

УДК 619:616-097.3

Яненко У.М., к.вет.н., ст.науковий співробітник ([ulyanakuzyk@yandex.ru](mailto:ulyanakuzyk@yandex.ru))<sup>©</sup>  
Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ

## ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ АНТИЛІЗОЦИМНОЇ АКТИВНОСТІ (АЛА) ПАСТЕРЕЛ, ЩО БУЛИ ІЗОЛЬОВАНІ ВІД РІЗНИХ ЕКОЛОГІЧНИХ НІШ

Досліджено антилізоцимну активність пастерел, що є одним із маркерів персистенції мікроорганізмів. Зроблено порівняння цієї характеристики епізоотичних ізолятів, виділених від різних об'єктів дослідження і музейних (ліофілізованих) культур. Встановлено, що показник антилізоцимної активності для однієї популяції мікроорганізмів має різні показники і залежить від умов перебування збудника в навколишньому середовищі.

**Ключові слова:** лізоцим, персистентність, пастерели.

Персистентність – це здатність патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів до виживання в організмі господаря [1], є однією з найважливіших проблем у регулюванні перебігу інфекційних процесів. Різновиди перебування збудника хвороби в організмі хазяїна безпосередньо пов'язані із властивістю мікроорганізмів до антилізоцимної активності, яка сприяє їх життєдіяльності. Від цієї властивості залежить перебіг хвороби в гострій, підгострій, хронічній та латентній формах. Найбільшу небезпеку становлять собою тварини, в організмі яких збудники хвороб циркулюють без прояву клінічних ознак за її життя (пастерелоносії)[2].

*P. multocida* сероварів А та D є збудниками ентероколітів та пневмоній сільськогосподарських тварин, тому потребують всебічного дослідження їх патогенних властивостей, а також пошуку методів їх виявлення і диференціації. Однією з суттєвих ознак патогенності та здатності до персистенції патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів у макроорганізмі є продукування бактеріями субстанцій, що інактивують фактори неспецифічного протиінфекційного захисту: лізоциму, комплементу, інтерферону, а також специфічного захисту – імуноглобулінів тощо [3]. Наявність у бактерій таких факторів як лізоцимна активність забезпечує їм селективні переваги росту і розмноження в живому організмі. Дослідження антилізоцимної активності (АЛА) дозволяє визначити рівень патогенності пастерел по відношенню до захисних сил організму. Антилізоцимну активність досліджують з метою аналізів методів лікування і прогнозування перебігу патологічного процесу, який обумовлений мікроорганізмами, що викликають дане захворювання.

Пошук засобів впливу на цю ознаку пастерел відкриває великі перспективи у профілактиці та терапії продуктивних тварин.

**Мета дослідження.** Виявлення антилізоцимної активності у епізоотичних ізолятів і музейних культур пастерел, що виділялись з різних екологічних ніш (хворих сільськогосподарських тварин, клінічно здорових тварин, кормів тваринного походження, бактеріально забрудненого ґрунту пасовищ та предметів догляду за тваринами).

**Матеріали та методи.** У досліді використали 42 епізоотичних культури пастерел, що були виділені з патологічного матеріалу, отриманого з господарств центрального та східного регіонів України від птиці (курчата, кури, голуби); с/г тварин (телята, поросята, дорослі свині); із кормів тваринного походження, продуктів забою та ґрунту.

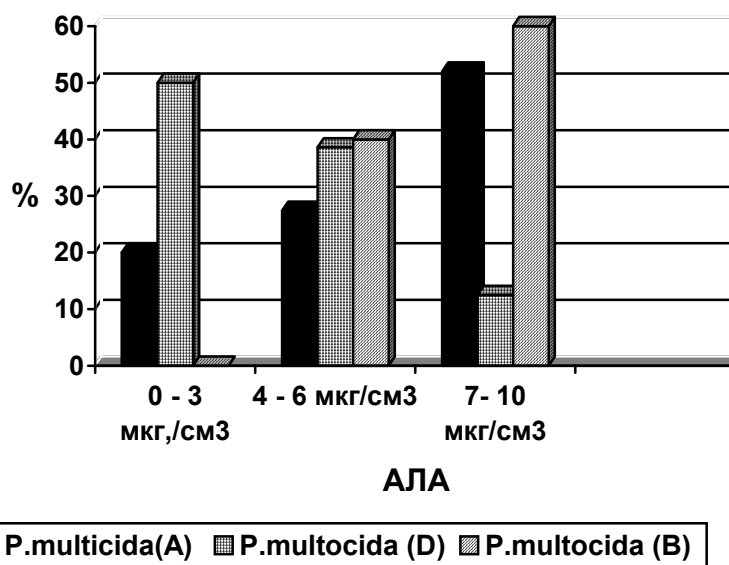
Паралельно з епізоотичними культурами було проведено визначення особливостей персистентної активності музейних, референтних штамів пастерел, які зберігаються в лабораторії ВСЕ.

Бактеріологічні дослідження проводили згідно з „Настановою з лабораторної діагностики пастерельозів тварин та птахів” [4] і включали в себе мікроскопію мазків та мазків-відбитків із патологічного матеріалу, культуральні (пасажування виділених культур на поживних середовищах (4–5 разів)) та вивчення біохімічних властивостей, трипанофлавінова проба, біопроби та серотипізації на білих мишах (за Каргером).

Антилізоцимну активність мікроорганізмів визначали чашечним методом відстроченого антагонізму за О. В. Бухаріним зі співавт. [5]. Дослідні штами засівали на чашки Петрі з 1,5 % - ним МПА, що містив лізоцим білка курячого яйця в різних концентраціях від 1 мкг/см<sup>3</sup> до 10 мкг/см<sup>3</sup>, на який точково, бактеріальною петлею, засівали 1млрд завис добової агарової дослідної культури мікроорганізмів. Контролем слугував МПА з додаванням стерильного фізрозчину замість лізоциму. Після культивування в термостаті за температури 37° С протягом 24 годин вирощені культури пастерел інактивували парами хлороформу впродовж 40 хв. і другим шаром наносили на всю поверхню чашки 0,7 % МПА з вмістом 1млрд. завису добової агарової індикаторної культури *Micrococcus luteus* ГИСК 2665. Визначення рівня АЛА проводили за наявністю або відсутністю росту тест-культури навколо дослідних колоній.

Для прискорення методу визначення АЛА пастерел нами був розроблений патент, в якому дефіцитний лізоцим замінили лісобактом (лізоцимом хлориду) [6].

**Результати дослідження.** При вивченні антилізоцимної активності дослідили 42 ізоляти пастерел, виділених з патологічного матеріалу тваринного походження, від птиці, кормів, продуктів харчування та об'єктів довкілля. Із них типувались як *P. multocida* серовару А – 24 ізоляти, як серовару В – 4 ізоляти, серовару D – 7 ізолятів, ще три штами *P. multocida* були музейними. Зведені дані про результати визначення антилізоцимної активності пастерел наведено у вигляді діаграми (рис.), і вони свідчать, що явище антилізоцимної активності притаманне всім дослідженим культурам. Показники антилізоцимної активності коливались у межах від 0 до 10 мкг/см<sup>3</sup>.



**Рис. Рівень АЛА досліджених культур пастерел**

Серед пастерел низький показник антилізоцимної активності від 0 до 3 мкг/см<sup>3</sup> виявили у 9 культур пастерел: 5 (20 %) культур *P. multocida* (A) і 4 (50 %) *P. multocida* (D), причому у цьому рівні не виявлено жодної *P. multocida* серовару В. Показник антилізоцимної активності, який вважали за середній, від 4 до 6 мкг/см<sup>3</sup> ( в середньому 4,5 мкг/см<sup>3</sup>), зафіксували у 12 культур: 7 (28 %) культур *P. multocida* (A), 2 (40%) *P. multocida* (B) і 3 (38,6 %) *P. multocida* (D). Високий показник АЛА від 7 мкг/см<sup>3</sup> до 10 мкг/см<sup>3</sup> ( в середньому 7,7 мкг/см<sup>3</sup>) спостерігали у 17 культур пастерел: 13 (52%) культур *P. multocida* (A), 3 (60%) *P. multocida* (B) і 1 (12,5 %) *P. multocida* (D). Середній показник значення антилізоцимної активності дослідженого виду мікроорганізмів становив 6,02 мкг/см<sup>3</sup>.

Низький рівень АЛА притаманний пастерелам, які перебувають тривалий час поза організмом тварини чи птиці, у кормах тваринного походження, ґрунті, тривале культивування музейних штамів. Середній рівень АЛА характерний для пастерел, що ізолювались від тварин з хронічним перебігом захворювання і від клінічно здорових тварин. Високий рівень АЛА властивий мікроорганізмам, що ізолювались при гострому і підгострому перебігу захворювання.

Результати досліджень вказують на залежність біологічних властивостей збудника від місця його виділення [7].

Представлені дослідження показали, що всі досліджувані культури мікроорганізмів володіли антилізоцимною активністю. Кількісна оцінка антилізоцимної активності показала, що мікроорганізми виділені від тварин із важким перебігом захворювання, характеризуються більш вираженою

властивістю інактивувати лізоцим, що виражалося вищою концентрацією інактивованого лізоциму, внесеного до середовища культивування. Так, середній рівень антилізоцимною властивості у штамів пастерел, виділених від поросят у яких клінічний прояв захворювання відсутній, був мінімальним і становив  $4,5 \pm 0,6$  мкг/см<sup>3</sup>. Більш високим він був у культур, ізольованих від хворих із хронічним ступенем перебігу захворювання –  $5,5 \pm 5,0 \pm 0,7$  мкг/см<sup>3</sup>. У культур, які були виділені від групи поросят і телят з підгострим перебігом захворювання, рівень експресії цього фактору персистенції був досить високим і становив  $8,14 \pm 0,3$  мкг/см<sup>3</sup>.

**Висновок.** Отримані дані підтверджують участь факторів персистенції пастерел у патогенезі пневмоній та ентероколітів поросят і телят, демонструють зв'язок біологічних властивостей збудника з характером перебігу інфекційного процесу. Нижча вираженість даної ознаки у мікроорганізмів при легкому перебігу захворювання відображає дисбаланс у системі паразит-господар і свідчить про незавершеність селекції штамів бактерій, здатних інактивувати лізоцим.

Висвітлений матеріал дає широкі перспективи використання АЛА як одного з маркерів персистенції в еколого-епідеміологічної, санітарно-гігієнічної і клінічної практиці, де необхідна всебічна оцінка біологічних властивостей взлужених культур пастерел.

#### Література

1. Биомолекулярные основы патогенности бактерий / Ю.В. Езепчук – М. : Наука, 1974. – С. 4-5.
2. Яненко У.М. Виявлення свиней-пастерелоносіїв за допомогою РНГА / У. М. Яненко // Науковий вісник Національного аграрного ун-ту. – 2000. – Вип. 28. – С. 228–230.
3. Сидорчук Л. І. Антилізоцимна активність провідних збудників хронічного уретриту / Л. І. Сидорчук// Буковинський медичний вісник. – Чернівці, 2009. – Т. 13. – № 2. – С. 45-48.
4. Настанова з лабораторної діагностики пастерельозів тварин та птахів / М. С. Павленко, В. М. Манченко, А. Ф. Ображей, А. І. Завірюха. – М., 1995. – 9 с.
5. Бухарин О. В., Васильев Н.В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. – Томск, 1974. – 209 с.
6. Спосіб визначення антилізоцимною активності бактерій *P. multocida* із використанням лісобакту (лізоциму хлориду). Патент на корисну модель № 40629. Україна. МПК(2009) C12N 1/00 У.М.Яненко. Заявл.18.07.2008; Опубл.27.04.2009, Бюл.№ 8.– 4с.
7. Фильчаков И. В. Персистенция бактерий: механизмы и иммунная реактивность организма/ И. В. Фильчаков, А. М. Зарицкий// Сучасні інфекції. – 2003. – № 3. – С. 71 – 82.

**Summary**

**Yanenko U.M.** PhD, leading scientist IVM NAAS of Ukraine

**THE INVESTIGATION OF ANTILYSOCIM ACTION LEVEL OF PASTEURELLA, ISOLATED FROM DIFFERENT ECOLOGICAL AREAS**

*It was conducted the investigation of antilysocimal action (ALA) of pasteurilla isolates. Thia feature counted as one of the microorganism's persistention marker. It was curried out the comparative characterization of ALA from different isolates from biomaterials and museum (lyophylisated) strains. It was stated what index of antilysocimal activity for the same population of the microorganisms had different level and it depended from environmental conditions impact on causative agent.*

**Key words:** lysocim, pathogenesity, escherichia, pasteurilla, salmonella

*Стаття надійшла до редакції 29.04.2011*