

нии 10^{-10} степени вызывают лизис бактериальной культуры. Высокоактивным является и фаг E.agglomeransУ - 10^{-8} . Среди изученных фагов бактериофаги 13 E.agglomeransМ обладают меньшей активностью - 10^{-7} . Проведение пассажей позволит увеличить активность выделенных бактериофагов.

Литература

1. Ворошилова Н.Н., Афанасьева Э.В., Баснакьян И.А. Закономерности взаимодействия бактериальной и фаговой популяций в биореакторе на примерах Enterobacter //Микробиология, 1995, 479 -484с.
2. Ганюшкин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. - Ульяновск, 1988.
3. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. - М., 1961.
4. Летиев К.Ю. К фаготипированию бактерий рода Enterobacter. //Вопросы теоретической и клинической медицины. - Нальчик; 1993, с.70.

УДК 619:579

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ РОДА *KLEBSIELLA* И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В ПАТОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ

Е.А.Бульканова, С.Н.Золотухин, Е.Н.Митрохина

Клебсиеллы были открыты более чем 100 лет назад немецким исследователем Е. Клебсом, который впервые обнаружил названных микроорганизмов, описал их патогенные свойства, но ему не удалось выделить бактерий в чистой культуре (Klebs E., 1875). Однако до последнего времени нет ясности в вопросе о наименовании этих бактерий, так как начало открытия клебсиелл длительное время связывается с именем Фридлендера (Friedlander C., 1882), который выделил из экссудата пневмонического очага больного, умершего от пневмонии, типичные микроорганизмы и описал их свойства. Поэтому в литературе клебсиеллы встречаются под названием “палочки Фридлендера” (Сидоров М.А., Скородумов Д.И., 1995; Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996).

Клебсиеллы были объединены в род *Klebsiella*, относящиеся к трибе *Klebsiella* по всем существующим классификациям энтеробактерий. В “Определителе бактерий Берги” (1974) представлено три вида: *K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae*. По последней классификации Берги (1997) род *Klebsiella* представлен четырьмя видами: *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. pneumoniae*. Последний вид в свою очередь подразделяются на 3 подвида: *pneumoniae*, *ozaenae*, *rhinoscleromatis*.

Клебсиеллы широко распространены в природе. Их обнаруживают в почве, пресной и морской воде, цветах, зёрнах, фруктах и овощах, промышленных стоках, древесине и т.д. Заболевание у людей и животных

регистрируются повсеместно. Представители данного рода считаются возбудителями заболеваний дыхательных путей, урогенитального тракта, мозговых оболочек, глаз, суставов и позвоночника, при различных гнойно-септических осложнениях, а также при острых желудочно-кишечных заболеваниях людей. Предложено рассматривать заболевания, вызываемые клебсиеллами, протекающие по типу острого сепсиса, как самостоятельную нозологическую единицу - клебсиеллез (Киселева и др., 1973, 1982, 1985; Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996).

Клебсиеллы являются возбудителями заболеваний и у животных. Наиболее часто заболевания у них вызывают представители вида *K. pneumoniae*. Так, его подвид *pneumoniae*, как и эшерихии, относящиеся к постоянной микрофлоре кишечника, может играть роль этиологического фактора при маститах, пневмониях, септицемиях коров, свиней, лошадей, обезьян, инфекционной диарееи молодняка животных. О выделении патогенных бактерий вида *K. pneumoniae* в отдельных хозяйствах при желудочно-кишечных заболеваниях телят сообщают Е.С. Воронин и др., (1989); Л.С. Каврук, (1994); С.Н. Золотухин и др., (2000).

Морфология

Род *Klebsiella* объединяет неподвижные, имеющие капсулу, грамотрицательные, не образующие спор палочки, неровно-овальной формы, длина и толщина которых колеблются от 0,6 до 6,0 мкм и от 0,3 до 1,5 мкм соответственно. Располагаются единично, парами, реже цепочками.

Характерной особенностью клебсиелл является способность образовывать капсулу. Клебсиеллы были первыми капсульными микроорганизмами, описанными среди энтеробактерий. Капсульные варианты клебсиелл обычно выделяются из патологического материала людей и животных. Однако после культивирования на питательных средах некоторые штаммы теряют способность к капсулообразованию, другие, наоборот, сохраняют её годами. Бескапсульные варианты могут восстанавливать капсулу на углеродосодержащих средах. Для получения чистой капсульной популяции Б.С.Киселева (1982) рекомендует применять методику селекции капсулы с пассированием через углеродосодержащие среды (глюкоза, сахароза), при контроле за чистотой популяции и степенью диссоциации в косо проходящем свете. Капсулу можно восстанавливать при пассировании клебсиелл через лабораторных животных (Slopes S., 1968., Weis R., 1981).

Ширина капсулы может достигать от 0,3 до 1,27 мкм, длина – от 0,6 до 6 мкм (Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996). При размножении клебсиелл капсула не делится, поэтому несколько клеток могут иметь общую капсулу. Для определения капсул существует много методов ок-

раски. Лучшие результаты для негативного окрашивания капсул дает простой способ окрашивания препаратов тушью.

Дифференцирующие признаки бактерий рода Klebsiella

Тест или суб-страт	K. oxy- loca	K. plan- ticola	K. pneumoniae (подвиды)			K. terri- gena
			ozaenae	pneumoniae	rhino- scleromatis	
Образование индола	+	±	-	-	-	-
Реакция с метиловым красным	+	+	+	± (чаще-)	+	±
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	+	-	+	-	+
Цитрат Симмонса	+	+	+	+	-	4-
Гидролиз мочевины	+	+	-	+	-	-
Утилизация малоната	+	+	-	+	+	+
Ферментация Дульцита (K)*	+	± (чаще-)	-	±	-	± (чаще-)
Ферментация лактозы (K)	+	+	±	+	-	+
Ферментация муката (K)	+	+	± (чаще-)	+	-	+
Ферментация Лактозы (Г)**	-	-	+	+	+	-
Рост при 10°C	+	+	-	-	-	+

*Кислотообразование

**Газообразование при 44°C.

Клебсиеллы факультативные анаэробы. Все виды клебсиелл хорошо растут на простых мясных средах в широком диапазоне температур (от 4 до 43°C), оптимальная температура 35-37°C при pH – 7.2. Непременной особенностью клебсиелл считают пышный рост и образование на плотных питательных средах больших, выпуклых, часто сливающихся колоний слизистой консистенции. На агаре Эндо образуют часто красные и розовые слизистые колонии с металлическим блеском или без него, на агаре Плоскирева - красные, розовые или бесцветные колонии, на агаре Мак-Конки – красные или розовые, на ЭМС-агаре и среде Левина – темно-синие с металлическим блеском колонии.

Клебсиеллы способны образовывать гладкие и шероховатые формы колоний:

- гладкие формы (МКО—мукоидные, капсульные с О-антигеном; КО—немукоидные, капсульные с О-антигеном; МО—мукоидные бескапсульные с О-антигеном; О-немукоидные, бескапсульные с О-антигеном);

- шероховатые формы (МКR—мукоидные, капсульные, без О-антигена; KR—немукоидные, капсульная, без О-антигена; MR—мукоидная, бескапсульная, без О-антигена; R—немукоидная, бескапсульная, без О-антигена).

В жидких средах рост капсульных вариантов сопровождается равномерным помутнением, слизистым осадком и пленкой на поверхности бульона. Бескапсульные R-формы бактерий образуют гранулированный осадок с чистой и незамутненной надосадочной жидкостью. Растут на средах с цианистыми солями.

Биохимические (ферментативные) свойства

Клебсиеллы являются более ферментативноактивными представителями семейства энтеробактерий и утилизируют многие субстраты.

Основным дифференциальным признаком является то, что клебсиеллы используют цитраты в качестве единственного источника углерода. Ферментируют большое число углеводов с выделением газов, в том числе: лактозу, глюкозу, сахарозу, седонит, инозид и гидролизуют мочевины. Протеолитическая активность клебсиелл выражена в слабой степени – сероводород не образуют, а также, в отличие от эшерихий, клебсиеллы не выделяют индол. Исключение составляет *K. oxytoca* – индол образующая.

При этом они не разжижают желатин, образуют газообразование в лактозо-желчно-солевом бульоне при температуре 44°C, а также используют гидроксил бензойную кислоту в качестве единственного источника углерода.

Установлено специфическое свойство только для клебсиелл – цветная реакция с 5-аминосалициловой кислотой в питательной среде (Соволодский Е.П., Ровнов Н.В., Петров Л.И., 1994). Данная реакция была положительна у всех исследованных авторами видов клебсиелл.

Патогенность

Эпизоотологические и эпидемиологические штаммы клебсиелл, особенно респираторного происхождения, высоко вирулентны для мышей, куриных эмбрионов.

Факторы патогенности микроорганизмов разделены на три группы:

- определяющие взаимодействие возбудителя с эпителием “воротами инфекции”;

- устойчивость микроорганизмов к гуморальным и клеточным факторам защиты макроорганизма;

- способность продуцировать токсины и токсические продукты.

Адгезивные свойства *K. pneumoniae*, связаны с наличием у бактерий фимбриальных структур или ресничек (Constable F.L., 1956; Duguid J.P., Gilies R.R., 1958). Наличие фимбрий часто коррелируется с гемагглютинирующей способностью бактерий. По данным J.P. Duguid и др. (1979), разные штаммы клебсиелл могут синтезировать четыре различных типа гемагглютининов. Фимбрии (реснички) представляют собой нитевидные выросты, исходящие из цитоплазмы и располагающиеся на поверхности клеток. На одной бактериальной клетке может быть расположено несколько сотен фимбрий (Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996).

Фактором патогенности, подавляющим гуморальные и клеточные факторы защиты хозяина, обнаруженные у клебсиелл, является полисахаридная капсула (по её антигенному составу обнаружено более 70 сероваров), которая защищает их от действия комплементсвязывающих веществ и фагоцитоза.

У различных штаммов клебсиелл выявлены термолabileльные и термостабильные токсины:

- термо- и кислотостабильный токсин, который активирует систему “гунинал циклаза-цГМФ”, по структуре и механизму действия аналогичен термостабильному энтеротоксину эшерихий;

- термолabileльный токсин инактивируется при температуре 100-120°C, проявляет цитотоксическое действие и способствует проникновению возбудителя в кровотоки.

Антигенная структура и серологическая идентификация

Клебсиеллы, как и другие представители энтеробактерий, имеют капсульные K-, соматические O- и R-антигены. Кроме этого, как антигенный компонент рассматривают некоторые исследователи у клебсиелл слизистое образование клетки – M-антиген (Edwards P., Fife M., 1955). Наличие двух отличимых друг от друга капсульных антигенов впервые продемонстрировал в 1915 году E. Toeniessen. Серологическую идентификацию клебсиелл проводят на основе определения в первую очередь K-антигенов. Это связано с тем, что свежeweделенные культуры обладают капсулой, которая полностью экранирует O-антиген бактерий. При получении бескапсульных форм для определения O-антигена часто образуются шероховатые варианты (Kauffmann F., 1966. Edwards P.R., Ewing W.H., 1972). В настоящее время у клебсиелл изучено более 80-ти K-антигенов. K-антигены по химическому составу представляют собой кислые полисахариды, построенные из отдельных сахаров и связанных между собой гексурановых кислот, в основном глюкорановых, реже – галактоурано-

вых (Weis R., 1981). Антигенные свойства К-антигенов близки по термостойкости к О-антигенам, их агглютинабельность и агглютиногенность нарушается лишь при автоклавировании при температуре 120°C в течение 2,5 часов, а адсорбционная способность при 121°C за тот же период времени (Красноголовец В.Н., Киселева Б.С., 1996). О-антигены представляют собой липополисахаридо-протеиновый комплекс. Исследования О-антигенов клебсиелл сопряжены с рядом трудностей, связанных с большим количеством О-антигенов, по сравнению с К-антигенами, с термостабильностью капсулы, а также с большим количеством К-антигена при одном О-антигене.

Устойчивость во внешней среде

На обычных питательных средах клебсиеллы, несмотря на их известную устойчивость, склонны к диссоциации и довольно быстро могут погибнуть, но во внешней среде обладают высокой устойчивостью. Клебсиеллы обнаружены в почвах пустынь, в воде антарктического озера, в древесине лесных деревьев и стоках текстильного производства, в сахарном тростнике и т.д. Такое широкое повсеместное распространение клебсиелл называют экологической загадкой, и связано оно, по-видимому, с особыми биологическими свойствами микроорганизмов – наличием капсулы, которая, вероятно, обеспечивает их устойчивость ко многим факторам окружающей среды. При комнатной температуре клебсиеллы сохраняются неделями и месяцами. В пробах пыли, взятой при различной степени влажности, они сохраняются до 2,5 лет (Gunderman K.O., 1972). Сокращение периода выживания наблюдается при постоянной температуре (25°C) и повышенной влажности пыли (до 53-86%). Нагревание при 65°C вызывает гибель бактерий в течение одного часа.

Об устойчивости клебсиелл к низким температурам свидетельствует тот факт, что их, как единственных представителей семейства энтеробактерий, удалось обнаружить в воде Антарктического озера. Выделенные из воды и из организма больных диареей полярников штаммы клебсиелл могли расти при температуре от +4° до +45°C. При этом культуральные и ферментативные свойства у вышеупомянутых культур микроорганизмов проявлялись одинаково как при +37°, так и при +4°C (Киселева Б.С. и др., 1987). Эти особенности позволили авторам считать клебсиелл факультативными психрофильными бактериями.

Т.З. Артемова, Б.С. Киселева (1983) сообщают о повышенной устойчивости клебсиелл в сравнении с эшерихиями к некоторым дезинфектантам, ультрафиолетовому облучению. Чувствительны к действию хлорамина, фенола, цитраля и других дезинфицирующих веществ.

Как и другие патогенные энтеробактерии, штаммы клебсиелл, выделенные от больных или павших животных, обладают полирезистентно-

стью ко многим антибиотикам (Воронин Е.С. и др., 1989; Золотухин С.Н. и др., 2000).

В.Н. Красноголовец и Б.С. Киселева (1996), В.И. Покровский и др., (1999), С.Н. Золотухин и др., (2000) сообщают об устойчивости клинических штаммов клебсиелл к пенициллину, левомицитину, тетрациклину, эритромицину, карбециллину; относительной чувствительности к некоторым гликозидным преапаратам: гентамицину, тромбамицину, сизомицину, амикацину, неомицину, мономицину, рифампицилину, (некоторые штаммы – к ампицилину). Авторы наблюдали слабую чувствительность клебсиелл к полимиксину В, цефалотину, цефалоридину и канамицину.

Устойчивость клебсиелл к антибиотикам связывают с R-плазмидой, потеря которой может происходить за небольшой срок пассирования в бульоне. Этот факт следует учитывать при изучении чувствительности к антибиотикам выделенных штаммов, которое следует проводить у свежевыделенных изолятов, избегая излишнее количество пассирований (Disk-gieser N. 1980).

Литература

1. Воронин Е.С., Дервишов Д.А. и др. Этиология и профилактика желудочно-кишечных заболеваний телят. // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1989. - №9. С.105-110.
2. Каврук Л.С. Методические указания по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями, утверждённые Департаментом ветеринарии 11 октября 1999 года.
3. Красноголовец В.Н., Киселёва Б.С. Клебсиеллёзные инфекции. – М.: Медицина, 1996.
4. Определитель бактерий Берги М., 1997.
5. Покровский В.И. Медицинская микробиология. – М., 1999.
6. Сиволодский Е.П., Ровнов Н.В, Петров Л.Н. Механизм специфической хромогенной реакции *K. Spp.* на питательной среде с 5-аминосалициловой кислотой. // Микробиология, 1994. №.3 С.489-494.

УДК 619 : 579

ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ РОДА *KLEBSIELLA* ИЗ СТОЧНЫХ ВОД

Е.А.Бульканова, С.Н.Золотухин

Бактериофаг – вирус, способный инфицировать бактериальную клетку, репродуцироваться в ней, образуя многочисленное потомство, и вызывать ее лизис, сопровождающийся выходом фаговых частиц в среду обитания бактерий (Гольдфарб Д.М., 1961). Начало изучения бактерио-