

DOI 10.25741/2413-287X-2022-02-4-167

УДК 619:639:616.9 / 34:579.84:615.33

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА *Enterobacteriaceae*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КОРМОВ

А. КРЕМЛЕВА, В. БЕЛОУСОВ, д-р вет. наук, **Г. НУРЛЫГАЯНОВА**, канд. вет. наук, ФГБУ ЦНМВЛ**С. БАЗАРБАЕВ**, канд. биол. наук, ФГБОУ ВО МГАВМиБ–МВА имени К.И. Скрябина

E-mail: vibelousov51@mail.ru

В статье приведены результаты лабораторных исследований выделения и идентификации микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* в кормах, применяемых на территории РФ и странах ЕС. Установлено, что в структурном составе бактериальных агентов данного семейства преобладает *E. coli* с 37–57%, на долю *Enterobacter* spp. приходится 3–34%, *Klebsiella* spp. — 2–27%, *Salmonella* spp. — 9–26%, *Proteus* spp. — 2–12%, *Citrobacter* spp. — 5–9%. Также выявлены *E. coli*, относящиеся к патогруппам ETEC и EHEC. Кроме того, во всех видах кормов зарегистрировано присутствие *Yersinia enterocolitica*.

Анализ нормативной документации, действующей в Российской Федерации, по лабораторным методам исследований кормов показал, что они требуют пересмотра и усовершенствования в части использования питательных сред, диагностических наборов, оборудования, в том числе определения патогенных свойств культур, выделенных при исследованиях, а также гармонизации с международными стандартами по исследованию кормов.

Ключевые слова: корма, комбикорма, *Enterobacteriaceae*, лабораторный контроль, микробиологические показатели, положительные результаты.

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

В настоящее время микробиологический контроль безопасности кормов является приоритетной задачей, отмеченной как ВОЗ, так и МЭБ, по предотвращению загрязнения пищевых продуктов животного происхождения через корма различными патогенными микроорганизмами, природными токсинами, ксенобиотиками техногенного происхождения и лекарственными средствами для животных [2, 3, 4].

Наиболее значимыми возбудителями которых являются представители семейства *Enterobacteriaceae* родов *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Yersinia* и др. [1, 8, 10]. Показатели безопасности кормов и кормовых добавок в Российской Федерации включают общую бактериальную обсемененность, энтеропатогенные типы кишечной палочки, бактерии рода *Proteus*, токсинообразующие анаэробы, ботулинический токсин, сальмонеллы, пастереллы [1, 3, 6].

The results of the isolation and identification of the bacteria from family *Enterobacteriaceae* in feeds produced in Russian Federation and EU countries are presented. *E. coli* was found to be the dominating species (37–57% of total bacteria) followed by *Enterobacter* spp. (3–34%), *Klebsiella* spp. (2–27%), *Salmonella* spp. (9–26%), *Proteus* spp. (2–12%), and *Citrobacter* spp. (5–9%); enterotoxigenic (ETEC) and enterohemorrhagic (EHEC) *E. coli* pathogroups were also found. The presence of *Yersinia enterocolitica* was stated in all types of the feeds.

The investigation of the methods of microbiological lab analysis of feeds officially adopted in Russian Federation revealed the need in their review and advancement, including nutritive media, diagnostic kits, equipment, and protocols for the determination of pathogenic properties of the isolates; the harmonization of the methods with internationally adopted standards is also required.

Keywords: feeds, compound feeds, *Enterobacteriaceae*, lab control, microbiological parameters, positive results.

В 2014–2020 гг. в кормах лидирующее место занимали энтеропатогенные типы кишечной палочки (ЕПЕС) [5]. Изменение патогенности энтеробактерий свидетельствует о целесообразности изучения этого явления у данной группы бактерий как на фенотипическом, так и на молекулярно-генетическом уровнях [2, 3, 6].

У представителей семейства *Enterobacteriaceae* известны гены, кодирующие способность к адгезии (*sfa*, *afa*, *aaf* / 1, *eae*), инвазии (*ipaH*, *ial*), продукции термолabileльных (*elt*, *LT II*), термостабильных (*st1*, *st2*) и шига-токсинов (*stx1*, *stx2*). Среди представителей семейства энтеробактерий наиболее опасными для человека являются энтерогеоморрагические кишечные палочки (*E. coli* O157:H7) и энтероагрегативные кишечные палочки (O104:H4). Группа STEC-штаммов эшерихий включает в себя энтерогеоморрагические *E. coli* (EHEC) и не-EHEC *E. coli*. Для группы EHEC характерно наличие ге-

нов патогенности: *rfb*, *eae*, *stx1*, *stx2*, *ehx*, контролирующих, соответственно, синтез специфических липополисахаридов, основного антигена адгезии — интимина, шига-токсинов 2- и/или 1-го типов, энтерогемолизина [7, 8, 9, 10].

Следует отметить, что методы, применяемые для микробиологического выделения и идентификации энтеробактерий в странах ЕС (ISO 16654:2001), включают обнаружение энтерогеморрагических штаммов *E. coli* O157, в том числе с использованием метода ПЦР (ISO/TS 13136-2016) для определения аллелей гена, кодирующего первичную структуру и синтез О-антигена эпидемиологически важных серологических групп O157, O26, O111, O113, O145 [4, 7, 9].

В настоящее время микробиологический контроль безопасности кормов на наличие сальмонеллы, анаэробов, бактерий рода *Протеус* и энтеропатогенных типов кишечной палочки проводится согласно Правилам бактериологического исследования кормов, утвержденным в 1975 г., и Методике индикации бактерий рода *Протеус* в кормах животного происхождения, утвержденной в 1981 г. Эти документы содержат устаревшие методы исследований: применение низкоселективных дифференциально-диагностических питательных сред, отсутствие современных тест-систем и биохимических анализаторов, а также определение патогенности выделенных изолятов микроорганизмов путем постановки биологической пробы на белых лабораторных мышах. Кроме того, в настоящее время отсутствует нормативно-методическая база по обнаружению эпидемиологически значимых шига-токсинообразующих штаммов *Escherichia coli* (STEC), относящихся к серогруппам O157 и O26, O45, O103, O111, O121, O145 (так называемые не O-157), а также по обнаружению условно-патогенных энтеробактерий родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Yersinia* в кормах.

Таким образом, усовершенствование методов выделения и идентификации энтеробактерий в кормах является актуальной и необходимой задачей для обеспечения биологической и пищевой безопасности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Микробиологическая и молекулярно-биологическая характеристика штаммов энтеробактерий с применением бактериологических, серологических, биохимических и молекулярно-генетических методов идентификации позволяет получить и сравнить изоляты энтеробактерий, выделенные из кормов разного вида.

Цель работы — оценка распространенности энтеробактерий в кормах и изучение молекулярно-биологических свойств штаммов энтеробактерий.

Бактериологические исследования с последующим изучением морфологических, тинкториальных, культуральных, биологических и серологических свойств проводили в ФГБУ ЦНМВЛ (Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория) в отделе бактериологии, молекулярно-генетические исследования — в отделе молекулярных исследований. При комплексном микробиологическом исследовании кормов использовались: физиологический раствор, ГРМ-бульон, МакКонки-ГРМ-бульон, бульон Моссея, SDS-бульон, среда Эйкмана, питательная среда №11 ГРМ, ЕС-бульон, среда Кесслера, Chromocult Coliform Agar, Fluorocult LMX Broth, сорбитол *E. coli*O157:H7, Fluorocult *E. coli*O157:H7, триптон-соевый агар неселективный, мясопептонный агар, среда Эндо, Rambach агар, висмут-сульфит агар, XLD агар, среда Симмонса, среда Олькеницкого, агар Клиггера, среда полужидкий агар.

Для изучения биохимических свойств, а также для родовой и видовой идентификации выделенных изолятов бакте-

Таблица 1. Результаты исследований различных кормов на наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

Вид корма	Количество исследованных проб	Виды бактерий и количество положительных проб
Корма растительного происхождения: сено, сенаж, силос, солома, травяная мука; зерно злаковых культур — кукуруза, ячмень, овес, просо, сорго, пшеница; зерно бобовых культур	222	<i>E. coli</i> — 11, <i>Klebsiella spp.</i> — 5, <i>Proteus spp.</i> — 1, <i>Salmonella spp.</i> — 2, <i>Enterobacter spp.</i> — 2
Корма животного происхождения: мясокостная и рыбная мука, мясные и рыбные корма для пушных зверей, пищевые отходы животного происхождения	88	<i>E. coli</i> — 39, <i>Klebsiella spp.</i> — 1, <i>Proteus spp.</i> — 8, <i>Salmonella spp.</i> — 18, <i>Enterobacter spp.</i> — 2
Комбикормовая продукция: полнорационные комбикорма, комбикорма-концентраты, БВМК, премиксы	131	<i>E. coli</i> — 9, <i>Klebsiella spp.</i> — 6, <i>Enterobacter cloacae</i> — 5, <i>Citrobacter spp.</i> — 2
Побочные продукты пищевых производств: жмыхи, шроты, жом, барда, пивная дробина	84	0
Прочие корма и кормовые добавки: минеральные подкормки, синтетические аминокислоты, витаминные препараты	239	0
Корма для непродуктивных животных: полнорационные корма [сухие и влажные (консервированные, замороженные, охлажденные)], лакомства, функциональные корма, диетические корма и пр.	511	<i>E. coli</i> — 15, <i>Klebsiella spp.</i> — 5, <i>Proteus spp.</i> — 1, <i>Salmonella spp.</i> — 4, <i>Enterobacter cloacae</i> — 14, <i>Citrobacter spp.</i> — 2
Дрожжи кормовые	2	<i>Enterobacter cloacae</i> — 2

рий применялись следующие коммерческие тест-системы: RapID NF Plus Panel (R8311005), API® 20 E, ENTEROtest 24N, с сопутствующими расходными материалами, реагентами и электронной базой для интерпретации полученных результатов. Помимо коммерческих биохимических тест-систем, для определения сахаролитических свойств выделенных изолятов были использованы сахара Гисса: адонит, арабиноза, галактоза, D-глюкоза, дульцит, инозит, инулин, ксилоза, мальтоза, маннит, манноза, раффиноза, рамноза, салицит, сорбит, сахароза, трегалоза, фруктоза, производства ФГУН ГНЦ ПМБ «Оболенск», ООО «Himedia», «Merck», «Conda», «Углич», «Биокомпас».

Определение патогенных и вирулентных свойств изолятов эшерихий проводили с использованием лабораторных животных. Для реализации исследования методом ПЦР были использованы тест-системы «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В 2021 г. было исследовано 1277 образцов кормов, в том числе для продуктивных и непродуктивных животных. В структуре выделенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* преобладающим штаммом являлся *Escherichia coli* — 48,7%, в дополнение к нему обнаруживались штаммы *Klebsiella spp.* — 11,04%, *Proteus spp.* — 6,49%, *Citrobacter spp.* — 2,60%, *Enterobacter spp.* — 16,23%, *Salmonella spp.* — 15,58%. В таблице 1 и на рисунке 1 приведен видовой состав бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из различных кормов. Основной бактериальной флорой в них оказались энтеробактерии рода *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*. Наиболее загрязненными были корма животного происхождения,

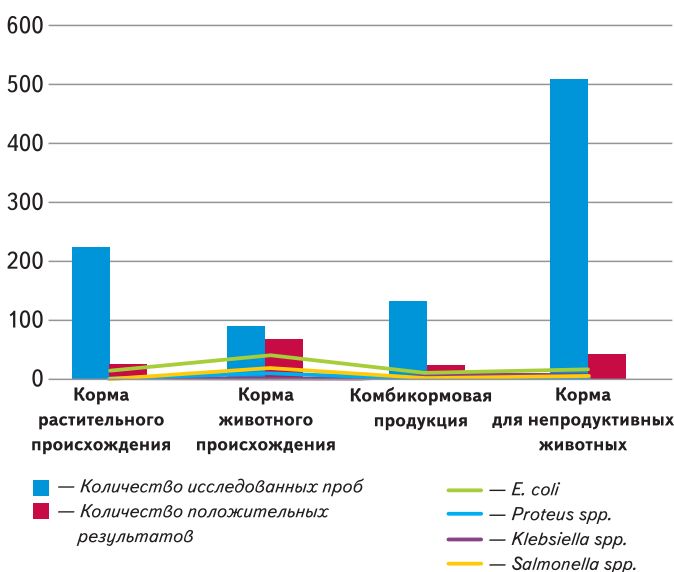


Рис. 1. Результаты исследований кормов различных видов на наличие бактерий семейства *Enterobacteriaceae*

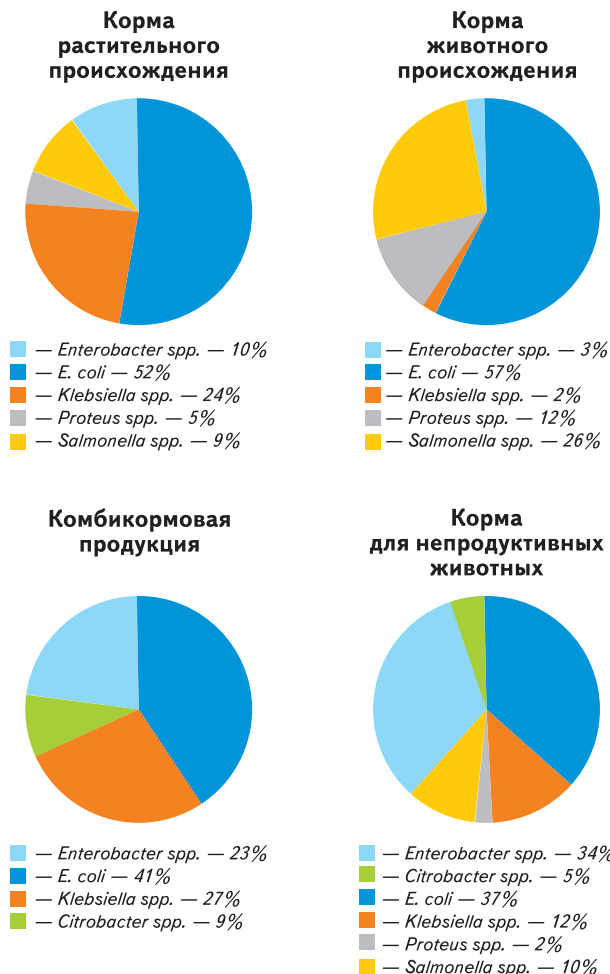


Рис. 2. Видовой состав бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из различных видов кормов в 2021 г.

исхождения, менее загрязненными — корма для непродуктивных животных.

Полная структура, определенного в рамках исследования видовой состава энтеробактерий, выделенных из кормов, отражена на рисунке 2.

В структурном составе бактериальных агентов преобладают *E. coli*, процентное соотношение которых составило 37–57%. Затем по инцидентности выделяемости оказались бактерии рода *Enterobacter spp.* — 3–34%, *Klebsiella spp.* — 2–27%, *Salmonella spp.* — 9–26%, *Proteus spp.* — 2–12%, *Citrobacter spp.* — 5–9%. По биологическим свойствам 100% выделенных *E. coli* относились к типичным, лактозоположительным *E. coli*. Все изоляты характеризовались подвижностью, образованием индола, разложением углеводов (лактоза, D-маннит, D-сорбита). Гемолитическая активность выявлена у 16% изученных штаммов.

Изоляты *E. coli* были отнесены к соответствующим патогруппам: 11 штаммов к ЕРЕС, 19 — к ЕТЕС. Далее эти штаммы были протестированы нами с помощью набора реагентов АмплиСенс® Эшерихиозы-FL для выявления и дифференциации ДНК диареогенных *E. coli*.

По результатам исследований удалось идентифицировать диареогенные эшерихии различных серо- и патогрупп, в том числе ЕРЕС ($n = 11$) и ЕТЕС ($n = 5$). У 58 штаммов патогруппа не подтвердилась (относятся к недиареогенным эшерихиям).

При определении патогенных свойств эшерихий было установлено, что лишь 12 штаммов из 74 являются патогенными для белых мышей в дозе $1,5 \times 10^9$ мкр.кл., а именно: 750, Tula, Tula-2, 7691, 7692, 7086, 8359m, 1336, 1273, 1424, 1649, Д/рп.

Анализ показал, что бактерии *Klebsiella pneumoniae* значительно чаще выделялись из кормов растительного происхождения (29,4% от количества положительных результатов) и комбикормовой продукции (35,3%) по сравнению с остальными представителями бактерий группы кишечной палочки. В незначительном количестве (5,9%) *K. pneumoniae* были выделены из кормов животного происхождения.

В таблице 2 приведен перечень изолятов *Proteus spp.*, выделенных из различных кормов в 2021 г.

Таблица 2. Перечень изолятов *Proteus spp.*, выделенных из кормов

Проба	Источник выделения	Микроорганизм
1531-ЦНМВЛ	Мука из птицы	<i>Proteus mirabilis</i>
8991м-ЦНМВЛ	Печень с курицей стандарт	<i>Proteus mirabilis</i>
1274-ЦНМВЛ	Мясо механической обвалки	<i>Proteus mirabilis</i>
1424-ЦНМВЛ; 1336-ЦНМВЛ	Отходы переработки мясопродуктов животных	<i>Proteus mirabilis</i>
23-1с-ЦНМВЛ	Мясные и рыбные корма для пушных зверей	<i>Proteus mirabilis</i>
9690-ЦНМВЛ	Части кролика непищевые замороженные	<i>Proteus mirabilis</i>
917-ЦНМВЛ	Субпродукт мясной 2 категории, замороженный, уши говяжьи	<i>Proteus hauseri</i> ; <i>Proteus vulgaris</i>
Нир 4-ЦНМВЛ	Сенаж	<i>Proteus mirabilis</i>

На плотных средах бактерии рода *Proteus* образовывали характерный сливающийся рост. На среде Плоскирева колонии имели диаметр 2–3 мм, они были прозрачными или полупрозрачными, слегка выпуклыми с желтовато-розовым перламутровым оттенком, вокруг них наблюдался желтоватый ореол. На среде Эндо бактерии проявляли способность к роению, давали сливной рост; другие виды образовывали колонии, сходные с сальмонеллами и шигеллами. Биохимические свойства варьировали в зависимости от вида микроорганизма. К примеру, протей разжижал желатин, гидролизировал мочевины, непостоянно образовывал индол и сероводород, не разлагал лактозу и маннит.

Изучение патогенных свойств 10 культур рода *Proteus* на 30 белых мышах весом 15 г показало, что все выделенные культуры вызывали гибель мышей в течение 1–2 суток после их заражения. При вскрытии мышей отмечали картину геморрагического энтерита, выявлены множественные точечные кровоизлияния по эндо- и эпикарду.

При исследовании образцов кормов были выделены 24 изолята *Salmonella spp.* Все культуры выделенных изолятов имели типичные для вида морфологические, тинкториальные и культуральные свойства. Представляли собой мелкие грамотрицательные палочки, не образующие спор и капсул, подвижные. Штаммы ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, сорбит, арабинозу, маннит, рамнозу и дульцит; не ферментировали лактозу и сахарозу. Образовывали сероводород, не образовывали индол, не разжижали желатин. Оксидазная активность отрицательная, каталазная активность положительная, реакция Фогеса-Проскауэра отрицательная. Характер роста в бульоне МПБ и бульоне Хоттингера — равномерное помутнение среды; на МПА и агаре Хоттингера в чашках Петри через 16–24 ч культивирования наблюдали круглые, выпуклые, полупрозрачные, с гладкой поверхностью и ровными краями колонии. При этом контаминация кормов животного происхождения составила 91,7% от количества исследуемых проб, кормов растительного происхождения — 8,3%. Видовой состав сальмонелл был представлен следующими сероварами: *Salmonella dublin* ($n = 7$), *Salmonella agona* ($n = 2$), *Salmonella london* ($n = 1$), *Salmonella abortusovis* ($n = 1$), *Salmonella typhimurium* ($n = 1$), *Salmonella orarienburg* ($n = 2$). Частота выделения сальмонелл следующих серогрупп (в 2021 г.): С — 42%, D — 37%, В — 17%, Е — 4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В КОРМАХ МЕТОДОМ ПЦР

Метод ПЦР (полимеразная цепная реакция) является ведущим в обнаружении патогенных микроорганизмов и детерминант резистентности у штаммов, изолированных из продуктов питания и кормов.

Детекцию генов вирулентности диареогенных *E. coli* (DEC) проводили с использованием набора реагентов «Амплиценс® Эшерихиозы-FL». Методом ПЦР в режиме реального времени было проведено 543 исследования 181 пробы кормов. Корма растительного происхождения ($n = 128$) были представлены следующими видами: пшеницей ($n = 46$), горохом ($n = 21$), кукурузой ($n = 14$), овсом ($n = 12$), ячменем ($n = 8$), подсолнечником ($n = 8$), рапсом ($n = 2$), шротом ($n = 3$), пивной дробинкой ($n = 1$), жомом ($n = 1$), сеном ($n = 1$), соломой ($n = 1$), силосом ($n = 1$) и др. Корма животного происхождения ($n = 3$) включали концентрат белковый рыбно-растительный ($n = 2$) и муку кормовую животного происхождения кровяную ($n = 1$). Кроме того,

проведено исследование концентрированных кормов, в том числе комбикормовой продукции (n = 19).

На рисунке 3 представлены положительные результаты определения энтеробактерий в кормах методом ПЦР Real-time. Следует отметить, что во всех видах кормов зарегистрировано выявление патогенных *E. coli*, относящихся к патогруппам ЕТЕС и ЕНЕС.

На основании изложенного выше нами были разработаны оптимизированный алгоритм выделения и идентификации патогенных эшерихий (рис. 4).

Методом ПЦР Real-time во всех видах кормов выявлялись бактерии *Yersinia enterocolitica*. При этом частота обнаружения данного патогена в кормах растительного происхождения составляла 7%, в концентрированных кормах, в том числе в комбикормах, — 10%.

Yersinia enterocolitica — патогенный микроорганизм, вызывающий кишечные иерсиниозы у животных и человека. Данный патоген представляет определенный интерес для дальнейшего изучения, так как обладает широким набором факторов патогенности плазмидной и хромосомной природы, обуславливающих многообразие клинических форм иерсиниоза. Факторами передачи кишечного иерсиниоза являются прежде всего продукты животного происхождения, поэтому нами было принято решение о проведении дальнейшего микробиологического мониторинга циркуляции иерсиний в кормах для животных.

Разработанный нами оптимизированный алгоритм выделения и идентификации патогенных иерсиний в кормах для животных представлен на рисунке 5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов настоящей научно-исследовательской работы сделаны следующие заключения.

Первое. В лабораториях РФ при исследовании кормов определяются в качестве патогенных эшерихий только энтеропатогенные типы кишечной палочки (ЕРЕС). Зарегистрированы единичные случаи выделения из кормов энтерогеморрагической (ЕНЕС) *E. coli* O157 и серологических групп ЕНЕС, не относящихся к типу O157 (O26, O103, O111, O117, O145), что было связано со случайными вспышками пищевых инфекций у людей во всем мире.

Второе. В мониторинговые исследования, проводимые в ветеринарных лабораториях, не входит обнаружение в кормах энтерогеморрагических *Escherichia coli* (ЕНЕС) по причине отсутствия методологии исследования на данный патоген в действующих нормативных документах и доступных методов идентификации этих микроорганизмов в ветеринарных лабораториях регионального уровня.

Третье. Показана необходимость пересмотра нормативной документации, регламентирующей критерии и методы обнаружения в кормах энтеробактерий, в том числе *Escherichia coli*, БГКП, сальмонелл с учетом международных требований. Необходимо расширить пере-

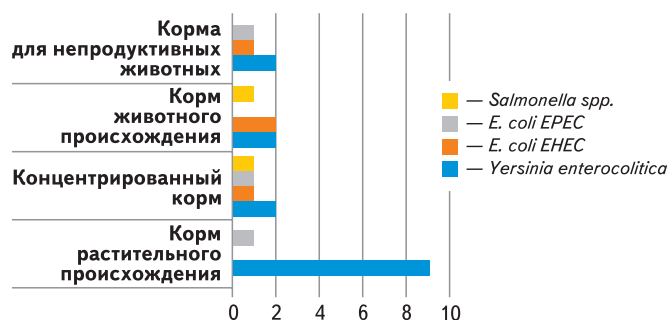


Рис. 3. Результаты определения энтеробактерий в кормах методом ПЦР

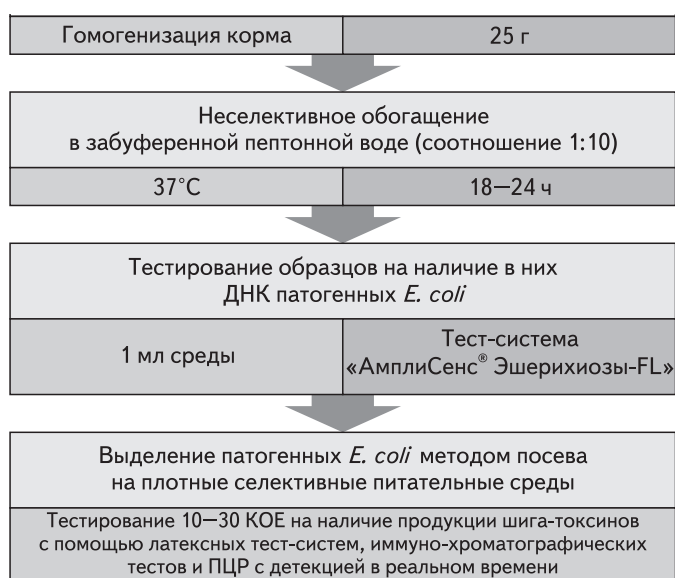


Рис. 4. Схема выделения патогенных эшерихий из кормов



Рис. 5. Схема выделения патогенных иерсиний из кормов

чень показателей с учетом требований соответствующих директив ЕС, включив в него определение более широкого спектра патогенных микроорганизмов, в том числе энтерогеморрагической (ЕНЕС) *E. coli* O157 и серологических групп ЕНЕС, не относящихся к типу O157 (O26, O103, O111, O117, O145).

Четвертое. Учитывая способности некоторых энтеробактерий вызывать тяжелые заболевания у людей и быть обитателем желудочно-кишечного тракта животных без проявления патологических процессов, необходимо пересмотреть методы определения факторов патогенности эшерихий и иерсиний, выделенных из кормов.

Литература

1. Лабораторный контроль безопасности кормов в Российской Федерации / В. И. Белоусов [и др.] // Ученые записки казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. — 2019. — Т. 240. — № 4.
2. Васильев, Д. А. Выделение и изучение биологических свойств бактерий рода *Proteus* / Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, С. Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. — 2017. — 70. — № 5.
3. Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных : утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 15.07.1997 № 13-7-2/1010 : ред. от 06.05.1999.
4. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Горизонтальный метод обнаружения *Escherichia coli* O157 : ГОСТ 32011-2013 (ISO 16654:2001).
5. О Регламенте предоставления информации в систему государственного информационного обеспечения в сфере сельского хозяйства : Приказ Минсельхоза РФ от 02.04.2008 № 189.
6. Правила бактериологического исследования кормов / Главное управление ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР. — М. : Колос, 1976.
7. Fairbrother, J. M. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals / J. M. Fairbrother, E. Nadeau // Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. — 2006.
8. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals : Scientific opinion of the panel on biological hazards // The EFSA Journal. — 2008. — 720. — P. 1–84.
9. Multiple sources of *Escherichia coli* O157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA / D. D. Hancock [et al.] // Preventive Veterinary Medicine. — 1998. — 35. — P. 11–19.
10. Prevalence of selected microbial pathogens in processed poultry waste used as dairy cattle feed / J. S. Jeffrey [et al.] // Poultry Science. — 1998. — 77. — P. 808–811. ■