

Козловська Г.В., кандидат ветеринарних наук

Національний університет біоресурсів і природокористування України,

м. Київ

**АДГЕЗИВНА ХАРАКТРИСТИКА ШТАМІВ YERSINIA
ENTEROCOLITICA, ВИДІЛЕНИХ ЗІ ЗРАЗКІВ ПРОДУКТІВ ЗАБОЮ
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ**

Рецензенти: доктор ветеринарних наук В.О. Бусол;

кандидат технічних наук С.Г. Даниленко

Досліджено адгезивну активність 12 штамів Y. enterocolitica, виділених зі зразків продуктів забою великої рогатої худоби та м'ясного фаршу. Шість досліджених штамів (50%) виявились високоадгезивними. Середній показник їх адгезивної активності був у межах $4,5 \pm 0,36$ – $4,9 \pm 0,24$. Три штами, виділені з жовчного міхура, печінки та лімфатичного вузла, характеризувались низькою адгезивністю (СПА становив $1,9 \pm 0,19$; $1,1 \pm 0,07$ та $1,2 \pm 0,05$ відповідно). Останні три штами (Є-8, Є-10 та Є-13) мали середні показники адгезивної активності.

Ключові слова: ієрсинії, кишковий ієрсиніоз, адгезини, токсикоінфекція, продукти забою.

Постановка проблеми. Yersinia enterocolitica широко розповсюджена у природі, викликає захворювання у людини – кишковий ієрсиніоз та у різних видів тварин [3, 5–8]. М'ясні і молочні продукти можуть бути факторами передачі ієрсиніозної інфекції, обумовлювати харчові токсикоінфекції [4]. За даними ВОЗ, кишковий ієрсиніоз має глобальне розповсюдження, зареєстрований практично на території усіх країн світу та за частотою виникнення серед гострих кишкових захворювань людини посідає друге – третє місце, поступаючись лише сальмонельозу та кампілобактеріозу.

Метою досліджень було визначення адгезивної активності штамів Yersinia enterocolitica, виділених зі зразків продуктів забою великої рогатої худоби та м'ясного фаршу.

Матеріал і методи досліджень. Робота виконана на базі проблемної лабораторії ветеринарної мікробіології, вірусології та імунобіотехнології кафедри

мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП України. З різних продуктів забою великої рогатої худоби (лімфатичні вузли, жовчний міхур, легені, селезінка, печінка, нирки, корінь язика), відібраних в умовах Литичівського м'ясокомбінату (Вінницька область), у Державних лабораторіях ветеринарно-санітарної експертизи м. Києва та з проб м'ясного фаршу, придбаного у продовольчих магазинах м. Києва, були ізольовані 33 культури ієрсиній, зокрема 18 – *Yersinia enterocolitica*. У процесі визначення наявності факторів (ознак) їх вірулентності охарактеризована, зокрема, адгезивна активність 12 штамів.

Визначення адгезивної активності здійснювали за методом Бриліс В.І. та ін. [4]. В якості клітинного субстрату були використані еритроцити морської свинки, які попередньо двічі відмили буферним розчином фосфату натрію (рН 7,2-7,3) шляхом центрифугування зі швидкістю 1000 об/хв. На вказаному буфері готували суспензію еритроцитів концентрацією 100млн/см³. На знежирене предметне скло наносили краплю буферного розчину, краплю суспензії еритроцитів та краплю суспензії досліджуваних мікроорганізмів, ретельно змішували та поміщали у вологу камеру на 30 хв. за температури 37⁰С, потім препарат висушували за температури 37⁰С, фіксували сумішшю спирт-ефіру та фарбували за методом Романовського-Гімзи.

Результати досліджень. Препарати вивчали під світловим мікроскопом. Результати оцінювали, визначаючи середній показник адгезії (СПА) – середню кількість мікроорганізмів, що прикріпилися до 1 еритроциту. Аналізували не менше 25 еритроцитів, враховуючи не більше 5 еритроцитів в 1 полі зору.

Адгезивність вважали нульовою при СПА від 0 до 1,0 , низькою – при СПА від 1,01 до 2,0, середньою від 2,01 до 4,0, високою – більше 4,0.

Результати вивчення адгезивних властивостей штамів *Yersinia enterocolitica* представлені в таблиці.

Як видно з результатів, представлених у таблиці, адгезивна активність серед досліджених штамів *Yersinia enterocolitica* коливалась у значних межах – від 1,2±0,05 до 4,9±0,24. Високоадгезивними виявились 6 (50%) досліджених штамів. Середній показник адгезивної їх активності був у межах 4,5±0,36 - 4,9±0,24. Високоадгезивні штами ізольовані з жовчного міхура (Є-7, Є-11),

печінки (Є-5), кореня язика (Є-16, Є-17) та м'ясного фаршу (Є-9). Три штами (Є-6, Є-12, Є-14), виділені з печінки, жовчного міхура та лімфатичного вузла, характеризувались низькою адгезивністю, СПА їх становив $1,14 \pm 0,07$, $1,9 \pm 0,19$ та $1,2 \pm 0,05$ відповідно. Останні три штами (Є-8, Є-10 та Є-13) мали середні показники адгезивної активності.

Адгезивна активність штамів *Yersinia enterocolitica* (n = 5)

№ п/п	Штам <i>Yersinia enterocolitica</i>	Джерело виділення	Середній показник адгезії (СПА)
1	Є-9	Фарш яловичий	$4,9 \pm 0,24$
2	Є-7	Жовчний міхур	$4,7 \pm 0,24$
3	Є-8	Жовчний міхур	$3,8 \pm 0,21$
4	Є-11	Жовчний міхур	$4,5 \pm 0,36$
5	Є-12	Жовчний міхур	$1,9 \pm 0,19$
6	Є-5	Печінка	$4,8 \pm 0,38$
7	Є-6	Печінка	$1,1 \pm 0,07$
8	Є-10	Печінка	$3,1 \pm 0,2$
9	Є-13	Лімфовузли	$3,6 \pm 0,27$
10	Є-14	Лімфовузли	$1,2 \pm 0,05$
11	Є-16	Корінь язика	$4,6 \pm 0,3$
12	Є-17	Корінь язика	$4,9 \pm 0,36$

Адгезивна активність мікроорганізмів – явище, що забезпечує оптимальне їх розташування по відношенню до субстрату, яке вони споживають для свого росту й розвитку, формують популяцію, здатну підтримувати певною мірою популяційний гомеостаз, протистояти іншим популяціям. Морфологічно це демонструється колонізацією – утворенням біоплівки на поверхні абіотичних чи біотичних компонентів. Таке явище, обумовлене нормальною мікрофлорою, корисне для макроорганізму – перш за все захищає його від сторонньої мікрофлори, але обумовлене патогенними чи умовно-патогенними мікроорганізмами, навпаки, – сприяє реалізації їх патогенних потенцій і цілком справедливо вважається фактором вірулентності. Колонізація певних ділянок в організмі людини чи тварин є початком інфекційного процесу [19]. Адгезія відбувається за рахунок взаємодії поверхневих структур мікроорганізму (адгезини, пілі, фімбрії, фібрили) з «чутливими» клітинами [12, 16]. *Yersinia enterocolitica* адгезію здійснює за рахунок специфічних білків (адгезинів), розташованих на поверхні мікробної клітини, фімбрій, пілеподібних адгезинів [2]. У працях ряду авторів показано, що вірулентні штами *Y. enterocolitica* утворюють велику кількість відростків у вигляді фібрил за-

вдовжки 50–70 нм, діаметром 1,5–2,0 нм, що корелює з наявністю плазмід рYV [2]. За допомогою скануючої електронної мікроскопії було досліджено процес адгезії ієрсиній на різних об'єктах (частинки корму, шкаралупа яйця, харчові продукти, еритроцити) та встановлено, що під час колонізації бактерії продукують екзоцелюлярні речовини, які забезпечують міжпопуляційні взаємодії, процеси адгезії та колонізації, а також захист мікробної популяції від впливу несприятливих факторів [4].

Вірулентні штами ієрсиній мають достатній арсенал факторів, що забезпечують не лише їх адгезію на клітинах та колонізацію на поверхні тканин, а й penetрацію, подолання специфічних та неспецифічних механізмів імунітету, здатність розмножуватись *in vivo*, спричиняючи патологічні явища. Частина факторів патогенності детермінована хромосомою мікробної клітини, інша – плазмідною рYV - plasmid associated with *Yersinia* virulence [18].

Хромосомою детермінуються, зокрема, такі фактори патогенності: уреаза (нейтралізує кислотність у шлунку), каталаза (володіє антифагоцитарною активністю), білки HtrA та GsrA (пригнічують фагоцитоз), білок зовнішньої мембрани 103 кДа – інвазин (забезпечує адгезію та проникнення збудника у клітину), білок зовнішньої мембрани 17 кДа (обумовлює адгезію і проникнення у клітину збудника, виявляє антикомплементарну дію), ентеротоксин Yst (стимулює гуанілатциклази ентероцитів, обумовлює накопичення цГМФ), ліпосахарид (характеризується антикомплементарною активністю). Позахромосомним фактором – плазмідною детермінуються: протеїназа муцину (забезпечує подолання муцинового покриття ентероцитів), адгезин YadA (обумовлює адгезію і колонізацію збудника, антифагоцитарну та антикомплементарну активність) та ін. [14, 15].

Генетичні детермінанти факторів патогенності *Yersinia enterocolitica* достатньо глибоко вивчались багатьма дослідниками [16,17,18,19,20]. Зокрема детально досліджено плазмиду вірулентності рYV. Вона детермінує синтез ряду важливих факторів, що забезпечують виживання її у різних умовах. Зокрема ген *yad* кодує білок Yad A (*Yersinia* adhesion A) – головний адгезин ієрсиній, завдяки якому мікроорганізм сорбується на поверхні слизових, колонізуючи їх [17]. Ген *uor* Y кодує білок Uor H молекулярною масою 51 кДа – фермент фосфотирозинфосфатазу, яка обумовлює дефосфорилування у клі-

тинах епітелію, макрофагах та інших клітинах імунної системи, що призводить до втрати належних їм функцій [18,19]. Ген уор Е кодує білок Уор Е, молекулярною масою 23 кДа, який характеризується виразною цитотоксичною дією, гальмує ділення клітин, пригнічує фагоцитарну реакцію [20].

Серед хромосомних генів *Yersinia enterocolitica*, що детермінують фактори патогенності, детально вивчені ген *ail*, який детермінує синтез білка, що бере участь у забезпеченні адгезії та прониканні збудника у клітини, ген *myf A* – детермінує синтез адгезину фімбрій збудника, ген *inv* – білок зовнішньої мембрани збудника, без якого проникнення його через кишковий епітелій було б неможливим. Продукт цього гену називають інвазином [20].

Синтез ряду факторів вірулентності залежить від умов культивування *Yersinia enterocolitica*. Вирощені за низьких температур штами ієрсиній, які рухливі та мають фімбрії, на етапі «запуску» інфекційного процесу закономірно будуть більш ефективними патогенами, ніж культури, вирощені за високих температурних режимів. Останнє ілюструється тим, що ієрсиніози у людини виникають, як правило, в результаті вживання контамінованих продуктів, які нерідко зберігались в умовах холодильника.

Висновок: ізолювані з продуктів забою великої рогатої худоби, м'ясного фаршу, штами *Yersinia enterocolitica* характеризуються поліморфними адгезивними властивостями. Виділення штамів з високими адгезивними властивостями свідчить про певну небезпеку м'ясної сировини та обумовлюють необхідність подальшого вивчення цього мікроорганізму, зокрема в плані розробки технологій отримання, зберігання та споживання тваринницької продукції, які б унеможливили реалізацію його патогенних потенцій.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Бриллис В.И., Брилеве Т.А., Ленцнер Х.П. та ін. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / Лаб.дело – 1986.- №4. – С.210-212.
2. Водопьянов С.О. Феномен пилеобразования у *Yersinia enterocolitica* // Дисс. д-ра мед. наук. - Ростов-на-Дону. – 1995. – 236 с.
3. Гончарова Т.Е., Головач Г.С. Эпидемиологический надзор за иерсиниозами // Матер. юбил. конф. “Актуальные проблемы теоретической и прикладной эпидемиологии”. – Харьков. – 1997. – С.113 – 115.

4. Ленченко Е.М. Биология и экология иерсиний – возбудителей пищевых токсикоинфекций // Автореф. дисс. д-ра вет. наук. - М.: МГУПБ, 2000. – 46 с.
5. Поліщук Н.М. Епідеміологічні та епізоотологічні аспекти ієрсиніозів / Н.М.Поліщук // Annals of Mechnicov Institute. – 2008. – № 4. – Р. 5–8.
6. Скибіцький В.Г., Козловська Г.В. Збудник кишкового ієрсиніозу та пов'язані з ним проблеми / Скибіцький В.Г., Козловська Г.В. // Кн.: Гуманітарні та ресурсні проблеми національної безпеки України. – К. – «Експрес-Поліграф» – 2012. – С.19 – 31.
7. Скрыпник В.Г., Бабкин А.Ф., Орлова В.Г. Методические рекомендации по выделению и идентификации иерсиний. – Харьков – 1987. – 10 с.
8. Скрыпник В.Г. Роль *Yersinia enterocolitica* в патологии КРС / В.Г. Скрыпник, А.В. Митрофанов // Тез. докл. конф., посвященной 100-летию открытия вируса ящура. – Владимир, 1997. – С. 210.
9. Смирнов И.В. Возбудитель иерсиниоза и близкие к нему микроорганизмы. // Клиническая микробиология антимикроб химиотерапия. – 2004. – Т.6. – №1. – С.10 – 21.
10. Cornells G.R. Role of the transcription activator virF and the histone-like protein YmoA in the thermoregulation of virulence functions in *Yersinia* // Int J. Med. Microbiol. Virol. Parasit. Infect. Dis. – 1993. – 278:149–64.
11. Cornells G., Boland A., Boyd A. et. al The virulence plasmid of *Yersinia antihost* genome // Microbiol. Molecular. Biol. Rev. – 1998. – Vol.62, №4. – P.1315–352.
12. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenition and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk // Appl. Environ. Microbiol. –1980. – Vol. 40. – P. 174–176.
13. Forsberg A., Rosqvist R. In vivo expression of virulence genes of *Yersinia pseudotuberculosis*. // Infect Agents Dis. – 1993. – 2:275-8.
14. Laird W.J., Cavanaugh D.C. Correlation of autoagglutination and virulence of *Yersinia* // J. of Clinic. Microbiol. – 1980. – Vol. 11. – №4. – P. 430–432.
15. Guan K., Dixon J. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. // Science – 1990. – 249:553–556.
16. Jones G.W., Isaacson R.E. Proteinaceous bacterial adhesions and their receptors // Crit. Rev. Microbiol. – 1983. – Vol. 10. – №3. – P. 229–260.
17. Persson C., Carballeira N., Wolf-Watz H., Fallman M. The PTPase YopH inhibits uptake of *Yersinia*, tyrosine phosphorylation of p130 Cas and FAK, and the associated accumulation of these proteins in peripheral focal adhesion. // EMBO J. 19297; 16:2307-18.
18. Smego R., Frean J., Koornhof H.J. Yersiniosis: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plaque and non-plaque *Yersinia* infections. // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1999 – 18:1–15.
19. Smith H.W. Microbial surfaces in relation to pathogenicity // Bact. Rev. – 1977. – Vol. 41. – P. 475 – 500.
20. Young V.B., Miller V.L, Falkow S., Schoolnik G.K. Sequence, localization and function of the invasin protein of *Yersinia enterocolitica*. // Mol. Microbiol. – 1990. – 4:1119 – 28.