УДК 576.851.47.078.39

ЛЕЦИТІНАЗНА АКТИВНІСТЬ МІКРОБІВ, ЗДАТНИХ ДО РОЇННЯ (НА ПРИКЛАДІ БАКТЕРІЙ РОДУ *PROTEUS*)

Божко М.Г.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ», м. Харків

У патогенезі гнійно-запальних процесів усе більшого значення надається позаклітинним ферментним системам бактерій, які суттєво пригнічують захисні сили макроорганізму та підвищують агресивність патогену. До таких ферментів належать фосфоліпази. Вказані ферменти каталізують гідролітичне розщеплення фосфоліпідів, фосфоліпаза А діє безпосередньо на лецитин, у практиці мікробіології вона означена терміном лецитіназа.

На сьогодні чітко означено чотири види лецитіназ: A, B, C і D. Патогенні бактерії в більшості своїй продукують лецитіназу С, яка характеризується типовими властивостями бактеріальних токсинів, проявляє гемолітичну дію та антигенну активність. Розщеплюючи лецитін оболонки та мембран еукаріотних клітин на гліцерол, жирні кислоти, фосфорну кислоту та холін, цей фермент відіграє роль одного з провідних факторів патогенності клінічно значущих бактерій [1].

Відносно повно та всебічно вивчено роль лецитінази в патогенезі гнійно - запальних процесів, обумовлених грампозитивними мікробами (збудники газової анаеробної гангрени, стафілококи, коринебактерії та ін.) [2-5]. Значення ж цього ферменту в розвитку хвороб, обумовлених грамнегативними бактеріями, перш за все родів *Pseudomonas, Proteus, Enterobacter* тощо висвітлена в науковій літературі вельми недостатньо.

За мету дослідження означено розробку простого, досить економічного та вельми доступного для практичного мікробіолога методу визначення продукції лецитінази грамнегативними бактеріями, здатними до роїння на щільному поживному середовищі (на прикладі бактерій роду *Proteus*).

Матеріали та методи. Диференційною ознакою протеїв є здатність до роїння (Н- форма). Роїння здійснюється за рахунок утворення клітин-швермерів довжиною 20-30 мкм вже через 3-4 години росту на м'ясо-пептонному агарі (МПА). Клітинна стінка швермерів утворює єдину оболонку без перетинок, по всій довжині швермеру рівномірно розташовані одинарні або парні ядерні структури. Вже через годину культивування швермери трансформуються в звичайні клітини, серед яких знову каскадно утворюються подовжені структури так званого «роїння».

При деяких умовах, наприклад, підвищенні концентрації поживних речовин, культивуванні при t=45 °С, додаванні до живильного середовища поверхнево-активних речовин тощо, протей може переходити з Н- до О-форми. При цьому він вже не здатен до роїння, на поверхні агару утворює ізольовані колонії з рівним краєм [6].

Відоме на теперішній час тверде поживне середовище для визначення лецитіназної активності мікроорганізмів – жовтково-сольовий агар (ЖСА) – селективне для протеїв, пригнічує їх зростання і тому не може бути використаним з метою означення їх лецитіназної активності. Отже, на першому етапі дослідження поставлено задачу створити нове живильне середовище для одночасного вияву лецитіназної активності та пригнічення роїння протеїв.

Для пригнічення феномену роїння протеїв дослідження проведено на двох сконструйованих щільних поживних середовищах. З метою порівняння лецитіназної активності протеїв у О- та Н - формах застосовано метод, оснований на просвітленні жовткової суміші (з наявністю лецитіну) під дією фосфоліпази (лецитінази) центрифугатів бульйонних культур бактерій.

Використано поживне середовище із гідролізату еритроцитарної маси, скомпоноване науковцями ДУ « Інститут мікробіології та імунології ім. Мечникова НАМН України», патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20, до якого нами додано 20 % жовткової суміші (один жовток на 150 мл фізіологічного розчину кухонної солі) [7].

Експериментальне живильне середовище характеризується наступним складом: глюкоза – 4 %; пептон ферментативний – 7 %; агар мікробіологічний – 3,5 %; NaCl – 2,5 %; жовткова суміш – 20 % (pH 7.2). Основу автоклавують 20 хв при 1 атм, після досягнення t=45 °С до неї додають вказані вище 20 % жовткової суміші та розливають в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Високі концентрації агару, пептону та цукру сприяють накопиченню поживних речовин у середовищі та перешкоджають прояву феномену роїння.

Перед посівом бактерій чашки підсушували у термостаті, залік результатів проводили впродовж 4 - х діб щоденно.

Для реалізації одного з етапів дослідження, основаного на просвітленні жовткової суміші, готову суміш розводили фізіологічним розчином до отримання оптичної щільності 1,6 (ФЕК, фільтр №6, кювета 3 мм). До 5 мл розведеної жовткової суміші додавали 1 мл центрифугату 5-ти – добової бульйонної культури протею, яка була попередньо відцентрифугована при 5000 об/хв впродовж 20 хвилин. Штатив із пробірками розміщували у термостаті за температури 37 °С. За міру активності вважали термін до моменту появи повного просвітлення дослідного розчину.

Штами вважали неактивними за критерієм продукції лецитінази, якщо просвітлення жовткової суміші не настало впродовж однієї години, за мало активні рахували, якщо просвітлення спостерігалось в термін від 20 до 40 хвилин, за активні – до 20 хвилин та високоактивні – при просвітленні суміші менш, ніж за 5 хвилин.

Результати та обговорення. Для дослідження лецитіназної активності протеїв на щільних поживних середовищах використовували 18-годинну культуру мікробів. Суспензію готували в стерильному фізіологічному розчині (1,0 одиниця каламутності за McFarland), робили послідовні розведення до 10^{-6}-10^{-7} мікробних клітин, на запропоноване середовище засівали по 0,1 мл звісу. До досліду брали *Proteus vulgaris* ATCC 4636, рекомендованого для перевірки контролю якості поживних середовищ, а також клінічні ізоляти (8 *Proteus vulgaris* і 12 *Proteus mirabilis*), вилучені від хворих на гнійно-запальні процеси. У якості контролю на кожну чашку засівали бляшку культури *S. aureus* ATCC 25923.

Лецитіназну активність на запропонованому щільному поживному середовищі проявили 5 клінічних ізолятів *P. vulgaris* та 10 – *P. mirabilis* (23,81 % та 47,62 % відповідно, всього 71,43 %). На поживному середовищі із гідролізату еритроцитарної маси лецитіназну активність виявили лише 4 (19,05 %) штами *P. mirabilis*, що співпало на обох поживних середовищах (таблиця 1).

Прояв лецитіназної активності враховували на протязі до 4- х діб включно. На першу добу лецитіназа виявила себе у чотирьох штамах *P. mirabilis*, висока лецитіназна активність яких співпала на обох поживних середовищах. Через 48 годин позитивну реакцію дали ще 6 штамів *P. mirabilis* та один із клінічних ізолятів *P. vulgaris* (33,33 %). Інші 4 ізоляти (19,05 %) P.vulgaris дали позитивну реакцію лише на 3 та 4 добу випробування. Отримані дані вказують не лише на придатність використання запропонованого середовища для одночасного виявлення лецитіназної активності та пригнічення роїння, а й на його достатньо високу чутливість.

Загалом лецитіназну активність у штамів *P. vulgaris* виявили в 44,44 %, у штамів *P. mirabilis* – 91,66 %. Це може пояснюватись походженням штамів: фермент частіше проявляє себе у протеїв, виділених від хворих на гнійно-запальні процеси (більшість яких склали ізоляти *P. mirabilis*).

Порівняльне вивчення лецитіназної активності центрифугатів 5-ти добових бульйонних культур штамів, що знаходились у Н- та О- формі показало, що активність ферменту суттєво вища у протеїв у О- формі дисоціації (табл. 2).

Таблиця 1 – Порівняна характеристика прояву лецитіназної активності бактерій роду *Proteus* на щільних поживних середовищах

Вид бактерій роду *Proteus*	№ штаму або клінічного ізоляту	Лецитіназна активність мікроорганізмів	
		Розроблене живильне середовище	Живильне середовище на основі гідролізату еритроцитарної маси людини
P. vulgaris	АТСС 4636	—	—
P. vulgaris	19	+	—
P. vulgaris	21	+	—
P. vulgaris	27	+	—
P. vulgaris	43	—	—
P .vulgaris	56	—	—
P. vulgaris	60	—	—
P. vulgaris	70	+	—
P. vulgaris	74	+	—
P. mirabilis	6	+	—
P. mirabilis	18	+	—
P. mirabilis	23	+	+
P. mirabilis	24	+	—
P. mirabilis	32	+	—
P. mirabilis	35	+	+
P. mirabilis	41	+	+
P. mirabilis	46	+	—
P. mirabilis	54	—	—
P. mirabilis	55	+	—
P. mirabilis	61	+	—
P. mirabilis	68	+	+

Примітка: *« + » - наявність ознаки, « - » - відсутність ознаки*

Контрольний штам *S. aureus* АТСС 25923 дав позитивну реакцію фактично в усіх дослідах, *P. vulgaris* АТСС 4636 не виявив лецитіназної активності в жодному з проведених досліджень.

Таблиця 2 – Лецитіназна активність протеїв в О- та Н- формі дисоціації, хв.

Вид бактерій роду *Proteus*	№ штаму або клінічного ізоляту	Лецитіназна активність протеїв у 0- формі	Лецитіназна активність протеїв у Н- формі
P. vulgaris	АТСС 4636	0	0
P. vulgaris	19	17	33
P. vulgaris	21	54	0
P. vulgaris	27	43	0
P. vulgaris	43	0	0
P .vulgaris	56	0	0
P. vulgaris	60	50	0
P. vulgaris	70	22	41
P. vulgaris	74	47	0
P. mirabilis	6	33	48
P. mirabilis	18	23	55
P. mirabilis	23	2	14
P. mirabilis	24	45	0
P. mirabilis	32	38	0
P. mirabilis	35	3	7
P. mirabilis	41	4	7
P. mirabilis	46	22	45
P. mirabilis	54	47	58
P. mirabilis	55	17	33
P. mirabilis	61	15	21
P. mirabilis	68	3	8

Висновки. 1. Мікроорганізми роду *Proteus* володіють достатньо високою лецитіназною активністю, яка залежить від походження штамів та різко зростає з переходом з Н- до О- форми мікробної дисоціації. Означення цього феномену може бути додатковим тестом для оцінки ступеня вірулентності протеїв.

2. Запропоноване щільне поживне середовище високочутливе та придатне для використання з метою одночасного виявлення лецитіназної активності бактерій та пригнічення їх роїння.

3. Перевагою даного середовища є можливість визначення лецитіназної активності не лише у протеїв, а й у інших видів мікроорганізмів, що здатні роїтись.

Список літератури

1. Dennis, E. A. The enzymes. // N. Y.- L. - 1983 - 3 ed.- Vol. 16. - p. 307-353. **2.** Ocampo J., Afanador N., Vives M.J., Moreno J.C., Leidy C. The antibacterial activity of phospholipase A(2) type IIA is regulated by the cooperative lipid chain melting behavior in Staphylococcus aureus. // Biochim. Biophys. Acta. 2010. - Vol. 1798(6). – p. 1021-10288. **3.** Aronson, A.I., Bell, C, Fulroth, B. Plasmid-Encoded Regulator of Extracellular Proteases in Bacillus anthracis. // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187.-p. 3133-3138. **4.** Steffen, E. K., Hentges, D J. Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. // J. Clin. Microbiol. – 1981. – Vol. 14. – p.153-156. **5.** Temaru, E., Shimura, S., Karasawa, T. Clostridium tetani Is a Phospholipase (Lecithinase)-Producing Bacterium. // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – p. 2024-2025. **6**. Belas, R., Erskine, D., Flaherty, D. Proteus mirabilis Detective in Swarmer Cell Differentiation and Multicellular Behavior. // J. Bacteriol. – 1991 – Vol.173.-p. 6279-6288. **7**. Патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20. Живильне середовище для пригнічування роїння бактерій роду Proteus. / Осолодченко Т.П., Кучма І.Ю., Волянський А.Ю. і співавт. (Україна).- № 200613244; Заявл. 14.12.2006; Опубл. 10.05.2007. **8.** Нестерова, Г.Н. Биология протея. / Учебное пособие. – Горький: ГГУ. – 1972. – 88 с.

LECITHINASE ACTIVITY OF SWORMING MICROORGANISMES (ON EXAMPLE GENOUS PROTEUS)

Bozshko M.G.

Institute of microbiology and immunology named after I.I. Mechnikov NAMSU, Kharkiv

A research aim was a study of features of Proteus pathogeny festering -inflammatory infections and role of the agent in them. Lecithinase activity was shown by 44,44 % cultures of P.vulgaris and 91,66 % cultures of P.mirabilis. Nutrient medium was developed, highly sensitive and suitable for the simultaneous detection of lecithinase activity and suppression of swarming. The use of this nutrient medium in microbiological practice will allow to promote quality of researches.

УДК 619:616.9:579:842.11:636.2

ВИДОВИЙ СКЛАД МІКРОФЛОРИ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ, ХВОРОЇ НА ЕНТЕРИТ

Гадзевич Д.В., Дунаєв Ю.К., Горбенко О.В., Гадзевич О.В., Вовк С.І.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Бактеріальні інфекційні захворювання (пастерельоз, ешерихіози, стрептококози, сальмонельози та їх асоціації) мають складну етіологічну структуру та завдають тваринництву великих економічних збитків. Особливості виникнення та поширення інфекційних захворювань залежить від біологічних властивостей умовно-патогенної та патогенної мікрофлори, а також резистентності та імунобіологічної реактивності тварин. Мікроорганізми, завдяки своїм генетичним особливостям, можуть швидко набувати стійкість до антимікробних препаратів та активувати фактори патогенності, що сприяє їх широкому розповсюдженню серед сприятливих макроорганізмів та підсилює ризик захворювань.

Отже, на організм тварин впливає комплекс несприятливих факторів, які пригнічують нормальне функціонування основних систем життєдіяльності. З цим пов'язують збільшення частоти виникнення та ускладнення перебігу ентеритів.

Відомо, що нормальна мікрофлора кишечника виконує важливу роль у життєдіяльності організму хазяїна. За сучасними поглядами, нормальна мікрофлора розглядається, як якісне та кількісне співвідношення популяцій мікроорганізмів, що підтримує біохімічну, метаболічну та імунну рівновагу макроорганізму, і є вкрай необхідною для збереження гомеостазу [2]. Тому метою досліджень було встановити якісне та кількісне співвідношення мікроорганізмів, що перебувають у порожнині кишечнику тварин, хворих на ентерит і здорових, а також вивчити особливості біологічних властивостей мікрофлори шлунково-кишкового тракту великої рогатої худоби, хворої на ентерит.

Матеріали та методи. Бактеріологічні дослідження проводили впродовж 2010-2011 рр. в лабораторії вивчення бактеріальних хвороб рогатої худоби ННЦ «ІЕКВМ». Для проведення бактеріологічних досліджень відбирали патологічний матеріал від тварин, хворих на ентерит. За результатами лабораторних досліджень вивчали властивості мікроорганізмів, а саме: культурально-морфологічні, тінкторіальні, імунобіологічні та біохімічні. Встановлювали фактори патогенності мікроорганізмів, їх вірулентність. Мікробіологічні дослідження біотипів вивчено у 75 тварин, хворих на ентерити (основна група) та у 75 клінічно здорових тварин (контрольна група), шляхом визначення бактеріологічним методом видового складу та популяційного рівня автохтонних облігатних і факультативних, а також алохтонних представників мікрофлори порожнини товстого кишечника з подальшим встановленням дисбіотичного стану (дисбактеріозу) [1, 2, 5, 6].

Результати досліджень. У результаті мікробіологічного моніторингу від телят хворих на ентерит (n=199) було ізольовано 456 культур мікроорганізмів, серед яких: *Enterobacteriaceae* (47 %), *Staphylococcus* (15 %), *Enterococcus* (5 %), *Streptococcus* (13 %), *Bifidobacterium* (5 %), *Lactobacillus* (5 %), *Bacillus* (3 %), *Candida* (2 %), *Psevdomonad*a (4 %), *Clostridium* (1 %) (рис. 1).

За результатами вивчення видового складу мікроорганізмів, встановлено, що мікроорганізми з родини *Enterobacteriaceae* були найчисленнішими за частотою виділення.

Як зазначено у таблиці 1, від телят найчастіше виділяли кишкову паличку, протей, клебсієлу, ентеробактер та цитробактер.

За результатами вивчення здатності виділених культур *E. coli* експресувати специфічні адгезивні антигени встановлено, що 65 культур (69 %) були здатні продукувати фімбріальні адгезини типів К99, F41, 987P, K88. Встановлено, що дослідні культури ешерихій мають різний ступінь альфа- та бета-гемолітичної активності – зона гемолізу навколо колоній ешерихій становила від 0,5 до 5 мм.