аспарагин и глицерин, специфичность – 80,4 – 97,4 % %;
- Для проведения мониторинга распространения микроорганизмов, устойчивых к антибактериальным препаратам различных групп, и определения профилей антибиотикорезистентности эпизоотических штаммов, циркулирующих среди поголовья животных и объектов репродукторных помещений, рекомендуется проводить статистическую обработку результатов с применением программы «Whonet 5.6»;
- Разработаны «Рекомендации по диагностике, профилактике и ликвидации болезней органов пищеварения телят, вызываемых патогенными энтеробактериями», утвержденные УМО РАЕ по классическому университетскому и техническому образованию.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Антонова А.Н. Изучение видового состава и чувствительности к антибиотикам бактерий, выделенных при дисбактериозах кишечника молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Антонова Е.М. Ленченко // Разработка инновационных инструментальных методов исследования внутренних болезней животных. – М.: ИК МГУПП. – 2015. – С. 19-23.
2. Антонова А.Н. Оценка эффективности иммунобиологических тест-систем для индикации эпизоотических штаммов энтеробактерий /А.Н. Антонова, И.И. Тарасова, Е.М. Ленченко // Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. –2016. – С.132-136.
3. Антонова А.Н. Чувствительность к антибактериальным препаратам микроорганизмов, выделенных из сырья и продуктов животного происхождения /А.Н. Антонова // Развитие пищевой и перерабатывающей промышленности России: кадры и наука. – М.: МГУПП. – 2017. – С.148-150.
4. Ленченко Е.М. Количественный и видовой состав бактерий, выделенных из сырья и продуктов животного происхождения / Е.М. Ленченко, А.Н. Антонова // Аграрная наука. – 2015. – № 12. – С. 24-27.
5. Ленченко Е.М. Сравнительная оценка эффективности способов оценки антибиотикорезистентности микроорганизмов/ Е.М. Ленченко, А.Н. Антонова // Ветеринария и кормление. – 2015. – № 6. – С. 34-38.
6. Ленченко Е.М. Индикация факторов вирулентности энтеробактерий /Е.М. Ленченко, А.Н. Антонова // Ветеринария. – 2015. – № 10. – С. 26-30.

Антонова Алина Николаевна (Россия)

Этиологическая структура сальмонеллеза и эшерихиоза телят

В работе представлены результаты изучения нозологического профиля инфекционных болезней бактериальной этиологии телят при территориальном ранжировании Тамбовской области. Циркулирующие среди поголовья телят и репродукторных помещениях эпизоотические штаммы формировали биопленки, продуцировали адгезивные антигены, термостабильные токсины термолабильные токсины, α -, β -, тиолзависимые гемолизины, бактериоцины, чувствительны к литическому действию бактериофагов, характеризовались аутоагглютинацией, кальций- и температурозависимым ростом, не продуцировали пиразинамидазу, резистентны к цефалоспорином III поколения.

Antonova Alina Nikolaevna (Russia)

Etiological structure of calves Salmonellosis and Echerishiosis

The work presents the results of a study of nosological profile of infectious diseases of bacterial etiology of calves in the territorial ranking of the Tambov region. Epizootic strains circulating among the livestock of calves and multiplication areas had formed biofilms, produced adhesive antigens, the heat-stable toxins heat-labile toxins, α -, β -, thiol-dependent hemolysines, bacteriocines, sensitive to the lytic action of bacteriophages, characterized by autoagglutination, calcium- and heat-dependent growth, has not produced pyrazinamidase, resistant to cephalosporins of the III generation.