УДК 576.842.1/.2 (035)

ПАТОГЕННИЙ ПОТЕНЦІАЛ *RAHNELLA AQUATILIS*: ДОСЛІДЖЕННЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ, ЯКІ ВІДПОВІДАЮТЬ ЗА ЗДАТНІСТЬ РАХНЕЛ КОЛОНІЗУВАТИ ТРОПНІ ТКАНИНИ ОРГАНІЗМУ ГОСПОДАРЯ

Похил С.І.
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України,
(м. Харків)

Вступ

В 2006 році виповнилось тридцять років з часу першого описання *Rahnella aquatilis* як нового виду родини Enterobacteriaceae [1, 2]. За цей період досягнуті значні успіхи у вивченні географії розповсюдження і осередків життєдіяльності цих мікроорганізмів [1, 2, 3, 4], досліджений широкий спектр їх біологічних властивостей [5, 6], доведена етіологічна роль рахнел в патології людини [5, 7], розроблені методи та критерії лабораторної діагностики рахнельозів, тощо [8, 9, 10]. Однак, і до теперішнього часу, за виключенням ендотоксичних ліпополісахаридів (ЛПС) [11, 12, 13, 14], фактори патогенності (ФП) і вірулентний потенціал (ВП) рахнел залишаються не з'ясованими. Існує декілька принципів системного групування ФП для їх вивчення у бактерій. В теперішній час найпоширенішими є принципи "класифікації" (системного групування) ФП на основі їх хімічної природи (білки, полісахариди, глікокон'югати, ліпопротеїни, фосфатиди, фосфопротеїни, інші хімічні групи) [15] або на основі функціональної ролі, яку відіграють ФП в розвитку інфекційного процесу при бактеріозах [16, 18]. Як правило, дослідження наявності і встановлення функціонального значення ФП передує детальному вивченню їх хімічної структури. Відомо чимало "функціональних класифікацій" ФП [17, 18, 19, 20]. Проте, на нашу думку, їх відмінності носять методологічно-традиційний характер і не мають принципового значення, так як одні й ті ж структурні елементи клітин збудника, чи утворювані ними ферменти можуть мати (і мають) декілька аспектів патогенного впливу, що дозволяє одночасно віднести їх до різних функціональних груп ФП. Можливо тому, науковцями частіше застосовується найпростіша функціональна класифікація ФП, у відповідності з якою останні ділять на три групи: група 1 - ФП, які визначають здатність збудника активно знаходити, прикріплятися, колонізувати і здійснювати інвазію в тропні тканини організма-господаря; група 2 - ФП, які забезпечують здатність збудника захворювання протистояти гуморальним і клітинним факторам захисту організма-господаря і розмножуватись в ньому (in vivo); група 3 – ФП збудника, які спричинюють розвиток патологічних процесів (специфічних і неспецифічних), характерних для перебігу захворювання [20].

Метою цієї роботи було визначення наявності у референтних та свіжовиділених штамів *R. aquatilis* факторів патогенності (ФП), які забезпечують здатність мікроорганізмів віднаходити, прикріплятися і колонізувати тропні тканини організму господаря: дослідження здатності до позитивного хемотаксису (активної синхронізованої направленої рухливості) по відношенню до нових осередків колонізації; ферментативної активності яка спрямована на розщеплення біосубстратів, що покривають клітини-мішені тропних тканин (наприклад, біокомпонентів слизу, який покриває епітеліальні клітини слизових оболонок); здатності до адгезії на клітинах організму господаря; антагоністичної (по відношенню до нормальної – індигенної мікрофлори) та антилізоцимної активності.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 24 штами *R. aquatilis*, із них: 4 референтні штами (ATCC 33071 – типовий штам, ATCC 33989, 2-87, 3-88) [3] отримані від доктора Odile Berge із Equipe d'ecologie microbienne de la rhizosphere (EMIR), Centere de pedologie biologie, UPR 6831 du CNRS, associee a l'universite Nancy I (BP 5, F-54501 Vandoeuvre-les-Nancy CEDEX, France), а інші 20 культур були виділені автором на території України із ґрунту, води відкритих водойм (10 штамів) [6] та із випорожнень хворих на гостру кишкову інфекцію (10 штамів) [21].

Для вирощування рахнел використовували звичайні поживні середовища: 2%-й м'ясо-пептонний агар (МПА) і м'ясо-пептонний бульйон (МПБ) виробництва Державного експериментального заводу медичних препаратів (м. Київ). ФП досліджували у штамів *R. aquatilis*, вирощених при різних температурних режимах: (25±0,5) ^{o}C і (37±0,5) ^{o}C.

Здатність рахнел до позитивного хемотаксису визначали пластинчатим методом (на 0,3%-му агаризованому середовищі) в умовах стабільного градієнта кисню та перемінного градієнта окислювального субстрату-атрактанту (D-глюкоза, D-галактоза, L-аспарагін, цитрат Na) [22]. Ці дослідження доповнювались вивченням, із використанням загальноприйнятого для ентеробактерій методу [23], рухливості культур та оцінкою наявності джгутиків у клітин рахнел при просвічуючій електронній мікроскопії (електронний мікроскоп УЕМВ-100Б) з негативним контрастуванням препаратів 2%-им розчином фосфорно-вольфрамової кислоти (ФВК) або 1%-им розчином уранілацетату (УРА) [29].

Для оцінки властивостей рахнел розщепляти слиз та інші біосубстрати, які покривають епітеліальні клітини слизових оболонок, у штамів визначали протеїназну (методом казеїнового-агарових пластинок) [24, 25], нейрамінідазну (методом гальмування вірусної гемаглютинації) [25], лецитиназну активність (методом жовтково-агарових пластинок) [26].

Здатність до адгезії штамів рахнел досліджували методом гемадгезії (в якості моделі клітин організму господаря використовували еритроцити людини групи крові I (0), Rh(+)) [27]. При цьому, оцінку середнього показника адгезії (СПА), коефіцієнта участі еритроцитів у адгезивному процесі (КУЕ) та індексу адгезивності мікроорганізмів (ІАМ) проводили за критеріями [28]. Наявність фімбріальних структур у рахнел визначали методом просвічуючої електронної мікроскопії, як описано раніше [29].

Антагоністичні взаємовідносини між рахнелами та іншими бактеріями різних таксономічних груп, які є облігатними представниками мікроценозу кишечнику [37] вивчали: методом відстроченого антагонізму в тесті з двошаровим агаром (після знезараження парами хлороформу макроколоній штамів-продуцентів бактеріоцинів на нижньому шарі 2%-го МПА наносили верхній шар 0,7%-го агару з індикаторною культурою) для виявлення дії бактеріоцинів [30, 31]; пластинчатим методом (на 0,3%-му агаризованому середовищі в умовах стабільного градієнту кисню та перемінного градієнту мікробних метаболітів) здатність рахнел та інших, антагоністичних по відношенню до них бактерій, до негативного хемотаксису як прояву захисної реакції на дію метаболітних репелентів мікробного ґенезу [32].

Антилізоцимну активність у штамів рахнел визначали методом відстроченого антагонізму в тесті з двошаровими агаровими пластинками [33]. При цьому в нижньому шарі 2%-го МПА, який слугував поживною підкладкою для вирощування макроколоній рахнел створювали перемінну концентрацію лізоцима від 1 мкг/мл до 100 мкг/мл, а верхній шар 0,7%-го МПА з 1% D-глюкози містив суспензію живої індикаторної культури *Micrococcus luteus* var. lysodeikticus 2665.

Фотографування результатів досліджень ФП рахнел здійснювали цифровим фотоапаратом ”Olympus C-7070 wide Zoom” в умовах макрозйомки.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили у відповідності із правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики [34].

Результати та їх обговорення

При розвитку інфекційного процесу, позитивний хемотаксис у бактерій, як результат одного з універсальних адаптаційних механізмів (який дозволяє суттєво підвищити потенціал виживання мікроорганізмів в різних середовищах їх життєдіяльності), розглядається як ФП цих мікроорганізмів [16, 19, 22]. Прояви позитивного хемотаксису у бактерій є результатом складних ланцюгових процесів в їх енергетичному і пластичному обміні, що супроводжується вираженими структурними та функціональними змінами в клітинах мікроорганізмів, які вдається виявити при їх дослідженні. Результати наших експериментів дозволили встановити чітку закономірність щодо позитивного хемотаксису у рахнел. Всі 24 штами *R. aquatilis* проявляли позитивний хемотаксис в напрямку зростання градієнту D-глюкози, D-галактози, L-аспарагіна і цитрата Na за умови культивування висівів при t^o=(25±0,5) ^{o}C (рис. 1-А,Б). При цьому, просторові структури, утворювані клітинами рахнел, є однотипними і цілком відповідають аналітичним (математичним) моделям [35]. Однак, при відтворенні тих самих тестів при t^o=(37±0,5) ^{o}C жодний із взятих в експеримент штамів рахнел не проявив позитивного хемотаксису по відношенню вказаних енергозабезпечуючих інгредієнтів. Очевидно, що втрата при t^o=(37±0,5) ^{o}C здатності рахнелами до позитивного хемотаксису пов’язана із припиненням утворювання у них джгутиків при збереженні відповідних типів хеморецепторів. Це підтверджують результати дослідження рухливості культур рахнел при t^o=(25±0,5) ^{o}C і t^o=(37±0,5) ^{o}C, їх здатність ферментувати в обох температурних умовах D-глюкозу, D-галактозу, L-аспарагін і цитрата Na та дані електронної просвічуючої мікроскопії препаратів клітин рахнел, вирощених при t^o=(25±0,5) ^{o}C і t^o=(37±0,5) ^{o}C. Вирощувані нами штами рахнел були рухливими при t^o=(25±0,5) ^{o}C, а при t^o=(37±0,5) ^{o}C втрачали цю здатність. Навпроти, всі культури рахнел при обох температурних режимах ферментували всі вищезазначені інгредієнти (результат тесту ставав позитивним через 14-16 годин інкубування посівів). Раніше, автори [3] з допомогою просвічуючої електронної мікроскопії засвідчили наявність джгутиків у штамів *R. aquatilis*, вирощених в LB-бульйоні при t^o=(24-28) ^{o}C.

Ми ж, використавши той самий метод мікроскопії показуємо, що у клітин рахнел, вирощених на 0,7%-му МПА або МПБ при t^o=(37±0,5) ^{o}C джгутики відсутні (рис. 2-А,В).

При дослідженні здатності рахнел розщепляти компоненти слизу, який покриває епітеліальні клітини слизових оболонок, було встановленою що всі 24 штами *R. aquatilis* не володіли лецитиназною активністю, проявляли слабку протеїназну та нейромінідазну активності.

Зони протеїнолізису (козеїнолізису) навкруги макроколоній рахнел були вузькими (0,5-2,0 мм) і відносно слабо вираженими. Хоча спостерігалась деяка гетерогенність між окремими штамами *R. aquatilis* щодо інтенсивності прояву козеїнолізису, достовірної відмінності за цією властивістю у групах штамів різного походження, не виявлено. Проте, відтворення тесту для виявлення протеїназної активності у рахнел при t^o=(25±0,5) ^{o}C забезпечувало дещо більш чіткі прояви козеїналізису, ніж при t^o=(37±0,5) ^{o}C.

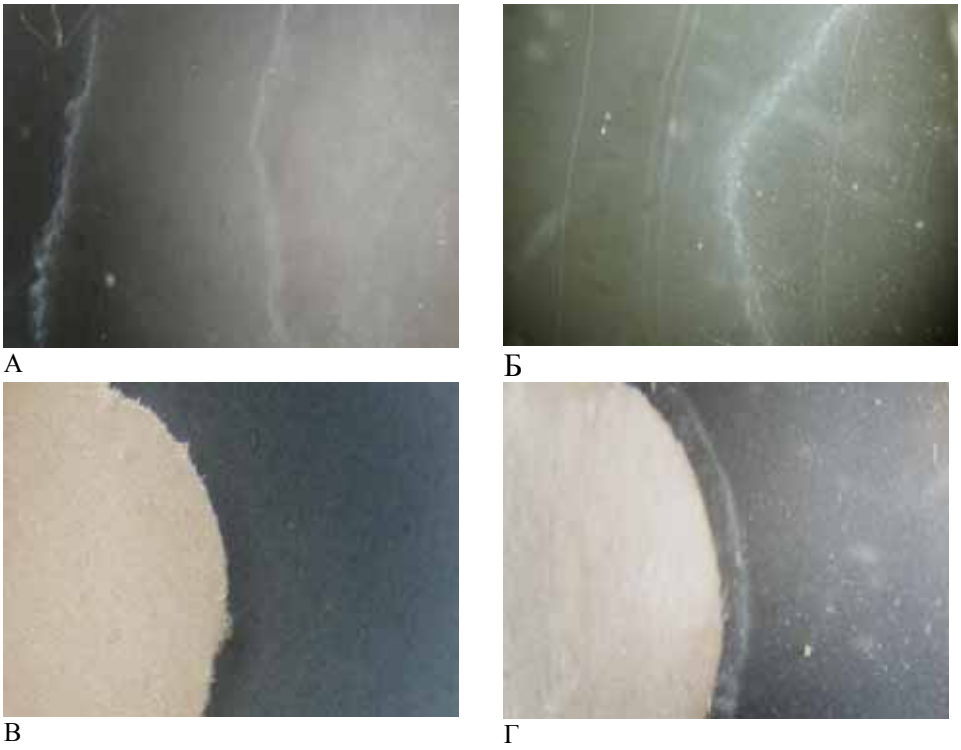

Рис. 1 - Мікрофотографії позитивного і негативного хемотаксису клітин бактерій, ×4 (пояснення в тексті): А – позитивний хемотаксис клітин *R. aquatilis* ATCC 33071 в градієнті (0,5% маса/об'єм) D-глюкози; Б – позитивний хемотаксис клітин *R. aquatilis* ATCC 33071 в подвійному градієнті (0,5% маса/об'єм) D-глюкози і D-галактози;В – відсутність негативного хемотаксису у клітин *E. coli* M-17 при дії екстацелюлярних метаболітів *R. aquatilis* ATCC 2-87; Г – негативний хемотаксис у клітин *E. coli* Row під впливом репелентів *R. aquatilis* 2-87.

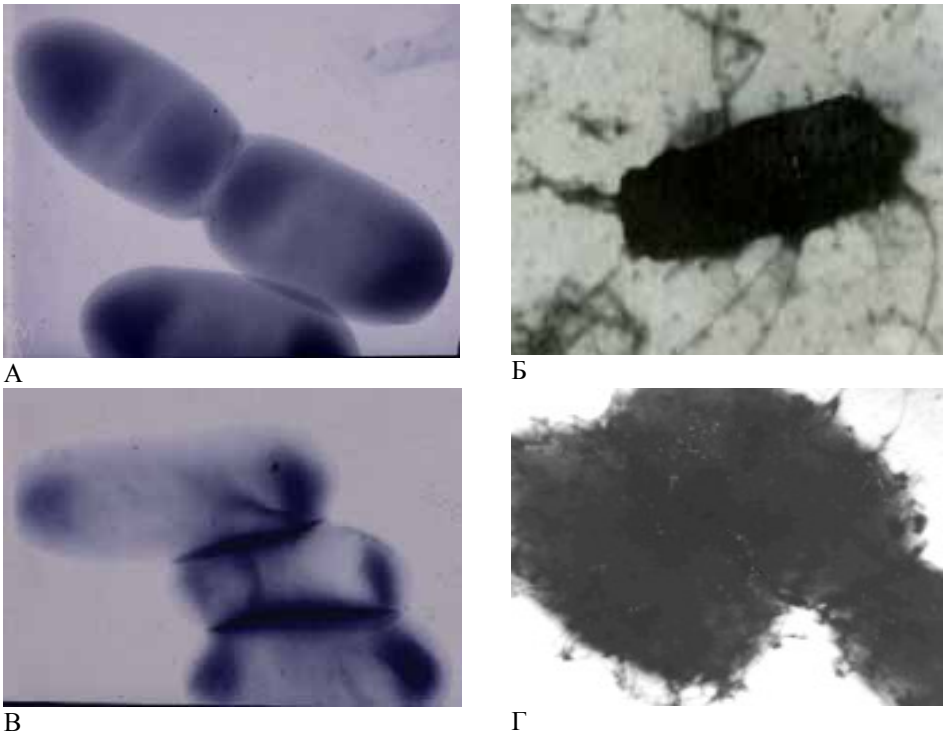

Рис. 2 – Електронні мікрофотографії клітин *R. aquatilis*, ×100000 (пояснення в тексті): А, В – штам *R. aquatilis* ATCC 33071 і 3-88, відповідно, вирощені при t^o=(37±0,5) ^{o}C, контрастування УРА. Б, Г – штам *R. aquatilis* ATCC 33071 і 3-88, відповідно, вирощені при t^o=(25±0,5) ^{o}C, контрастування ФВК.

Аналогічні закономірності було виявлено при дослідженні нейрамінідазної активності. Стерилізовані фільтруванням супернатанти усіх бульйонних культур *R. aquatilis*, які були вирощені при t^o=(25±0,5) ^oC і t^o=(37±0,5) ^oC, гальмували аглютинацію еритроцитів морської свинки (руйнуючи поверхневі рецептори цих клітин, які містять нейрамінові кислоти) при додаванні 1-ої гемаглютинуючої одиниці (ГО) грипозного діагностикуму типу А (Swine 1976/31). При умові внесення в реакційну суміш 2-ох ГО грипозного діагностикуму фільтрати лише 6-ти (25%) штамів *R. aquatilis* (серед них 1 – референтний, 3 – виділені із об'єктів оточуючого середовища і 2 – від людей хворих на кишкову інфекцію), вирощених при t^o=(37±0,5) ^oC, повністю гальмували гемаглютинацію. Вирощування штамів рахнел при t^o=(25±0,5) ^oC забезпечило зростання кількості фільтратів, які за вказаних умов гальмують гемаглютинацію, до 15-ти (63%) ($p<0,05$). Статистично достовірних відмінностей щодо рівня нейрамінідазної активності між групами штамів рахнел різного походження встановити не вдалося.

Результати вивчення гемадгезивної активності (ГА) штамів рахнел, вирощених при t^o=(25±0,5) ^oC і при t^o=(37±0,5) ^oC представлено в таблиці.

Як свідчать результати наших досліджень (табл.), бактерії виду *R. aquatilis* характеризуються високою адгезивністю незалежно від джерела виділення штамів. Навіть у референтних культур, які пройшли впродовж тривалого часу багаторазові пересіви в лабораторних умовах, показники СПА і ІАМ характерні для високоадгезивних бактерій [27, 28].

Таблиця – Гемадгезивна активність штамів *R. aquatilis*, вирощених при різних температурних режимах

Досліджено штамів	Показники гемадгезивної активності		
	СПА $\left(\overline{m} \pm \overline{d}\right)$	**КУЕ, %** $\left(\overline{m} \pm \overline{d}\right)$	**ІАМ** $\left(\overline{m} \pm \overline{d}\right)$
Референтних – 4, вирощених при			
t^o=(25±0,5) ^oC	5,3±1,0	67±7	7,9±0,7
t^o=(37±0,5) ^oC	3,5±0,4	61±5	5,8±0,8
Виділених із ґрунту та води відкритих водойм - 10, вирощених при			
t^o=(25±0,5) ^oC	7,8±0,9	62±7	12,6±1,3
t^o=(37±0,5) ^oC	3,9±0,6	54±7	7,2±0,9
Виділених із випорожнень хворих на гостру кишкову інфекцію – 10, вирощених при			
t^o=(25±0,5) ^oC	7,7±1,2	69±10	11,2±1,1
t^o=(37±0,5) ^oC	4,3±0,6	67±11	6,4±0,6

Чітко простежується зростання (в 1,4-2,0 рази) показників ГА у штамів рахнел за умов їх вирощування при t^o=(25±0,5) ^oC. Очевидно, це можна пояснити тим, що *R. aquatilis* є сапрофітними ентеробактеріями, здатними фіксувати молекулярний азот. Головним осередком їх життєдіяльності є відкриті прісні водойми, ризосфера злакових – пшениці, кукурудзи, рису, тощо [3, 4]. В умовах оточуючого середовища у багатьох бактерій відмічається активація адгезин-рецепторних взаємодій, що дозволяє їм активно колонізувати субстрати природних осередків життєдіяльності [19]. Автори [3] на прикладі штаму *R. aquatilis* ТРО1, виділеного із ризосфери кукурудзи і вирощеного в LB-бульйоні при t^o=(24-28) ^oC, показали утворення фімбрій, з наявністю яких пов'язується здатність бактерій до адгезії та самоагрегації [3, 16, 17, 18, 19]. Проведені нами електронно-мікроскопічні дослідження препаратів референтних штамів *R. aquatilis* ATCC 33071 і 3-88, підтвердили утворення у них фімбріальних структур при t^o=(25±0,5) ^oC і засвідчили відсутність фімбрій у клітин цих бактерій, вирощених на 0,7%-му МПА і МПБ при t^o=(37±0,5) ^oC (рис. 2-В,Г). Безфімбріальні клітини цих штамів зберігають високу ГА: у *R. aquatilis* ATCC 33071 показники ГА були - СПА (3,2±0,3), КУЕ (54±5), ІАМ (5,9±0,7); у *R. aquatilis* 3-88 - СПА (4,3±0,4), КУЕ (58±5), ІАМ (7,4±0,8). Вказані експериментальні дані підтверджують ймовірність відсутності фімбріосинтезу при збереженні утворення рецепторів гемадгезії безпосередньо на клітинній стінці бактерій. Це можливо при наявності в геномі рахнел відокремлених (навіть, близькозчеплених) із автономним механізмом експресії кластерів генів, які кодують синтез фімбрій та рецепторів адгезії [36].

При вивченні антагоністичних взаємовідносин між рахнелами і облігатними представниками мікроценозу кишечнику людини в перехресних дослідженнях методом відстроченого антагонізму, були протестовані клінічні і референтні штами: для виявлення продукції бактеріоцинів, які можуть пригнічувати ріст рахнел – *Escherichia coli* 25 штамів (в т. ч., 12 референтних штамів-продуцентів бактеріоцинів колекції П.Ф. Фредеріка (1955) [38] і штам *E. coli* М-17,

виділений із комерційного препарату "БИФИКОЛ СУХОЙ"), *Bacteroides* spp. 20 штамів, *Bifidobacterium* spp. 25 штамів (в т. ч. 2 штами *Bifidobacterium,* виділених із комерційних препаратів "БИФИКОЛ СУХОЙ" і "БИФИДУМБАКТЕРИН СУХОЙ"), *Lactobacillus* spp. 25 штамів (в т. ч. штам *L. acidophilus*, виділений із комерційного препарату "ЭКСТРАЛАКТ"), *Enterococcus* spp. 25 штамів (в т. ч. штам *E. faecium*, виділений із комерційного препарату "ЛИНЕКС"); для визначення чутливості до дії бактеріоцинів, які можуть продукувати рахнели (рахнелацинів) - *E. coli* 13 штамів (в т. ч. 4 референтних індикаторних штами колекції П.Ф. Фредеріка (1995) [38]), *Bacteroides* spp. 10 штамів, *Bifidobacterium* spp. 11 штамів (в т. ч. 2 штами *Bifidobacterium*, виділених із комерційних препаратів "БИФИКОЛ СУХОЙ" і "БИФИДУМБАКТЕРИН СУХОЙ"), *Lactobacillus* spp. 11 штамів (в т. ч. штам *L. acidophilus*, виділений із комерційного препарату "ЭКСТРАЛАКТ"), *Enterococcus* spp. 9 штамів (в т. ч. штам *E. faecium*, виділений із комерційного препарату "ЛИНЕКС"). Результати цих досліджень засвідчили, що ешеріхії, лактобактерії, ентерококи (навіть, референтні штами цих видів мікроорганізмів, які є відомими продуцентами бактеріоцинів і входять до складу комерційних препаратів пробіотиків) не виявляли антагоністичної (пригнічуючої) дії на рахнели. Навпроти, 75% протестованих штамів біфідобактерій подавляли ріст від 21% до 100% взятих в експеримент штамів *R. aquatilis*. Зони пригнічення росту рахнел, які формуються навкруги макроколоній біфідобактерій, були різної ширини (від 5 мм до 19 мм) і морфології: від малопрозорих до повністю прозорих, з чіткими або розмитими краями. Обидва штами *Bifidobacterium,* які входять до складу комерційних препаратів пробіотиків ("БИФИКОЛ СУХОЙ" і "БИФИДУМБАКТЕРИН СУХОЙ") проявляли антагоністичну дію до всіх 24-х протестованих штамів *R. aquatilis*, при цьому 62,5% результатів тестів були оцінені як прояв сильної, а 37,5% - як помірної або слабкої антагоністичної активності.

Тестування культур *R. aquatilis* щодо їх здатності продукувати рахнелацини, які можуть подавляти ріст бактерій інших таксономічних груп, дозволило отримати ряд нових даних. Рахнели не проявляли антагоністичної дії відносно лактобактерій і ентерококів. Однак, всі досліджені штами *R. aquatilis* пригнічували ріст 46,2% штамів ешеріхій, в т. ч. і 2-х індикаторних штамів колекції П.Ф. Фредеріка - *E. coli* Row і B. A штам *E. coli* M-17, який входить до складу багатьох комерційних пробіотичних препаратів, виявився нечутливим до дії екстрацелюлярних метаболітів рахнел. Останні були здатні пригнічувати ріст 18,2% взятих в експеримент культур біфідобактерій. Штами *Bifidobacterium* spp., виділені із комерційних препаратів пробіотиків, як і переважна більшість бактерій цього виду, не подавлялись рахнелами в тесті відстроченого антагонізму. Зони пригнічення росту ешеріхій і біфідобактерій були різного розміру (при використанні в якості індикаторних бактерій ешеріхій ці зони були значно ширші (10-21 мм), ніж при використанні біфідобактерій (5-11 мм)), але мали подібну морфологію. Остання характеризувалась відсутністю чіткої межі і поступовим зменшенням ефекту пригнічення індикаторної культури в напрямку від макроколоній рахнел. Подібність проявів антагоністичної активності всіх протестованих штамів рахнел відносно чутливих культур ешеріхій та біфідобактерій, свідчить про ймовірність продукування рахнелами однотипних екстрацелюлярних метаболітів, які обумовлюють цю активність.

При дослідженні негативного хемотаксису у рахнел під впливом репелентів мікробного ґенезу використовували ті ж самі штами бактерій, що й при виявленні бактеріоциногенії.

Аналіз результатів експериментів із вивчення негативного хемотаксису, як однієї із форм прояву антагоністичних взаємовідносин між рахнелами та облігатними представниками мікроценозу кишечнику людини показав, що в усіх випадках, коли були виявлені в тесті відстроченого антагонізму прояви дії біфідобактеріоцинів на рахнели, останні чітко демонструють негативний хемотаксис при умові відтворення тесту при t^o=(25±0,5) ^oC. Однак, слабо виражений негативний хемотаксис у рахнел спостерігався проти всіх взятих в експеримент штамів *Bifidobacterium*, навіть, і в тих випадках, коли в тестах відстроченого антагонізму не вдавалось виявити ознаки пригнічення росту рахнел екстрацелюлярними метаболітами біфідобактерій. Подібна закономірність була встановлена і в експериментах з виявлення здатності рахнел при t^o=(25±0,5) ^oC і t^o=(37±0,5) ^oC продукувати репеленти, які індукували негативний хемотаксис в усіх рухливих (84,6%) штамів *E. coli* (рис. 1-В,Г). Більш виразними прояви негативного хемотаксису були у тих штамів ешеріхій, які характеризувались високою чутливістю до дії рахнелацинів. Інші штами *E. coli*, які в тестах відстроченого антагонізму були визначені як нечутливі до дії рахнелацинів, демонстрували відносно слабшу реакцію негативного хемотаксису під впливом екстрацелюлярних метаболітів рахнел. Жодний із протестованих нами штамів лактобактерій, біфідобактерій і ентерококів не володів рухливістю в умовах вирощування при t^o=(25±0,5) ^oC і при t^o=(37±0,5) ^oC, тому вони не тестувались на здатність до негативного хемотаксису під дією репелентів рахнел. За результатами наших експериментів коефіцієнт асоціації К. Пірсона (r_a) [34] між проявами пригнічення росту мікроорганізмів внаслідок дії бактеріоцинів і наявністю негативного хемотаксису у штамів бактерій під впливом репелентів мікробного ґенезу складав r_A=0,56. Однак, ймовірно, що функцію репелентів можуть відігравати ті ж самі екстрацелюляторні метаболіти мікроорганізмів, які здатні проявляти бактеріоцинну активність, а тест на виявлення негативного хемотаксису є більш чутливим, у порівнянні із методом відстроченого антагонізму для встановлення дії бактеріоцинів.

Дане теоретичне узагальнення потребує окремого експериментального обґрунтування.

Антилізоцимна активність виявлена в усіх досліджених нами штамів *R. aquatilis* незалежно від їх походження. Всі культури інактивували лізоцим в концентрації від 1 мкг/мл до 15 мкг/мл. 41,7% штамів цих мікроорганізмів виявили здатність інактивувати лізоцим в концентрації 20 мкг/мл, а 2 штами (8,3%) – в концентрації 25 мкг/мл. Результати відтворення цих тестів були більш чіткими при t^o=(37±0,5) ^{o}C, ніж при t^o=(25±0,5) ^{o}C, що відображає більш оптимальні температурні умови для росту індикаторного штаму *M. luteus* var. lysodeikticus 2665 та, ймовірно, деяке зростання лізуючої активності самого лізоциму при зростанні температури у вказаних межах.

Висновки

1. У 24-х штамів *R. aquatilis* різного походження вперше досліджена наявність ФП, які забезпечують цим мікроорганізмам потенціал колонізувати тропні тканини організму господаря: здатність бактеріальних клітин до рух-ливості, позитивного і негативного хемотаксису; ферментативна активність щодо розщеплення мукоїдного шару слизових оболонок; адгезивні властивості; між мікробні антагоністичні взаємозв'язки із представниками облігатної мікрофлори кишкового тракту; антилізоцимну активність.
2. Незалежно від джерела походження, штами рахнел, вирощені при t^o=(25±0,5) ^{o}C мають джгутики і володіють рухливістю, що забезпечує їх здатність до позитивного та негативного хемотаксису під впливом енергозабезпечуючих антрактантів і екстрацелюлярних мікробних репелентів. Рахнели характеризуються високим рівнем адгезивності до еритроцитів людини. За допомогою електронної мікроскопії показана відсутність фімбрій у бактерій з вираженою гемадгезивною активністю, що підтверджує можливість автономного синтезу рецепторів гемадгезії та фімбріогенезу у цих мікроорганізмів. Рахнели проявляють низький рівень протеїназної і нейрамінідазної активності та не продукують лецитиназу. Антагоністичні взаємовідносини між *R. aquatilis* та іншими видами бактерій можуть бути результатом прояву бактеріоциногенії та негативного хемотаксису. Встановлено, що 75% досліджених штамів біфідобактерій подавляють ріст рахнел та індукують в останніх негативний хемотаксис. Навпроти, ешеріхії, лактобактерії та ентерококи такої дії не проявляли. Взяті в експеримент штами *R. aquatilis* пригнічували ріст близько 50% культур ешеріхій і стимулювали останніх до негативного хемотаксису та не виявляли антагоністичних властивостей відносно інших мікроорганізмів. Для рахнел характерна антилізоцимна активність, вони здатні інактивувати лізоцим в концентрації від 1 мкг/мл до 25 мкг/мл.
3. Інтенсивність прояву ФП у штамів *R. aquatilis* залежить від температурних умов вирощування та відтворення тестів для виявлення ФП. Встановлена загальна закономірність більш інтенсивної дії останніх (за винятком антилізоцимної активності) при t^o=(25±0,5) ^{o}C, ніж при t^o=(37±0,5) ^{o}C. Це свідчить про активний вплив терморегулювання на механізм експресії генетичних детермінант ФП і відображає особливості життєдіяльності рахнел як сапрофітних мікроорганізмів.

Література

1. Gavini F., Ferragut C., Lefebvre B., Leclerc H. Etude taxonomique d'enterobacteries apparrtenant ou apparentees au genre Enterobacter// Ann. Microbiol. Inst. Paster. -1976. -№127,B. –P. 317-335.
2. Izard D., Gavini F., Trinel P.A. Rahnella aquatilis, nouveau member de la famille des Enterobacteriaceae// Ann. Microbiol. Inst. Paster. -1979. -№130,A. –P. 163-177.
3. Berge O., Heulin T., Achouak W. et al. Rahnella aquatilis, a nitrogen-fixing enteric bacterium associated with the rhizosphere of wheat and maize// Ca. J. Microbiol. -1991. -№37.- P. 195-203.
4. el-Hendawy H.H., Osman M.E., Sorour N.M. Characterization of two antagonistic strains of Rahnella aquatilis isolated from soil in Egypt// Folia Microbiol. -2003. –Vol.48,№6. –P. 799-804.
5. Похил С.І., Корнієнко І.В., Похил С.В. Біологічні властивості та медичне значення бактерій Rahnella aquatilis// Вестник пробл. биол. и мед. -1996. -№4. –С. 129-140.
6. Похил С.И. Биологические свойства штаммов Rahnella aquatilis, изолированных в разных регионах// Мікробіол. журн. -1998. –Т.60,№ 3. –С. 31-36.
7. Tash K. Rahnella aquatilis bacteremia from a suspected urinary source//J. Clin. Microbiol. -2005. –Vol.43,№5. –P. 2526-2528.
8. Мікробіологічна діагностика рагнельозів (захворювань, спричинених Rahnella aquatilis). Методичні рекомендації МОЗ України, Укрмедінформпатент. –Харків, 1997. -17 с.
9. Похил С.І., Макій Н.П. Критерії етіологічного діагнозу гострих кишкових інфекцій, викликаних рагнелами// Інфек. хвороби. -1997. -№3. –С. 10-13.
10. Похил С.И. Бактериологическая диагностика заболеваний, вызванных Rahnella aquatilis// Клин. лаб. диагн. -1997. -№8. –С. 44-47.
11. Варбанец Л.Д., Остапчук А.Н., Похил С.И. Характеристика структурных компонентов липополисахаридов Rahnella aquatilis// Мікробіол. журн. -2004. –Т.66,№6.-С. 13-21.
12. Варбанец Л.Д., Остапчук А.Н., Винарская Н.В. Выделение и характеристика липополисахаридов Rahnella aquatilis// Мікробіол. журн. -2004. –Т.66,№2.-С. 25-34.
13. Остапчук А.Н., Варбанец Л.Д. Биологическая активность нативных и модифицированных липополисахаридов Rahnella aquatilis// Мікробіол. журн. -2004. –Т.66,№6.-С. 31-36.
14. Остапчук А.Н. Ліпополісахариди Rahnella aquatilis: структурно-функціональні дослідження: Автореф. дис. …канд. біол. наук. -Київ, 2005. -21 с.
15. Елинов Н.П. Химичекая микробиология. –М.: Высш. школа, 1989. -448 с.

16. Finlay B.B., Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited// Microbiol. Mol. Biol. Rev. -1997. –Vol.61,№2. –P. 136-169.
17. Clarke S.C., Haigh R.D., Freeston P.E., Williams P.H. Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen// Clin. Microbiol. Rev. -2003. -№16. –P. 365-378.
18. Wilson J.W., Schurr M.J., Leblanc C.L. et al. Mechanisms of bacterial pathogenicity// Postgrad Med. J. -2002, -№78. –P. 216-224.
19.Литвин В.Ю., Пушкарева В.И. Факторы патогенности бактерий: функции в окружающей среде// Журн. микроб., эпидемиол. и иммунобиол. -1994. –Авг.-сен. –С. 83-87.
20. Петровская В.Г., Бондаренко В.М. Роль хромосомы и ее взаимодействия с внехромосомными детерминантами в процессе генетического контроля патогенности бактерий// Мол. генетика, вирусол., микробиол. -1994. -№5. –С. 3-8.
21. Pokhil S.I. Microbiological characteristics of Rahnella aquatilis strains isolated from patients with diarrhea// Вісник СумДУ. -2001. –Т.32,№11. –С. 132-137.
22. Adler J. A method for conditions chemotaxis and use of the method to determine optimal conditions chemotaxis by Escherichia coli// J. Gen. Microbiol. -1973. -№4. –P. 77-91.
23. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями/ МОЗ СРСР. –М., 1984. – 142 с.
24. Агапова О.В., Бондаренко В.М., Полікарпов Н.А. и соавт. Ферменты патогенности клинических штаммов Klebsiella pneumooniae// Журн. микроб., эпидемиол. и иммунобиол. -1999. –№2. –С. 5-8.
25.Микитин В.М. Справ очник методов биохимической экспресс-индикации микробов. – Кишинев: Картя молдовеняскэ, 1986. -294 с.
26.Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования/ Под ред. О.М. Бюргера. -3-е изд., перераб. идоп. –М.: Медгиз, 1982. -464 с.
27.Брилмс В.И., Бриленс Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов// Лаб. дело. -1986. -№4. –С. 210-212.
28. Землянкина Л.П., Мартиненко Л.Д. Определение адгезивных свойств клебсиелл и их оценка// Лаб. дело. -1989. -№10. –С. 68-70.
29. Похил С.И., Смелянская М.В. Способ приготовления препаратов для электронно-микроскопического исследования фимбриональных структур бактерій// Клин. лаб. диагн. -№5. –С. 22-24.
30. Fredericq P. Colicines et colicinogenia// Ann. Inst. Pasteur. -1964. -№5. –P. 7-17.
31. Пагсли Э., Оудега Б. Методы исследования колицинов и колициновых плазмид.// Плазмиды. Методы: Пер. с англ./ Под ред. К. Харди. –М.: Мир, 1969. –С. 157-238.
32. Tso W., Adler J. Negative chemotaxis in Escherichia coli// J. Bacteriol. -1974. –Vol. 118, №2. –P. 560-576.
33. Бухарин О.В., Усвяцов Б.Я., Малышкин А.П., Немцова Н.В. Метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов// Журн. микроб., эпидемиол. и иммунобиол. -1984. –№2. –С. 27-28.
34. Лакин Г.Ф. Биометрия. –М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
35. Polezhaev A., Pashkov R., Lobanov A., Petrov I. Spatial patterns formed by chemotactic bacteria Escherichia coli// Int. J. Dev. Boil. -2006. –Vol. 50. –P. 309-314.
36. Current topics in microbiology and immunology. Bacterial adhesins/ Edited by K. Jann and B. Jann. – Springer-Verlag Berlag Berlin-Heidelberg, 1990. –Vol. 151. -209 p.
37. Лабораторные тесты, микробиологическая и вирусологическая диагностика. Справочник в трёх частях/ Под общ. ред. проф. М.Х. Турьянова. –М.: КАППА, 1995. –Вып. 9. -144 с.
38. Каталог штаммов всесоюзного музея патогенных бактерий. Выпуск первый// ГИСК им. Л.А. Тарасевича, ВНОМЭП им. И.И. Мечникова. – Москва, 1982. -266 с.

УДК 576.842.1/2(035)

ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ *RAHNELLA AQUATILIS*: ИССЛЕДОВАНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ, КОТОРЫЕ ОТВЕЧАЮТ ЗА СПОСОБНОСТЬ РАХНЕЛЛ КОЛОНИЗИРОВАТЬ ТРОПНЫЕ ТКАНИ ОРГАНИЗМА ХОЗЯИНА

Похил С.И.
Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова
АМН Украины (г. Харьков)

У исследованных 24-х штаммов *R. aquatilis* выявлены факторы патогенности, которые обеспечивают этим микроорганизмам потенциал для колонизации тропных тканей организма хозяина: высокая адгезивная активность; способность продуцировать экстрацеллюлярные метаболиты, обладающие бактериоцинным и реппелентным действием в отношении представителей облигатной микрофлоры кишечника человека; антилизоцимная активность. Штаммы *R. aquatilis* проявляли низкий уровень протеиназной и нейраминидазной активности и не продуцировали лецитиназу. Интенсивность действия факторов патогенности у *R. aquatilis* зависит от терморегулирования.

Ключевые слова: *Rahnella aquatilis,* факторы патогенности, колонизация тропных тканей.

U**DC 576.842.1/.2(35)**

PATHOGENIC POTENTIAL OF RAHNELLA AQUATILIS: THE STUDY OF PATHOGENS FACTORS BEING RESPONSIBLE FOR RAHNELLA ABILITY TO COLONIZE SUSCEPTIBLE TISSUES OF HOST ORGANISM

Pokhil S.I.
I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Academy of Medical Sciences of Ukraine (Kharkiv)

In 24 strains of *R. aquatilis,* there were revealed pathogens factors which provide these microorganisms with potential to colonize susceptible tissues of host organism: high adhesive activity; ability to produce extracellular metabolites having bacteriocinic and repellent activity to representatives of indigenic microflora of human intestine; antilysozyme activity. *R. aquatilis* strains showed low level of proteinase and neuroaminidase activity and did not produce lecithinase. Termoregulation effects on intensity action of *R. aquatilis* pathogens factors.
Key words: *Rahnella aquatilis*, pathogens factors, colonization of susceptible tissues.

УДК 576.842.1/.2 (035)
ПАТОГЕННИЙ ПОТЕНЦІАЛ *RAHNELLA AQUATILIS*: ДОСЛІДЖЕННЯ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ, ЯКІ ВІДПОВІДАЮТЬ ЗА ЗДАТНІСТЬ РАХНЕЛ КОЛОНІЗУВАТИ ТРОПНІ ТКАНИНИ ОРГАНІЗМУ ГОСПОДАРЯ
Похил С.І.
Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
АМН України (м. Харків)

У досліджених 24-х штамів *R. aquatilis* виявлені фактори патогенності, які забезпечують цим мікроорганізмам потенціал колонізувати тропні тканини організму господаря: висока адгезивна активність; здатність продукувати екстра целюлярні метаболіти, які володіють бактеріонинною і репелентною дією щодо представників облігатної мікрофлори кишечнику людини; антилізоцимна активність. Штами *R. aquatilis* проявляли низький рівень протеїназної і нейрамінідазної активності та не продукували лецитиназу. Інтенсивність дії факторів патогенності *R. aquatilis* залежить від терморегуляції.
Ключові слова: *Rahnella aquatilis,* фактори патогенності, колонізація тропних тканин.