

А. В. УШКАЛОВ, аспірант⁴.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

ВИВЧЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ БАКТЕРІЙ РОДУ *YERSINIA* З КОЛЕКЦІЇ НЦШМ ДНКІБШМ

У статті наведено результати вивчення антигенних властивостей штамів *Yersinia enterocolitica* з колекції НЦШМ ДНКІБШМ. Отримані дані свідчать про доцільність вдосконалення засобів діагностики кишкового ієрсиніозу.

Ключові слова: *Yersinia enterocolitica*, біологічні і серологічні властивості, реакція аглютинації, антигенна активність.

Інфекції, викликані *Yersinia pseudotuberculosis* і *Yersinia enterocolitica*, становлять значну частину інфекційної патології. Незважаючи на досягнуті успіхи у вивченні багатьох аспектів проблеми ієрсиніозів, актуальність цих інфекцій зберігається. Проблема ієрсиніозу в умовах сьогодення вивчена недостатньо повно, так як дослідження на кишковий ієрсиніоз тварин в останні роки проводяться в недостатньому обсязі [5]. Важливою особливістю збудників зазначених захворювань є дрейф біологічних властивостей циркулюючих ієрсиній [15].

У той же час, вивченню захворювань сільськогосподарських тварин, збудниками яких є *Yersinia pseudotuberculosis* і *Yersinia enterocolitica*, присвячено в останні роки значна кількість наукових досліджень. Виявлені не лише носійство, але й клінічно виражені захворювання, що проявляються генералізацією інфекції. Особливо сприйнятливий до ієрсиній молодняк тварин, захворювання та загибель якого суттєво знижує рентабельність галузі тваринництва [2-9]. Крім того, актуальність цих інфекцій визначається підвищенням рівня захворюваності людей ієрсиніозами. У цей час епізоотолого-епідеміологічною особливістю збудників зазначених захворювань, що перебігають з ознаками токсикоінфекцій, є зміна сероваріантного пейзажу циркулюючих *Y. enterocolitica*, поява нових серо- і біо-типів, зокрема таких, що раніше вважалися непатогенними [9-11].

З метою діагностики захворювання та ідентифікації збудника використовують дані щодо антигенної структури бактерій. Ієрсинії мають складну антигенну будову, а саме: жгутиковий Н-антиген, соматичний О-антиген і спільний для усіх представників сімейства *Enterobacteriaceae* К-антиген. За даними Н.Г. Путилиной (1989 р.) антигенний склад *Y. enterocolitica* представлений 16 антигенами, 12 з яких є термолабільними, а інші 4 – термостабільними. Соматичний антиген за своїм складом являється ліпополісахаридом, і має функціональні ознаки ендотоксину. За характеристикою О-антигенів вдалося розділити представників виду *Y. enterocolitica* на більше ніж 50 сероварів. Найбільше значення в патології людини мають серовари 03; 05; 07,8; 08; 09. Ієрсинії цього виду володіють також здатністю до інвазії й внутрішньоклітинного розмноження. Є повідомлення, що в антигенну структуру *Y. enterocolitica* входять компоненти капсульного антигену,

⁴ Науковий керівник – доктор вет. наук, професор, академік НААН А.М. Головка.

подібного із чумним капсульним антигеном F1 [12, 13]. Відзначено, що вірулентні штами *Y. enterocolitica*, патогенні для людини, здатні продукувати антигени вірулентності V і W, аналогічні антигенам *Y. pestis* і *Y. pseudotuberculosis*. Отримана проти цих антигенів сироватка реагує лише з вірулентними штамми. *Y. enterocolitica* сероварів 03; 09; 05,27; 08, що виділяються від тварин (свиней, корів, гризунів диких і синантропних), м'ясних і молочних продуктів, з овочів, води невеликих водойм. З навколишнього середовища (грунт, рослини, гризуни, вода, риба й т.д.) на різних територіях виділяються ієрсинії усіх відомих сероварів, у тому числі й тих, роль котрих в патології тварин і людини на цей час не встановлена. Виявлено антигенні зв'язки ієрсиній серовара 09 із бруцелями (*Brucella abortus bovis*, *Br. suis* і *Br. melitensis*), що утрудняє діагностику цього захворювання. Часто в сироватках хворих на бруцельоз людей і тварин рівень антитіл в РА і РЗК вище до антигенів ієрсиній, ніж до антигенів бруцел. Антигенне споріднення цих збудників пов'язане із загальними для обох антигенними компонентами ліпополісахаридного комплексу, розташованого в клітинній стінці [12-15].

Враховуючи високу потенційну небезпеку бактерій роду *Yersinia* для людини через контамінацію харчових продуктів тваринного і рослинного походження, залишається актуальною проблема вдосконалення системи контролю збудника. Так, зокрема, частота виділення ієрсиній із сирого молока варіює від 18% до 65% досліджених проб; описано випадки контамінації пастеризованого молока, молочних продуктів, устаткування на молокопереробних підприємствах із частотою від 0,4% до 11% проб. В зв'язку з цим у ДНКІБШМ формується колекція штамів мікроорганізмів роду *Yersinia*, з метою подальшого використання для стандартизації бактеріологічної діагностики ієрсиніозу, оцінки специфічності та чутливості тест-систем, тощо.

Мета роботи. Метою роботи було вивчення антигенних характеристик штамів *Yersinia enterocolitica* з колекції НЦШМ ДНКІБШМ.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були дев'ять штамів *Yersinia enterocolitica*, виділених в Україні при проведенні бактеріологічних досліджень об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду та три штами, отримані з колекції "Microbiologos" (США).

Біологічні властивості штамів вивчалися за наступними показниками: морфологічні властивості, типовість росту, антигенні властивості. Морфологічні властивості визначали шляхом мікроскопії мазків профарбованих за методом Грама. Типовість росту визначали шляхом висіву культур *Yersinia enterocolitica* на рідкі та щільні поживні середовища. Антигенні властивості вивчали за результатами реакції аглютинації на склі з діагностичними сироватками.

У роботі використовувалися «Сироватка до вірулентних ієрсиній (СВІ)» та «Сироватки діагностичні до *Y. enterocolitica* О-моновалентні кролячі сухі для РА», серотипів О:3; О:4; О:4,32; О:4,33; О:5; О:5,27; О:6,30; О:6,31; О:7,8; О:9; О:13; О:13,7 виробництва «ФБУН НІІІ епідеміології та мікробіології ім. Пастера», серії 11, виготовленої 11.2012, термін придатності до 12.2013 року. Реакцію аглютинації проводили з агаровими культурами вирощеними при 30°C 48 годин. Суху сироватку розбавляли стерильною дистильованою водою (рН 7,1 ± 0,1). На чисте знежирене предметне скло наносили 1 краплю сироватки та 1 краплю фізіологічного розчину (для контролю само аглютинації культури). Культуру відбирали бактеріологічною петлею, змішували з сироваткою. Реакцію обліковували у

впродовж 3 хвилин в хрестах, з використання лупи. Позитивна реакція аглютинації характеризується утворенням аглютинату не менше ніж на 3 хреста впродовж 3 хвилин. У контролі не повинно бути спонтанної аглютинації мікробної суспензії, допускається слабка (+) зернистість. Облік результатів проводиться при косому освітленні на темному фоні без допомоги або з допомогою лупи 5 – 7-кратного збільшення по 4-хрестовій системі:

- 4 + – чітко виражена аглютинація, просвітлення рідини;
- 3 + – добре виражена аглютинація, просвітлення рідини;
- 2 + – нечітка аглютинація зі слабким просвітленням рідини;
- 1 + – ледь помітна аглютинація, просвітлення рідини відсутнє;
- негативна реакція – гомогенна каламутна рідина.

Результати досліджень та обговорення. Для визначення морфологічних властивостей у культур (культури висіяні на МПБ та МПА) зробили пересіви на середовище Ендо. Культивування проводили в режим – при 30⁰С у впродовж 24 годин. На агарі Ендо через 24 години культивування формувалися дрібні колонії з випуклим центром з рівними краями, блідо-рожеві.

З ізольованих колоній готували мазки та фарбували за Грамом. В мазках спостерігали невеликі Грам-негативні кокоподібні однорідні палички розміром 0,8-1,0х0,5-0,6 мкм; В мазках із старих культур спостерігався поліморфізм популяції мікроорганізмів.

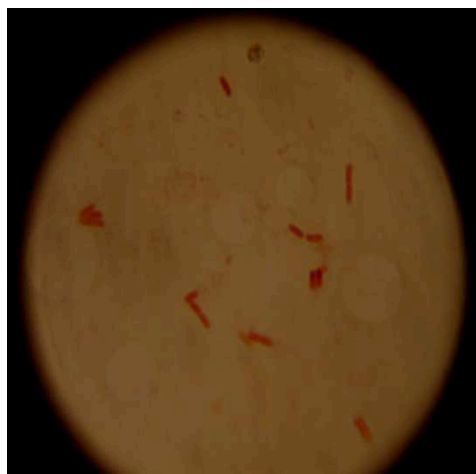
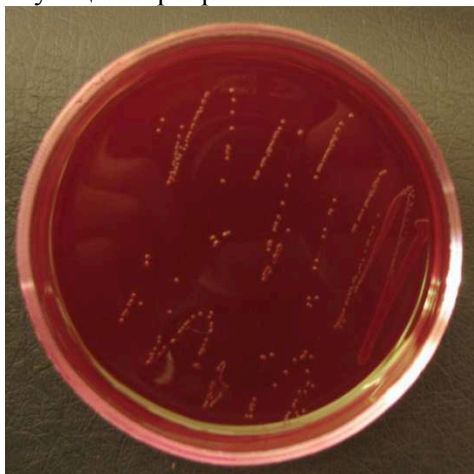


Рис. 1. Ріст на агарі Ендо. Рис. 2. Мікроскопія мазка (за Грамом).

Для подальшої О-типізації культуру на скошеному МПА підрощували впродовж 48 годин при 30⁰С. Перед початком роботи суху сироватку розбавляли стерильною дистильованою водою розчином (1 см³) з дотриманням стерильності. Дослідження проводили згідно настанови по застосуванню сироваток. Реакцію ставили на предметному склі. Для цього чисте предметне скельце фламбували над полум'ям, наносили пастерівською піпеткою по одній краплі розчиненої сироватки діагностичної до вірулентним *Yersinia enterocolitica* (СВІ-сироватки) і 0,9% розчину натрію хлориду (контроль). У краплю сироватки бактеріологічною петлею вносили дводобову досліджувану культуру *Y. enterocolitica* з дна пробірки і рівномірно перемішували з сироваткою. Результат РА враховували у протягом 3

хвилин, користуючись лупою. Одночасно проводили контроль культури на самоаглютинацію, змішуючи її з краплею 0,9% розчину натрію хлориду. Після змішування рекомендується легке погойдування предметного скла (до 3 хвилин). Реакцію ураховували в хрестах. Дослідження з О-моновалентними сироватками проводили аналогічною методикою.



Рис. 3. Реакція аглютинації на предметному склі.

Результати дослідження представлені у таблиці. Аналіз одержаних результатів свідчить про те, що штами *Y. enterocolitica*, отримані з колекції Microbiologics аглютинувалися лише сироваткою CBI – сироваткою, що містить антитіла до поверхневих антигенів штамів *Yersinia enterocolitica*, вірулентність яких обумовлених наявністю плазмиди вірулентності (pCad).

Таблиця

Результати реакції аглютинації штамів *Yersinia enterocolitica*

Назва штаму	Результат РА з:		
	CBI	моновалентною сироваткою	фізіологічним розчином
<i>Yersinia enterocolitica</i> 9610 (Microbiologics,USA)	++++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 27729 (Microbiologics,USA)	++++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 23715 (Microbiologics,USA)	++++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 3/15 – 08	+++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 23/15 – 08	+++	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 44/15 – 09	++++	O:3 ++++	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 13/15 – 10	++++	O:3 ++++	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 44/15 – 08	++++	O:3 ++++	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 29/15 – 09	++++	O:3 ++++	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 20/15 – 09	++++	O:3 +	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2/15-08	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2/15 – 09	-	-	-

Серед дев'яти штамів ієрсиній українського походження, позитивну реакцію з сироваткою CBI виявили у семи. П'ять із них аглютинувалися на 4+ з моновалентною сироваткою O:3. У двох штамів з ознаками вірулентності встановити приналежність до певного серологічного варіанту за результатами реакції аглютинації з наявними в нашому розпорядженні дванадцятьма різними О-сироватками

не представилося можливим. Два штами (№2/15-08 та 2/15-09), згідно до отриманих результатів, віднесені до сапрофітних.

Отримані дані вказують на доцільність, з метою вдосконалення діагностики харчових токсикоінфекцій та моніторингу кишкового ієрсиніозу, створення більш розгорнутого за О-антигенними характеристиками набору діагностичних сироваток. В ДНКІБШМ розпочато формування колекції штамів мікроорганізми роду *Yersinia*, з метою подальшого використання їх для стандартизації бактеріологічної діагностики ієрсиніозу, оцінки специфічності та чутливості тест-систем, розробки засобів диференціальної діагностики інфекційних хвороб та інше.

Висновок. Охарактеризовано за О-антигенними характеристиками 12 штамів *Yersinia enterocolitica* з колекції ДНКІБШМ. Отримані дані вказують на доцільність вдосконалення засобів діагностики кишкового ієрсиніозу.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення біологічних особливостей епізоотичних штамів ієрсиній та вдосконалення засобів діагностики кишкового ієрсиніозу.

Список використаної літератури:

1. Золотухина И. Я. Распространение иерсиниоза среди детей в отделении вирусного гепатита / И. Я. Золотухина, Г. В. Ющенко // Тез. докл. IV съезда эпидемиологов, микробиологов, инфекционистов и гигиенистов Эстонской ССР. Таллинн. – 1982. – С. 28-29.
2. Иерсинии и иерсиниозы / Под ред. доктора мед. наук, профессора Г. Я. Ценева. – Санкт-Петербург. – 2006. – С. 5-6, 21, 28.
3. Кузнецов В. Г. Адгезия и аутоадгезия иерсиний: выявление и роль в экологии // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Тез. докл. междунар. конф. – СПб., 2000. – С. 28.
4. Кузнецов В. И. Дифференциально-диагностическая среда для выделения бактерий рода *Yersinia* // Лабораторное дело. 1991. – № 3. – С. 77-78.
5. Куликовский А. В. Иерсиниоз актуальная проблема ветеринарной медицины / А. В. Куликовский, К. Джентемирова // Ветеринария. – 1993. – № 11-12. – С. 22-35.
6. Сомов Г. П. Псевдотуберкулез / Сомов Г. П., Покровский В. И., Беседнова Н. Н., Антоненко Ф. Ф. // М.: Медицина, 2001. – С. 46-56.
7. Тихонов В. К. Иерсиниозы животных в центральном правобережном агро-районе Нижегородской области: Автореф. дис. канд. вет. наук. СПб., 1999. – 21 с.
8. Урбах В. Ю. Математическая статистика для медиков и биологов. М.: АН СССР, 1963. – 323 с.
9. Хапцев З. Ю. Усовершенствование лабораторной диагностики кишечного иерсиниоза сельскохозяйственных животных: Автореф. дис. канд. вет. наук. Саратов, 2000. – 21 с.
10. Ценева Г. Я. Иерсиниоз и псевдотуберкулез: Пособие для врачей. СПб., 1992. – 54 с.
11. Ценева Г. Я. Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: Пособие для врачей. СПб., 1997. – 61 с.
12. Ценева Г. Я. Варианты проявления основных патогенных свойств иерсиний в эксперименте и их сопоставление с изменениями у больных // Инфекции, обусловленные иерсиниями: Тез. докл. междунар. конф. СПб., 2000. – С. 66.

13. Черкасский Б. Л. Пищевые зоонозы сальмонеллез, кампи-лобактериоз, иерсиниозы, листериоз / Черкасский Б. Л., Подунова Л. Г., Акулова Н. К. // Матер. Международ. симпозиума. – М., 1995. – С. 18-19.

14. Шарпова Т. А. Некоторые материалы по характеристике культур псевдотуберкулезного микроба // Дальневосточная скарлатиноподобная лихорадка (псевдотуберкулез человека). Л., 1978. – С. 53-61.

15. Шумилов К. В. Современные данные об иерсиниозе животных / К. В. Шумилов, Л. П. Мельниченко, В. В. Селиверстов // Ветеринария. – 1998. – № 4. – С. 7-13.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННЫХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ РОДА *YERSINIA* ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ГНКИБШМ / А. В. Ушкалов

*В статье приведены результаты изучения биологических и антигенных свойств бактерий рода *Yersinia enterocolitica* из коллекции ГНКИБШМ. Полученные результаты свидетельствуют об необходимости совершенствования средств диагностики кишечного иерсиниоза.*

*Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, биологические и серологические свойства, реакция агглютинации, антигенная активность.*

STUDY ANTIGENIC PROPERTIES OF BACTERIA OF THE GENUS *YERSINIA*, WITH A COLLECTION SSCIBSM / Artem Ushkalov

*The article presents antigenic properties of strains of *Yersinia enterocolitica* In this study, biological and antigenic properties of bacteria of the genus *Yersinia enterocolitica* from the special SSCIBSM collection. These results indicate the need to improve the diagnostics of intestinal yersiniosis.*

*Keywords: *Yersinia enterocolitica*, biological and serological properties, agglutination, antigenic activity.*

Рецензент – кандидат ветеринарных наук И. М. Полупан