

4. Імуногенність і вміст білкових компонентів обох досліджених вакцин проти вірусу грипу А(Н1N1) відповідають вимогам до вакцин типу А.

ЛІТЕРАТУРА

1. Лавров В. Ф. Основы иммунологии, эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней / В. Ф. Лавров, Е. В. Русакова, А. А. Шапошников [и др.] – М. : ЗАО «МП Гигиена», 2007. – 311 с.
2. Chaloupka I. Comparative analysis of six European influenza vaccines / I. Chaloupka, A. Schuler, M. Marschall, H. Meier-Ewert // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1996. – V. 15. – P. 121–127.
3. Бектимиров Т. А. Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа: Методические указания / Т. А. Бектимиров, Н. И. Лонская, Н. А. Агафонова [и др.] – М. : Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 32 с.
4. Xie H. Evaluating the vaccine potential of an influenza A viral hemagglutinin and matrix double insertion DNA plasmid / H. Xie, T. Liu, H. Chen [et al.] // Vaccine. – 2007. – V. 25, № 44. – P. 7649–7655.
5. Караулов А. В. Инфекции и иммунодефициты – приоритеты сегодня / А. В. Караулов // Практикующий врач. – 1997. – № 9. – С. 3–4.
6. Kunzel W. Kinetics of humoral antibody response to trivalent inactivated split influenza vaccine in subjects previously vaccinated or vaccinated for the first time / W. Kunzel, H. Glathe, H. Engelman, Ch. Van Hoecke // Vaccine. – 1996. – V. 14, № 12. – P. 1108–1110.
7. Laddy D. J. Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza / D. J. Laddy, J. Yan, N. Corbitt [et al.] // Vaccine. – 2007. – V. 25, № 16. – P. 2984–2989.
8. Grebe K. M. Heterosubtypic immunity to influenza A virus: where do we stand? / K. M. Grebe, J. W. Yewdell, J. R. Bennink // Microbes and Infection. – 2008. – V. 10, № 9. – P. 1024–1029.
9. Ochiai H. Inactivated influenza vaccine effectiveness against influenza-like illness among young children in Japan – With special reference to minimizing outcome misclassification / H. Ochiai, M. Fujieda, S. Ohfuji [et al.] // Vaccine. – 2009. – V. 27, № 50. – P. 7031–7035.
10. Beran J. Evaluation of reactogenicity and immunogenicity of two influenza vaccines (vaxigrip and fluarix) in the season 1996–1997 / J. Beran, R. Prymula, R. Chilber [et al.] // Cent. Eur. J. Public Health. – 1998. – № 64. – P. 269–273.

УДК 576.851.47.095:612.118.221.39

НОВІ МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ОЗНАЧЕННЯ ГЕМОЛІТИЧНОЇ ТА ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ БАКТЕРІЙ РОДУ PROTEUS

Л. А. Юрченко

ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені Мечникова» АМН України, Україна

Визначено гемолітичну та лецитиназну активність 80 штамів бактерій роду *Proteus*, виділених з різних осередків інфекції; штами протею, виділені з патологічного матеріалу, проявили вірогідно вищу гемолітичну та лецитиназну активність у порівнянні зі штамами, вилученими від носіїв. Розроблено цільне живильне середовище із пригнічуючими роїння властивостями, яке суттєво не впливало на здатність протею до гемолізу еритроцитів та прояву лецитиназної активності. Залежності ступеню гемолітичної або лецитиназної активності бактерій роду *Proteus* від форми дисоціації не виявлено.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гемолізін, лецитиназа, Н-, О-форми дисоціації, роїння

НОВЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ И ЛЕЦИТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БАКТЕРИЙ РОДА PROTEUS

Л. А. Юрченко

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии имени Мечникова» АМН Украины, Украина

Определена гемолитическая и лецитиназная активность 80 штаммов бактерий рода *Proteus*, выделенных из различных очагов инфекции; штаммы протея, изолированные из патологического материала, проявили более выраженную гемолитическую и лецитиназную активность по сравнению со штаммами, выделенными от здоровых носителей. Разработана плотная питательная среда с

подавляючими роєними способностями, при этом не влияющая существенно на способность протей синтезировать лецитиназу или гемолизировать эритроциты. Зависимости гемолитической и лецитиназной активности протей от нахождения его в О- или Н-форме диссоциации не выявлено.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гемолизины, лецитиназы, Н-, О-форма диссоциации протеев, роение

NEW METHODOLOGICAL APPROACHES TO DEFINITION HAEMOLYTIC AND LECITHINASE ACTIVITY OF PROTEUS

L. A. Yurchenko

ST «Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology» Academy of Medical Sciences of Ukraine, Ukraine

Determined haemolitics and lecithinase activity 80 cultures of *Proteus*, abstracted from the different hearts of infection; the cultures from pathological material had greater haemolitics activity as compared relatively transmitters. A hard defined medium with properties swarming inhibition, which didn't inhibition activity *Proteus* for haemolitics of erythrocytes, is developed. Dependences of haemolytic or lecithinase activity of *Proteus* from its finding in O- or the H-form not revealed.

KEY WORDS: hemolysin, lecithinase, O- and H-form of *Proteus*, swarming

У патогенезі гнійно-запальних процесів все більше 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 та в практиці мікробіології означена терміном лецитіназа.

На сьогодні чітко означено чотири види лецитіназ: А, В, С і D. Патогенні бактерії в більшості своїй продукують лецитіназу С, яка характеризується типовими властивостями бактеріальних токсинів, проявляє гемолітичну дію та антигенну активність. Розщеплюючи лецитин 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 патологічних процесів, обумовлених грамположитивними мікробами (збудники газової анаеробної гангрені, стафілококи, коринебактерії та ін.) [2–5]. Значення ж цього ферменту в розвитку хвороб, обумовлених грамнегативними бактеріями, перш за все родів *Pseudomonas*, *Proteus* та *Enterobacter* висвітлена у науковій літературі недостатньо.

Диференційною ознакою протей 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. Через 0,5–

1 годину з моменту формування швермери трансформуються в звичайні клітини, серед яких знову каскадно утворюються подовжені структури так званого «роїння» [6].

При деяких умовах, наприклад, підвищенні концентрації поживних речовин, культивуванні при $t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, додаванні до живильного середовища поверхнево-активних речовин, протей може дисоціювати з Н- до О-форми. При цьому він вже не здатен до роїння, на поверхні агару утворює ізольовані колонії з рівним краєм [7].

У зв'язку з тим, що протей синтезує лецитіназу, яка має властивості бактеріального токсину та виражену гемолітичну дію, було цікавим порівняти ступінь прояву гемолітичної та лецитіназної активності штамів протей різного походження. Виявилось, що штами з високою гемолітичною активністю, одночасно проявляли і достатньо виражену лецитіназну дію, однак повного співпадіння цих показників не відмічено. Відсутність чіткої кореляції між ступенем прояву гемолітичної та лецитіназної активності наводить на думку про наявність у протей інших гемолітичних факторів, перш за все – гемолізінів [8].

Поки ще не вирішено питання про природу походження гемолізінів протей. Більшість авторів пов'язують гемолітичну активність протей з наявністю у них розвинутого джгутикового апарату, що призводить до травмизації еритроцитів під час руху протей або ж виділенням Н-формою біологічно активних речовин, що сприяють гемолізу [9].

В той же час багатьма науковцями проводяться дослідження з дорозшифровки механізму процесу роїння та означення можливих його регуляторів, керуючих цим процесом. В результаті дослідження мутацій в трьох

генах, які кодують фрагменти флагеліну, отриманих в результаті лімітування кількості поживних речовин в рідких та агарових живильних середовищах, висунуто гіпотезу, згідно якої *Proteus mirabilis* оцінює своє місцезнаходження в оточуючому середовищі та виявляє здатність до роїння і токсинотворення. Не виключено, що вказані властивості керуються одним і тим же сигналом, молекулярна природа якого поки не розшифрована [10].

До теперішнього часу феномен роїння унеможлилював використання щільних живильних середовищ для визначення гемолітичної активності протеїв, що значно ускладнювало поглиблене їх дослідження. Відоме на теперішній час щільне живильне середовище для визначення лецитіназної активності мікроорганізмів – жовтково-сольовий агар (ЖСА) – селективне для протеїв, пригнічує їх ріст і тому не може бути використано з метою означення їх лецитіназної активності.

Метою роботи стала розробка щільного живильного середовища із властивостями, які пригнічують роїння, склад якого не впливав би суттєво на здатність протею синтезувати гемолізину або лецитінази.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для пригнічення феномену роїння протеїв випробування проведено на двох сконструйованих щільних живильних середовищах.

Експериментальне живильне середовище для визначення лецитіназної активності характеризується наступним складом: глюкоза – 4,0 %; пептон ферментативний – 7,0 %; агар мікробіологічний – 3,5 %; NaCl – 2,5 %; (рН 7.2). Основу автоклавують 20 хв при 1 атм., після досягнення $t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, до неї додають 20 % жовткової суміші та розливають в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Високі концентрації агару, пептону та цукру сприяють накопиченню поживних речовин в середовищі і, за нашими даними, перешкоджають прояву феномену роїння; для контролю чутливості експериментального середовища паралельно проведено визначення лецитіназної активності протеїв з використанням живильного середовища із гідролізату еритроцитарної маси, скомпановане науковцями ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені Мечникова АМН України», патент № 23150 (UA) МПК (2006): C12N 1/20, до якого нами додано 20 % жовткової суміші (1 жовток на 150 мл фізіологічного розчину кухонної солі) [11].

Перед посівом підсушували чашки у термостаті, залік результатів проводили впро-

довж 4-х діб щоденно.

З метою порівняння лецитіназної активності протеїв у О- та Н-формах застосовано метод, оснований на просвітленні жовткової суміші (лецитіну) під дією фосфоліпази (лецитінази) центрифугатів бульйонних культур бактерій. Для реалізації цього етапу дослідження готову суміш розводили фізіологічним розчином до отримання оптичної щільності 1,6 (колориметр фотоелектричний, фільтр № 6, кювета 3 мм). До 5 мл розведеної жовткової суміші додавали по 1 мл центрифугату 5-добової бульйонної культури протею, яка була попередньо відцентрифугована при 5 тис. обертів на хвилину впродовж 20 хв. Штатив із пробірками розміщували у термостаті при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. За міру активності вважали термін до моменту появи повного просвітлення дослідного розчину. Штами вважали за неактивні щодо продукції лецитінази, якщо просвітлення жовткової суміші не настало впродовж однієї години, за мало активні рахували, якщо просвітлення спостерігалось в термін від 20 до 40 хв, за активні – до 20 хв та високоактивні – при просвітленні суміші менш, ніж за 5 хв [12].

Для дослідження гемолітичної активності протеїв використовували експериментальне живильне середовище, основа якого мала такий же склад, як і для визначення лецитіназної активності; різниця між ними полягає в тому, що після автоклавування та досягнення нею $t = 45\text{ }^{\circ}\text{C}$, до основи додавали 5 % еритроцитарної маси крові людини. Експериментальне живильне середовище розливали в стерильні чашки Петрі по 20 мл. Для порівняння використовували середовище Плоскірьова (до якого додали 5 % еритроцитної маси людини), на якому також пригнічується роїння протеїв. На чашки засівали добову культуру мікроорганізмів.

Означення гемолітичних властивостей мікроорганізмів роду *Proteus* в Н-формі проводилось методом виявлення гемолітичної активності центрифугатів бульйонних культур: добову культуру досліджуваних штамів, вирощених на м'ясо-пептонному бульйоні, центрифугували при 6000 обертах на хвилину впродовж 30 хв; до 1 мл над осадової рідини у розведенні 1:2 додавали по 1 мл 2 % суспензії відмитих еритроцитів людини. Наявність гемолізу визначали візуально після 2 год інкубування пробірок у термостаті при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ [12].

До дослідів брали *Proteus vulgaris* ATCC 4636, який рекомендований для контролю якості живильних середовищ [13], а також клінічні ізоляти *Proteus vulgaris* та *Proteus*

mirabilis. Ізоляти вилучено від хворих із запальними процесами. Також в якості контролю на кожну чашку засівали бляшку культури *S.aureus* ATCC 25923, який проявляє і гемолітичну, і лецитіназну активність.

Статистична обробка результатів здійснювалась методом варіаційної статистики. Аналіз результатів включав розрахунок первинних статистичних показників: M (вибіркове середнє), s (середнє квадратичне відхилення) та m (похибка середнього). Для перевірки гіпотези про рівність генеральних середніх двох незалежних вибірок використовували двохвибірковий критерій Ст'юдента (t). Критичний рівень значимості p приймали рівним 0,01. Результати оброблено статистично з використанням комп'ютерної програми STATISTICA-7.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Гемолітичну та лецитіназну активність центрифугатів бульонних культур вивчали на 80 ізолятах протеїв, виділених з різних осередків інфекції: 67 (83,75 %) культур *P. mirabilis* та 13 (16,25 %) ізолятів *P. vulgaris*, вилучених впродовж 2006–2009 рр. від пацієнтів з гнійно-запальними захворюваннями різної локалізації (сеча, пунктати, гній, жовч та ін.), від хворих на гострі кишкові розлади, а також з фекалій клінічно здорових людей. Два штами *P. mirabilis* знаходились у О-формі, усі інші штами протеїв мали здатність до роїння.

Лецитіназну активність центрифугатів бульонних культур серед штамів *P. vulgaris* виявили 23,08 %, серед штамів *P. mirabilis* – 54,63 % (загалом 66,25 %), що може пояснюватись походженням штамів: фермент частіше проявляє себе у протеїв, виділених від хворих на гнійно-запальні процеси (більшість яких склали ізоляти *P. mirabilis*).

При визначенні гемолітичної активності центрифугатів бульонних культур наявність видимого гемолізу виявлено у 66-ти (82,5 %) культур протеїв: 4-х (30,76 %) *P. vulgaris* та у 62-х (93,94 %) *P. mirabilis*, тобто кількість високоактивних штамів вірогідно переважає серед ізолятів *P. mirabilis*.

Після інкубування протеїв на експериментальному живильному середовищі з вмістом 5 % еритроцитарної маси людини впродовж 24 год при 37 °С отримано ріст колоній в О-формі сірого кольору, діаметром 2–4 мм, з наявністю або відсутністю видимої зони гемолізу. На експериментальному живильному середовищі із 20 % жовткової суміші після 24 год інкубування отримано ріст О-форми протею у вигляді колоній білого кольору діаметром 2–4 мм з наяв-

ністю або відсутністю зони преципітації навколо колоній.

Серед досліджуваних штамів зона гемолізу навколо колоній спостерігалась у 64-х (80,0 %) штамів протею, серед яких були також один з двох штамів, нездатних до роїння на звичайних щільних живильних середовищах та центрифугат бульйонної культури якого не дав візуального гемолізу у пробірці. Не виявлено гемолітичної дії у 12-ти (15,0 %) штамів протею. Кількість гемолітичних штамів значно переважала серед штамів *P. mirabilis*, ніж серед штамів *P. vulgaris* (76,25 % та 46,15 % відповідно).

Виявлення лецитіназної активності вважували протягом до 4-х діб включно. На першу добу лецитіназа виявила себе у чотирьох штамів *P. mirabilis*, висока лецитіназна активність яких співпала на обох живильних середовищах. Через 48 год 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. Загалом лецитіназну активність на запропонованому щільному поживному середовищі проявили 5 клінічних ізолятів *P. vulgaris* та 10 – *P. mirabilis* (23,81 % та 47,62 % відповідно, усього 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.

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

Порівняння гемолітичної та лецитіназної активності протеїв показано на рис. 1. Прояв гемолітичної активності протеїв суттєво вищий прояву ними лецитіназної активності в усіх дослідках, що свідчить про наявність у цих бактерій незалежних від лецитіназ факторів гемолізу еритроцитів – гемолізинів.

Кількісна характеристика росту 21 штаму протеїв на запропонованих середовищах та середовищах, означених в якості прототипу, надана у табл. 1.

Дані щодо паралельного визначення гемолітичної та лецитіназної активності означених штамів протеїв на розроблених та контрольних живильних середовищах надано у табл. 2. Приведений аналіз результатів свідчить не тільки про придатність використання запропонованих середовищ для одночасного виявлення гемолітичної або лецитіназної активності та пригнічення роїння, а й про їх досить високу чутливість. При

проведенні повторного дослідження через 6 місяців зберігання культур в лабораторних умовах визначено стійкість здатності протей до утворення гемолізів та лецитіназ.

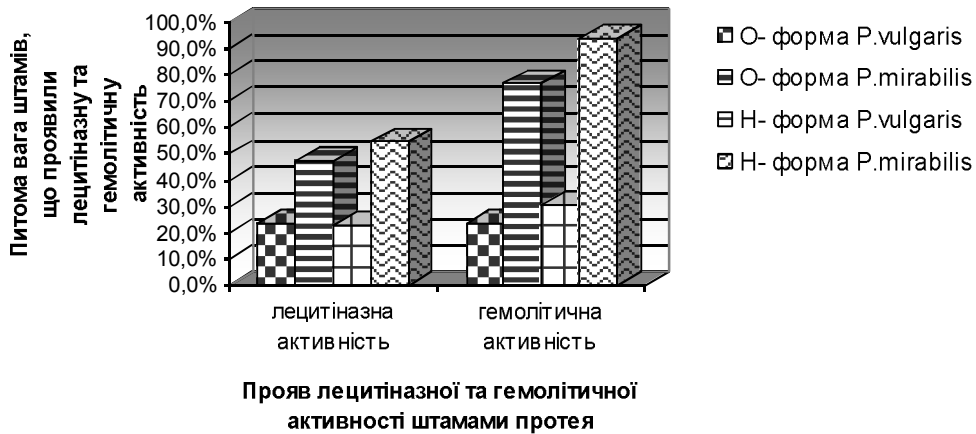


Рис. 1. Порівняння гемолітичної та лецитіназної активності бактерій роду *Proteus*

Таблиця 1

Кількісна характеристика росту протей на запропонованих середовищах та середовищах, означених в якості прототипу (контроль)

Вид мікроорганізму	№ штамму або ізоляту	Мікробне навантаження, КУО/мл	Кількість колоній, що вирости на середовищах (M ± m) (n = 105 для кожного розведення)			
			Визначення гемолітичної активності		Визначення лецитіназної активності	
			Середовище Плоскірвова	Експериментальне живильне середовище для визначення гемолітичної активності	Середовище із гідролізату еритроцитної маси	Експериментальне живильне середовище для визначення лецитіназної активності
1	2	3	4	5	6	7
P.vulgaris	ATCC 4636	10 ⁻⁶	60,8 ± 4,6	68,6 ± 1,3	55,2 ± 0,7	68,6 ± 1,1
		10 ⁻⁷	8,0 ± 0,7	8,0 ± 0,5	5,4 ± 0,4	5,8 ± 0,4
P.vulgaris	19	10 ⁻⁶	59,6 ± 1,9	62,4 ± 2,2	53,8 ± 1,2	72,8 ± 1,4
		10 ⁻⁷	8,6 ± 0,8	7,8 ± 0,4	6,0 ± 0,3	7,8 ± 0,4
P.vulgaris	21	10 ⁻⁶	65,2 ± 2,4	70,6 ± 0,7	56,2 ± 1,2	68,2 ± 1,2
		10 ⁻⁷	6,6 ± 0,5	8,2 ± 0,8	5,6 ± 0,4	7,6 ± 0,5
P.vulgaris	27	10 ⁻⁶	62,4 ± 2,4	69,2 ± 1,6	59,8 ± 1,9	72,2 ± 1,1
		10 ⁻⁷	8,0 ± 0,9	10,6 ± 1,3	5,4 ± 0,5	7,8 ± 0,6
P.vulgaris	43	10 ⁻⁶	70,0 ± 3,4	69,2 ± 0,6	56,4 ± 2,1	75,0 ± 1,6
		10 ⁻⁷	9,8 ± 0,9	9,8 ± 0,9	5,6 ± 0,4	7,4 ± 0,7
P.vulgaris	56	10 ⁻⁶	57,4 ± 2,6	65,8 ± 2,3	56,8 ± 1,7	75,6 ± 1,9
		10 ⁻⁷	7,8 ± 0,6	8,8 ± 0,9	5,8 ± 0,6	7,6 ± 0,4
P.vulgaris	60	10 ⁻⁶	66,8 ± 3,2	70,6 ± 1,2	55,6 ± 1,3	74,4 ± 2,2
		10 ⁻⁷	9,6 ± 0,8	10,0 ± 0,7	6,0 ± 0,3	8,4 ± 0,6
P.vulgaris	70	10 ⁻⁶	64,2 ± 1,7	66,6 ± 2,1	53,8 ± 0,8	70,6 ± 2,9
		10 ⁻⁷	8,4 ± 1,2	9,6 ± 1,3	6,6 ± 0,6	7,8 ± 0,8
P.vulgaris	74	10 ⁻⁶	61,2 ± 1,9	65,8 ± 1,9	53,0 ± 1,3	75,0 ± 1,4
		10 ⁻⁷	7,8 ± 1,2	8,2 ± 0,6	6,8 ± 0,6	7,2 ± 0,7
P.mirabilis	16	10 ⁻⁶	63,2 ± 1,7	66,0 ± 2,4	52,8 ± 1,2	75,4 ± 1,5
		10 ⁻⁷	8,2 ± 0,3	9,6 ± 0,8	6,2 ± 0,8	8,0 ± 0,3
P.mirabilis	18	10 ⁻⁶	60,6 ± 1,1	68,4 ± 1,7	58,0 ± 1,2	76,2 ± 2,3
		10 ⁻⁷	8,2 ± 0,9	7,4 ± 0,7	7,0 ± 0,4	8,6 ± 0,5
P.mirabilis	23	10 ⁻⁶	60,6 ± 1,1	65,2 ± 0,9	60,0 ± 0,4	77,4 ± 1,2
		10 ⁻⁷	6,6 ± 0,7	8,0 ± 0,5	6,4 ± 0,4	8,4 ± 0,9

1	2	3	4	5	6	7
P.mirabilis	24	10 ⁻⁶	61,8 ± 2,2	65,2 ± 1,4	61,0 ± 1,7	76,0 ± 1,5
		10 ⁻⁷	7,0 ± 0,6	8,0 ± 0,3	6,8 ± 0,6	8,6 ± 0,5
P.mirabilis	32	10 ⁻⁶	63,4 ± 1,1	65,6 ± 1,9	59,2 ± 1,1	73,6 ± 1,9
		10 ⁻⁷	7,8 ± 0,4	8,4 ± 0,8	6,4 ± 0,7	7,8 ± 0,6
P.mirabilis	35	10 ⁻⁶	62,6 ± 1,9	61,8 ± 1,8	58,0 ± 1,3	76,4 ± 2,1
		10 ⁻⁷	6,0 ± 0,3	7,8 ± 0,7	6,2 ± 0,2	8,4 ± 0,9
P.mirabilis	41	10 ⁻⁶	60,2 ± 0,8	62,8 ± 0,9	60,0 ± 1,3	71,2 ± 2,3
		10 ⁻⁷	6,8 ± 0,9	7,8 ± 0,6	7,2 ± 0,6	8,8 ± 0,6
P.mirabilis	46	10 ⁻⁶	59,6 ± 1,8	62,6 ± 1,5	59,2 ± 2,1	78,2 ± 1,9
		10 ⁻⁷	6,2 ± 0,4	7,2 ± 0,7	6,6 ± 0,7	9,2 ± 0,8
P.mirabilis	54	10 ⁻⁶	61,6 ± 1,3	62,8 ± 0,9	60,6 ± 1,1	76,8 ± 1,4
		10 ⁻⁷	6,2 ± 0,5	7,2 ± 0,7	6,4 ± 0,5	9,0 ± 0,3
P.mirabilis	55	10 ⁻⁶	61,0 ± 2,0	66,6 ± 1,7	58,0 ± 1,4	77,2 ± 1,1
		10 ⁻⁷	5,8 ± 0,6	7,2 ± 0,4	5,6 ± 0,4	8,8 ± 0,8
P.mirabilis	61	10 ⁻⁶	58,4 ± 1,6	62,0 ± 0,8	53,2 ± 2,1	77,8 ± 1,2
		10 ⁻⁷	6,2 ± 0,4	7,6 ± 0,7	5,6 ± 0,5	9,2 ± 0,8
P.mirabilis	68	10 ⁻⁶	60,8 ± 1,2	63,0 ± 1,5	61,2 ± 1,6	74,4 ± 3,2
		10 ⁻⁷	6,8 ± 0,6	7,8 ± 0,6	7,0 ± 0,6	8,6 ± 0,4
Критерій Ст'юдента (t)		10 ⁻⁶	tКр = 2,58; tЭмп = 5,8; p ≤ 0,01		tКр = 2,58; tЭмп = 8,8; p ≤ 0,01	
		10 ⁻⁷	tКр = 2,58; tЭмп = 3,5; p ≤ 0,01		tКр = 2,58; tЭмп = 6,5; p ≤ 0,01	

Примітка: підрахунок колоній проведено через 24 год культивування.

Таблиця 2

Характеристика прояву гемолітичної та лецитіназної властивості протеїв на запропонованих середовищах у порівнянні з прототипами

Вид мікро-організму	№ штаму або клінічного ізоляту	Гемолітична активність мікроорганізмів		Лецитіназна активність мікроорганізмів	
		Середовище Плоскіррова	Експериментальне живильне середовище для визначення гемолітичної активності	Середовище із гідролізату еритроцитарної маси	Експериментальне живильне середовище для визначення лецитіназної активності
P.vulgaris	ATCC 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	16	-	+	-	+
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; « * » – наявність елементів роїння.

ВИСНОВКИ

1. Розроблені щільні живильні середовища можуть бути використані не лише для пригнічення роїння протеїв, але й для виявлення гемолітичної або лецитіназної активності.

2. Прояв гемолітичної активності протеїв був суттєво вищим за прояв ними лецитіназної активності, що свідчить про наявність у цих бактерій незалежних від лецитіназ факторів гемолізу еритроцитів – гемолізинів.

3. Не виявлено суттєвої залежності гемолітичної та лецитіназної активності протею

від форми дисоціації на живильному середовищі.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Наступні дослідження будуть спрямовані на можливість використання розробленого середовища також для культивування інших видів мікроорганізмів, які зустрічаються в асоціаціях з ним при запальних процесах. Використання запропонованих середовищ в мікробіологічній практиці дозволить підвищити якість досліджень.

ЛІТЕРАТУРА

1. Dennis E. A. The enzymes / E. A. Dennis // N. Y. – L. – 1983. – 3 ed. – Vol. 16. – P. 307–353.
2. Ocampo J. The antibacterial activity of phospholipase A(2) type PA is regulated by the cooperative lipid chain melting behavior in *Staphylococcus aureus* / J. Ocampo, N. Afanador, M. J. Vives, J. C. Moreno, C. Leidy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1798 (6). – P. 1021–10288.
3. Aronson A. I. Plasmid-Encoded Regulator of Extracellular Proteases in *Bacillus anthracis* / A. I. Aronson, C. Bell, B. Fulroth // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 3133–3138.
4. Zemansky J. Development of a mariner-Based Transposon and Identification of *Listeria monocytogenes* Determinants, Including the Peptidyl-Prolyl Isomerase PrsA2, That Contribute to Its Hemolytic Phenotype / J. Zemansky, Benjamin C. Kline, Joshua J. Woodward, Jess H. Leber, Hélène Marquis, Daniel A. Portnoy // *J. Bacteriol.*, Jun 2009; 191 : 3950–3964.
5. Temaru E. *Clostridium tetani* Is a Phospholipase (Lecithinase)-Producing Bacterium / E. Temaru, S. Shimura, T. Karasawa // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 2024–2025.
6. Pearson M. Transcriptome of Swarming *Proteus mirabilis* / M. Pearson, D. Rasko, S. Smith, H. Mobley // *Infection and Immunity.* – 2010. – Vol. 78 (6). – P. 2834–2845.
7. Wangl W. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol / Won-Bo Wangl, Hsin-Chih Lai, Po-Ren Hsueh, Robin Y.-Y. Chiou, Shwu-Bin Lin and Shwu-Jen Liaw // *J Med Microbiol.* – 2006. – Vol. 55. – P. 1313–1321.
8. Rozalsky A. Potential virulence factors of *Proteus mirabilis* / A. Rozalsky, Z. Sidorczyk, K. Kotelko // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1997; № 1. – Vol. 61. – P. 65–89.
9. Liaw S. Modulation of swarming and virulence by fatty acids through the RsbA protein in *Proteus mirabilis* / S. Liaw, H. Chin, W. Wang // *Infection and Immunity.* – 2004. – № 12. – Vol. 72. – P. 6836–6845.
10. Belas R. The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein / R. Belas, R. Suvanasuthi // *J. of Bacter.* – 2005. – № 19. – Vol. 187. – P. 6789–6803.
11. Патент № 23150 (UA) МПК (2006) : C12N 1/20. Живильне середовище для пригнічування роїння бактерій роду *Proteus* / Т. П. Осолодченко, І. Ю. Кучма, А. Ю. Волянський і співавт. (Україна). – № 200613244; Заявл. 14.12.2006; Опубл. 10.05.2007.
12. Мішина М. М. Комбінована дія протимікробних засобів і імуномодуляторів при протейній інфекції (експериментальне дослідження) : дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія / М. М. Мішина. – Харків, 2004.
13. Інформаційний лист МОЗУ від 15.11.2000 р. за № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ».