

А. М. ГОЛОВКО, доктор вет. наук, професор, академік НААН,

А. В. УШКАЛОВ, аспірант¹,

Л. М. ВИГОВСЬКА, кандидат ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів
мікроорганізмів

ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТА ЧУТЛИВОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *YERSINIA*.

В статті наведено результати вивчення біологічних властивостей та чутливості до антибіотиків різних фармакологічних груп бактерій роду *Yersinia enterocolitica* з колекції НЦШМ ДНКІБШМ, виділеного в Україні та з амереканької колекції штамів *Microbiologica*. Визначено в порівняльному аспекті культурально-морфологічні, біохімічні властивості, чутливість до антибіотиків досліджених культур.

Ключові слова: штами *Yersinia*, біологічні властивості, антибіотико-резистентність.

В останні роки підвищену увагу дослідників привертають мікроорганізми роду *Yersinia*, які зумовлюють виникнення хвороб у сільськогосподарських тварин та токсикоінфекції у людей. Їєрсиніоз — гостре інфекційне захворювання, ріст захворюваності на ієрсиніоз пов'язують зі зміною екологічної ситуації та появою крупних тваринницьких господарств, виробничих комплексів, холодильників і овочесховищ [1,2,3,4].

Збудник кишкового ієрсиніозу належить до родини *Enterobacteriaceae*, роду *Yersinia*, вид — *Yersinia enterocolitica*. До роду *Yersinia* також належать збудники чуми антропонозної (*Yersinia pestis*, який також є збудником чуми верблюдів) і псевдотуберкульозу (*Yersinia pseudotuberculosis*).

Ієрсиніози посідають проміжне місце між сапронозами та зоонозами. Здатність розмножуватися по-за межами організму теплокровних означає, що збудник ієрсиніозу належить до факультативних паразитів. В умовах холодильника в молоці, м'ясі і на овочах ієрсинії не тільки нагромаджуються, а й збільшують свою вірулентність. Основним резервуаром збудника є ґрунт, вода і рослини, від яких заражуються ссавці і птахи, що своєю чергою контамінують навколишні субстрати, у тому числі й продовольчу сировину, а також готову продукцію. Дикі гризуни сприяють інфікуванню популяції синантропних гризунів тваринницьких ферм і населених пунктів [7,8].

Враховуючи високу потенційну небезпеку бактерій роду *Yersinia* для людини через контамінацію харчових продуктів тваринного і рослинного походження, актуальність проблеми вдосконалення системи контролю ієрсиній не знижується. В зв'язку з цим у ДНКІБШМ розпочато формування колекції стандартних штамів мікроорганізмів роду *Yersinia*.

¹Науковий керівник - доктор вет. наук, професор, академік НААН А. М. Головка.

Мета роботи: провести вивчення та порівняння біологічних властивостей штамів *Yersinia enterocolitica*, виділених в Україні та отриманих з американської колекції штамів “Microbiologos”.

Матеріали і методи. Об’єктом досліджень були штами *Yersinia enterocolitica*, виділені в Україні при проведенні бактеріологічних досліджень та штами, отримані з колекції “Microbiologos”.

Таблиця 1

Перелік штамів *Yersinia enterocolitica* підданих дослідженням

Назва штаму	Позначення штаму	З якої колекції
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/15-09	НЦІМ ДНКБІМ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9610	Microbiologics (USA)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	33639	Microbiologics (USA)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	27729	Microbiologics (USA)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	23715	Microbiologics (USA)

Біологічні властивості штамів вивчалися за наступними показниками: морфологічні властивості, типовість росту, біохімічні властивості, чутливість до антибіотиків. Морфологічні властивості визначали шляхом мікроскопії мазків профарбованих за методом Грама, визначення рухливості, визначення росту при $T=22^{\circ}\text{C}$. Типовість росту визначали шляхом висіву культур *Yersinia enterocolitica* на рідкі та тверді поживні середовища. Біохімічні властивості визначали висівом на середовища Гісса. Визначення антибіотикограми проводили стандартним дискодифузальним методом. Антибіотикорезистентність штамів визначали до 54 антибіотиків різних фармакологічних груп: до інгібіторів синтезу клітинної стінки (пеніциліни, цефалоспорини), інгібіторів синтезу білка (аміноглікозиди, тетрацикліни, левоміцетин, макроліди, лінкозаміди), інгібіторів транскрипції і синтезу нуклеїнових кислот (фторхінолони, рифампіцин), нітрофуранів, азолів, які діють на цитоплазматичну мембрану бактеріальної клітини. Всі лабораторні дослідження проводили в чотирьох повторях.

Результати та обговорення. Для визначення морфологічних властивостей у культур (культури висіяні на МПБ та МПА) зробили пересіви на середовище Ендо та МПА (на чашках Петрі).

Культивування проводили в двох режимах – за 22°C та 37°C впродовж 24 годин. На агарі Ендо через 24 години культивування формуються дрібні колонії з випуклим центром з рівними краями, блідо-рожеві, культури вегетують за 22°C . При культивуванні за температури 22°C культури утворювали колонії S-формі, за 37°C - R-форми.

З ізольованих колоній готували мазки та фарбували за Грамом. У мазках спостерігали: 1) у випадках культивування за 37°C - невеликі Грам-негативні кокоподібні однорідні палички розміром $0,8-1,0 \times 0,5-0,6$ мкм; 2) у випадках культивування за 22°C – спостерігали наявність Грам-негативних паличок розміром $0,9-1,1 \times 0,6-0,7$ мкм. У мазках із старих культур спостерігається поліморфізм популяції.

У деяких випадках профарбовується не все тіло бактеріальної клітини, а лише її полюси (біполярність). З метою визначення біохімічних властивостей проводили висіви на середовища Гіса з цурками. Для цього відбирали бактеріологічною петлею із ізольованої колонії матеріал і проводили висіви у

напіврідкі середовища Гісса. Висіви культивували в мікроаерофільних умовах впродовж 24-48 годин за 37°C. Результати досліджень наведено у таблиці 2.

Таблиця 2.

**Результати визначення ферментативних властивостей штамів
*Yersinia enterocolitica***

Досліджувані штами	Показники ферментативної активності										
	Дульцит	Сахароза	Інозит	Мальтоза	Рамноза	Арабіноза	Сорбіт	Лактоза	Глюкоза	Ксилоза	Маніт
<i>Y. enterocolitica</i> 23715	-	++++ Г	+	-	-	-	++++	+	++++	-	++++
<i>Y. enterocolitica</i> 27729	-	++++ Г	+	-	-	-	++++	-	++++	-	++++
<i>Y. enterocolitica</i> 33639	-	+	+	-	-	-	+	-	++++	-	+++
<i>Y. enterocolitica</i> 9610	-	++++ Г	-	-	-	-	+++	-	++++	-	++++
<i>Y. enterocolitica</i> 22/15 - 09	-	++++ Г	+++	-	-	-	++++	++	++++	-	++++

Примітки: Рівень ферментативної активності штаму: + - відповідає розщепленню 25%, ++ - 50%, +++ - 75%, +++++ - 100% середовища Гіса після 24 годин культивування штаму; +- розщепленню 25% середовища на 48 годину культивування, Г- утворення газу.

Усі досліджені культури ферментували сорбіт, глюкозу, маніт. Не ферментували дульцит, рамнозу, арабінозу, лактозу, ксилозу. Штам *Y. enterocolitica* 33639 проявив активність при утилізації сахарози на 25% (один «+»), а *Y. enterocolitica* 23715, 33639 та 27729 слабо ферментували інозит (25%). Культури *Y. enterocolitica* 9610 слабо ферментувала інозит (25%), 22/15 – 09 на 75%. Не один з штамів повністю не ферментували мальтозу. Сорбіт утилізував штам 33639 на 25%. Штами 23715 та 22/15 – 09 ферментували лактозу на 25% та 50% відповідно.

Подальшим етапом наших досліджень було вивчення спектру антибіотикорезистентності досліджених штамів. У результаті аналізу проведених досліджень (рис. 1-5) встановлено наступне:

По відношенню до антибіотиків пеніцилінового ряду було встановлено, що штам *Y. enterocolitica* 9610 проявляв вибіркочутливість (діаметри інгібіції росту культури навколо дисків з антибіотиками бензилпеніциліном, піперациліном, ампіциліном становили 0 – 30 – 12 мм відповідно) У зоні затримки росту спостерігався поодинокий ріст резистентних колоній. Штам *Y. enterocolitica* 22/15 – 09 виявився чутливим до піперациліну (26 мм) та не чутливим до бензилпеніциліну, ампіциліну (0 мм). Штам *Y. enterocolitica* 33639 проявив чутливість тільки до піперациліну (28 мм) та ампіциліну (18 мм.). Штам *Y. enterocolitica* 27729 виявився не чутливим до бензилпеніциліну (0 мм) та чутливим до піперациліну, ампіциліну (30-13 мм).

По відношенню до цефалоспоринів штамп *Y. enterocolitica* 9610 виявився високочутливим до всіх досліджуваних антибіотиків даної групи. Штамп *Y. enterocolitica* 22/15 – 09 проявив чутливість теж до всіх антибактеріальних засобів групи, окрім цефазоліна (0 мм). Штамп *Y. enterocolitica* 33639 виявилися високочутливими та чутливими до антибіотиків зазначеної групи. Штамп *Y. enterocolitica* 27729 також виявився чутливим до цих антибіотиків, але треба звернути увагу на те, що у зоні затримки росту антибіотиків цефтазідим, цефтриаксон та цефотаксим спостерігався **чисельний ріст резистентних колоній**. Штамп *Y. enterocolitica* 23715 виявився чутливим до цефазоліну, цефалексину цефаклору (21-20-26 мм) та до інших антибіотиків даної групи.

По відношенню до аміноглікозидів штамм *Y. enterocolitica* 9610 був високочутливий до нетілміцину, гентаміцину (30 мм), чутливий до канаміцину (20 мм.), та не чутливий до стрептоміцину (0 мм). Штамп *Y. enterocolitica* 22/15–09 проявив чутливість до гентаміцину та нетилміцину (21-17мм.), не чутливий до канаміцину та стептоміцину. Штамп *Y. enterocolitica* 33639 проявив чутливість до всіх антибіотиків зазначеної групи окрім стрептоміцину. Штамп *Y. enterocolitica* 27729 виявився не чутливим до стрептоміцину (0 мм) та слабо чутливим та чутливим до гентаміцину, канаміцину і нетилміцину (10-20-25 мм). Проявив чутливість до гентаміцину, канаміцину, та нетилміцину (20-18-19) штамп *Y. Enterocolitica* 23715, але був не чутливим до стрептоміцину.

По відношенню до макролідів штами *Y. enterocolitica* 9610, 33639, 27729 та 23715 - виявили чутливість до антибіотиків з вище названої групи. У зонах затримки росту антибіотиків еритроміцин та олеандоміцин спостерігався чесельний ріст резистентних колоній штамів *Y. enterocolitica* 23715 та *Y. Enterocolitica* 33639. Штамп *Y. enterocolitica* 22/15 – 09 був чутливий до азітроміцину (13 мм.) та не чутливим до еритроміцину та олеандоміцину.

По відношенню до групи лінкозамідів штами *Y. enterocolitica* проявили середньою чутливість з зоною затримки росту 16 мм.

По відношенню до тетрациклінів усі досліджені штами виявилися чутливими крім штаму *Y. enterocolitica* 23715. Чотири з досліджених штамів проявляли високу чутливість до дії фторхінолоні, а штамп *Y. enterocolitica* 22/15–09 виявився не чутливим до рифампіцину.

Усі штами виявилися чутливими до групи нітрофуранів, але штамп *Y. enterocolitica* 22/15 – 09 виявився не чутливим до фузидіну (0 мм).

До більшості азолів досліджені штами виявилися не чутливими або слабо чутливими. Штамп *Y. enterocolitica* 9610 виявився не чутливим до флуконазолу, та чутливий до кетоконазолу (15 мм) та ітраконазолу (10 мм). Штамп *Y. enterocolitica* 22/15 -09 проявив слабку чутливість до кетоконазолу та клотримазолу (15-16 мм) та був не чутливим до ітраконазолу. Штамп *Y. enterocolitica* 33639 проявив чутливість до кетоконазолу (20 мм) та флуконазолу (14 мм), і був слабочутливим до ітраконазолу. Штами *Y. enterocolitica* 27729 та 23715 не чутливі до флуконазолу, та чутливі до інших антибіотиків з зазначеної групи.

Таким чином в результаті проведених досліджень встановлено, що:

культурально-морфологічні властивості у досліджених штамів однорідні та типові для виду *Y. enterocolitica*;

досліджені штами ферментували сорбіт, глюкозу, маніт, сахарозу, що притаманно для виду *Y. enterocolitica*;

штами *Y. enterocolitica* в більшості випадків виявилися резистентними до антибіотиків з груп азолів, нітрофуранів, лінкозамідів; проявляли чутливість відношенню до дії препаратів з групи цефалоспоринів, фторхінолонів;

в окремих випадках спостерігається індивідуальна висока резистентність штамів до деяких антибіотиків.

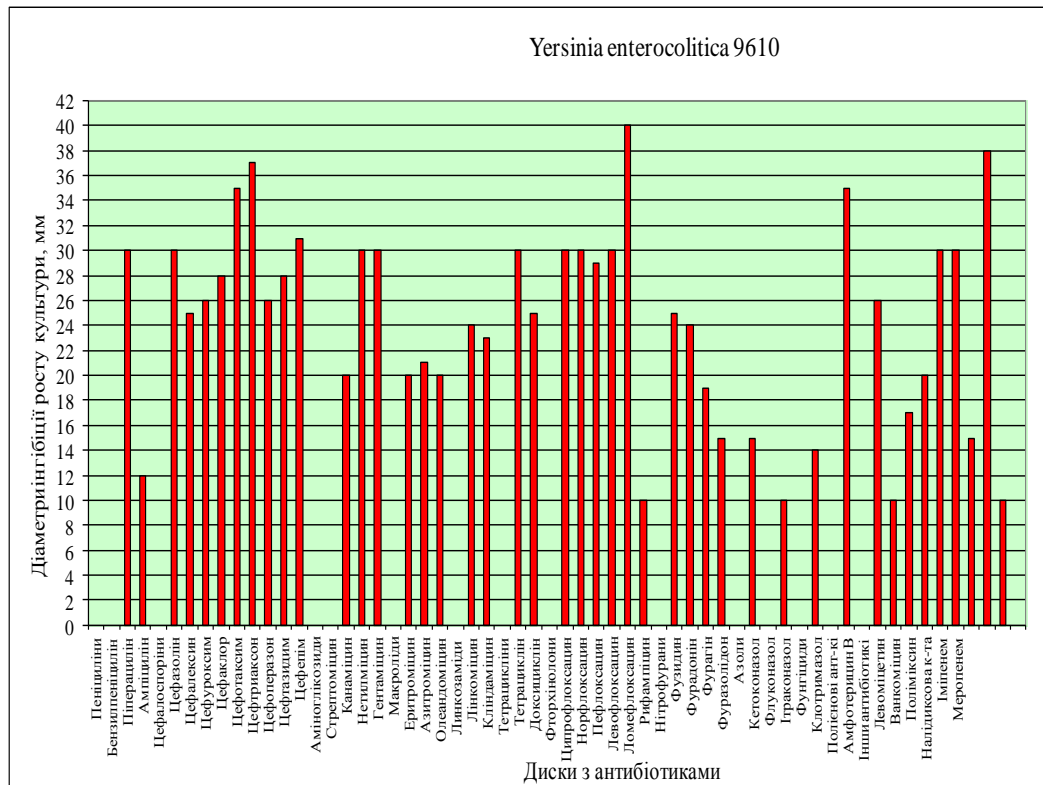


Рис.1 Результати вивчення антибіотикорезистентності *Y. enterocolitica* 9610.

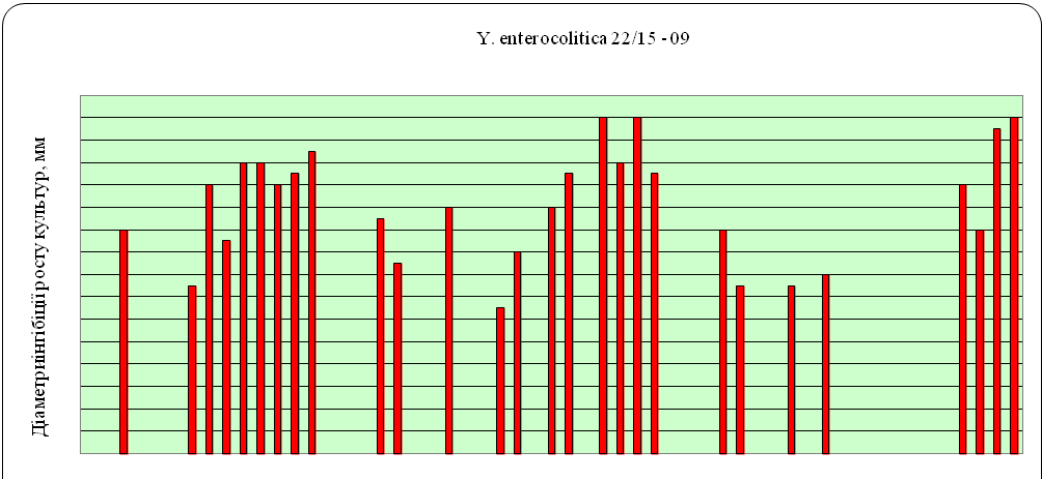
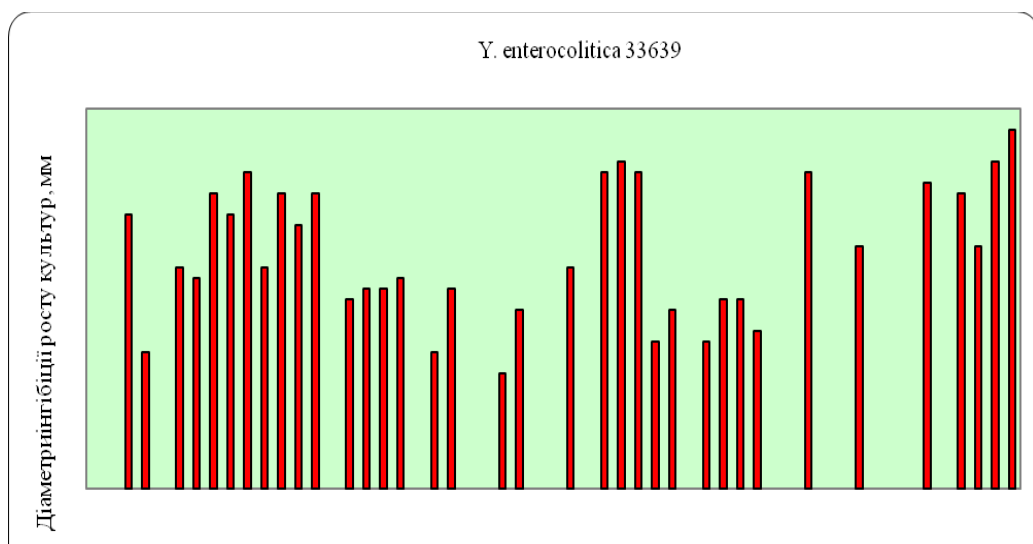
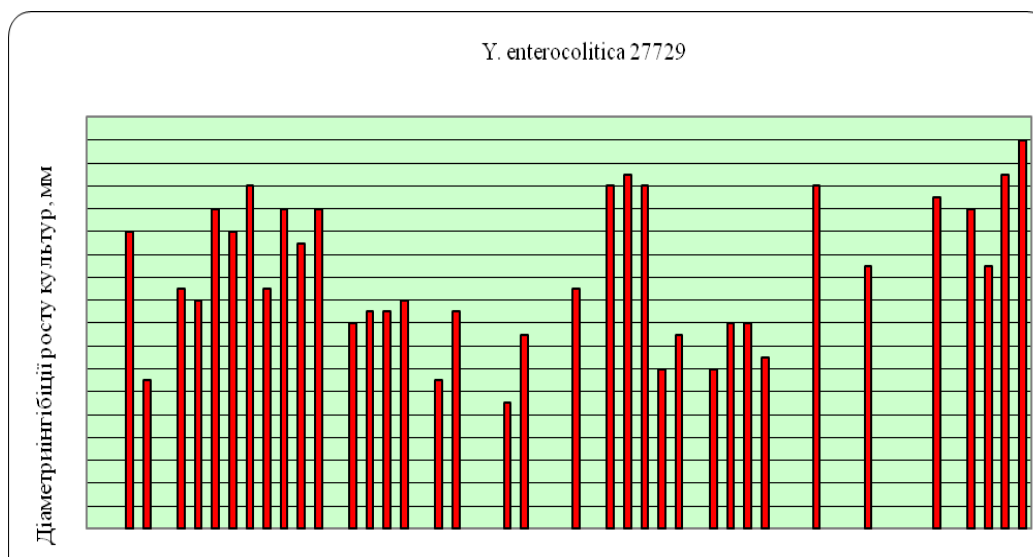


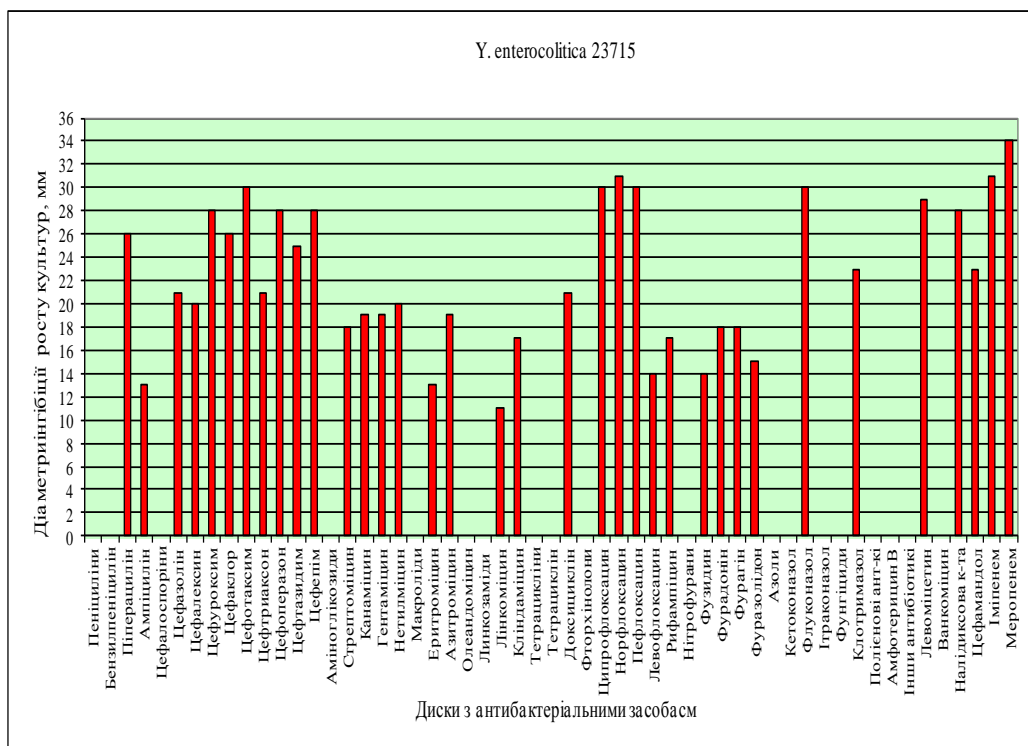
Рис.2. Результати вивчення антибіотикорезистентності *Y. enterocolitica* 22/15-09



**Рис.3. Результати вивчення антибіотикорезистентності
Y. enterocolitica 33639**



**Рис.4. Результати вивчення антибіотикорезистентності
Y. enterocolitica 27729.**



**Рис.5. Результати вивчення антибіотикорезистентності
Y. enterocolitica 23715.**

Висновок.

За культурально-морфологічними та ферментативними властивостями штами *Yersinia enterocolitica*, отриманих з колекції “Microbiologic” та з колекції ДНКІБШМ відповідають ознакам виду, але дещо різняться за профілем антибіотикорезистентності. Так, в більшості випадків вони виявилися резистентними до антибіотиків з груп азолів, нітрофуранів, лінкозамідів та були виявлено групову чутливість досліджених штамів по відношенню до дії препаратів з групи цефалоспоринів, фторхінолонів; в окремих випадках спостерігається індивідуальна висока резистентність штамів до деяких антибіотиків (бензилпеніцилінів). Отримані дані доцільно враховувати при розробці нових селективних поживних середовищ.

Перспективи подальших досліджень: Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення біологічних особливостей епізоотичних штамів ієрсиній та вдосконалення системи стандартизації бактеріологічних досліджень з метою виявлення контамінації харчових продуктів збудником ієрсиніозу.

1. Борисов Л. Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. С.131-150.

2. Антонов В.Я. Справочник ветеринарного лаборанта / В.Я. Ан-тонов. – М.: Колос, 1981. – С. 5–60.

3. Олійник Л. В. Ветеринарно-санітарний контроль харчових токсикоінфекцій / Л. В. Олійник. – К. : Аграрна наука, 2004. – 200 с.

4. Коритняк Б. М. Экологические аспекты циркуляции возбудителя кишечного иерсиниоза [Текст] / Б. М. Коритняк // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2006. – № 11. – С. 10–11.

5. Сапронознi інфекційні хвороби тварин [Текст] / Л.Є.Корнієнко, В. В.Недосеков, В. О.Бусол та ін. ; за ред. Л. Є. Корнієнка, В. О. Бусола. – Біла Церква : Білоцерківський держ. аграр. ун-т. – 2009. – 308 с.

6. Скрыпник В. Г. Изучение патогенных свойств *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii* и *Y. intermedia* на беременных морских свинках / В. Г.Скрыпник, А. Ф.Бабкин, В. А. Орлова // Эпизоотология, эпиде-миология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней общих для человека и животных : материалы Всесоюз. науч. конф. – Львов, 1988. – С. 407–408.

7. Скрыпник В. Г. Выделяемость и чувствительность к антибиотикам иерсиний у крупного рогатого скота / В. Г. Скрыпник // Ветеринария : Респ. межвед. темат. науч. сб. – К., 1988. – Вып. 64. – С. 25–27.

8. Экспериментальное изучение иерсиний в растениях /В. Ю. Литвин, Н. М. Шустрова, В.А. Гордейко и др. // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1991.–№9. –С. 5–7.

9. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий / В.Ю. Литвин, А.Л. Гинцбург, В.И. Пушкарева и др. – М., 1998.

10. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных / А.А. Конопаткин, И.А. Бакулов, Я.В. Нуйкин и др.; Под ред. А.А. Конопаткина. – М.: Колос, 1984. – 544 с.

11. Этиологическая значимость отдельных серотипов *Yersinia enterocolitica* в патологии людей и животных на европейском севере России/ Е.Ю. Смирнова, В.В. Сочнев, Н.А. Рыбакова, Д.А. Мамлеева // Ветеринарная патология. – 2004. – № 4 (11). – С. 69–73.

12. Ющенко Г. В. Экологические аспекты эпидемиологии и клиники иерсиниоза и псевдотуберкулеза. – М., 1983. – С. 5–10.

13. Ющенко Г. В. Энтеробактерии. – М.: Медицина, 1985. – С. 220–239.

14. Addition of new serogroups and improvement of the antigenic designs of *Yersinia pseudotuberculosis* / M. Tsubokura, K. Otsuki, Y. Kawasaka et al. // Curr. Microbiol. – 1984. – Vol. 11. – P. 89–92.

15. Adhesion and biofilm formation by different *Yersinia enterocolitica* biogroups / B. Kot, A. Jakubczak, M. Dominska, M. Kobylko // Med. Weter. – 2005. – Vol. 61. – № 7. – P. 800–803.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ БАКТЕРИЙ РОДА *YERSINIA*/Головко А.Н., Ушкалов А.В., Виговська Л. М.

*В статье приведены данные изучения биологических свойств и чувствительности к антибиотикам различных фармакологических групп бактерий рода *Yersinia enterocolitica* с коллекции ГНКИБШМ и американской коллекции Microbiologica. В сравнительном аспекте изучены культурально-морфологические, биохимические свойства, чувствительность к антибиотикам.*

Ключевые слова: Yersinia enterocolitica, сравнение, биологические свойства, антибиотикорезистентность.

A COMPARATIVE STUDY OF THE BIOLOGICAL PROPERTIES AND SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF BACTERIA YERSINIA GENUS/

Anatolii Golovko. Artem Ushkalov, Vygovska L.

The article presents the data the study of biological properties and sensitivity to various pharmacological groups antibiotikam bakteriy kind of Yersinia enterocolitica with COLLECTIONS GNKIBSHM and American collections Microbiologica. In a comparative study culturally-aspect morphology, biochemical properties, sensitivity to antibiotikam.

Keywords: Yersinia enterocolitica, comparison, biological properties, antimicrobial resistance.

Рецензент – кандидат ветеринарных наук М. В. Бабкін