

Список літератури

1. Мищенко, В.А. Проблема респираторних смешаних інфекцій молодняка КРС [Текст] / В.А. Мищенко //Матеріали Междунар. науч. конф., посвящ. 45-летию ФГУ «ВНИИЗЖ», 30-31 октября 2003г. – Владимир, 2003. – С. 73–77.
2. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота [Текст]/А.Г. Готов [и др.]//Ветеринария. – 2002. – №3. – С. 17–21.
3. Кучерявенко, Р.О. Інфекційний ринотрахеїт великої рогатої худоби (епізоотологія, діагностика та специфічна профілактика) [Текст] : дис. ... канд. вет. наук / Р.О. Кучерявенко. – Х., 2003. – 168 с.
4. Кучерявенко, В.В. Специфічна профілактика вірусних пневмоентеритів великої рогатої худоби – запорука отримання біологічно безпечної продукції тваринництва [Текст] / В.В. Кучерявенко // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2010. – Вип. 94. – С. 83–84.
5. Вакцинація против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 как важное звено в цепи профилактики ассоциированных вирусно-бактериальных инфекций крупного рогатого скота [Текст] / В.И. Стеценко [и др.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95. – С. 272–274.

THE RESULTS OF COMMISSION TESTING OF INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS, PARAINFLUENZA-3 AND BOVINE VIRAL DIARRHEA INACTIVATED VACCINE "RYPAVAK-3"

Kucheryavenko V.V., Kucheryavenko R.O.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

Godowsky O.V.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains, Kyiv

Were presents the results of commission testing of infecti us rhinotracheitis, parainfluenza-3 and bovine viral diarrhea in active at edvaccine "Rypavak-3"

УДК 576.851.47.078.39

МЕТОДИЧНІ ПІДХОДИ ЩОДО ОЗНАЧЕННЯ ЛЕЦИТИНАЗНОЇ АКТИВНОСТІ У МІКРООРГАНІЗМІВ, ЗДАТНИХ ДО РОЙННЯ (НА ПРИКЛАДІ БАКТЕРІЙ РОДУ *PROTEUS*)

Мартиросян І.О.

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

Вивчення особливості патогенезу протейних гнійно-запальних інфекцій та роль у ньому лецитинази збудника. Лецитиназу активність серед штамів *P. vulgaris* виявили 44,44 %, серед штамів *P. mirabilis* – 91,66 %. Було розроблене тверде поживне середовище, високочутливе та придатне для використання для одночасного виявлення лецитиназної активності та пригнічення роїння. Використання запропонованого середовища в мікробіологічній практиці дозволить підвищити якість досліджень.

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. Указані ферменти каталізують гідролітичне розщеплення фосфоліпідів, фосфоліпаза А діє безпосередньо на лецитин, у практиці мікробіології вона означена терміном лецитиназа.

На сьогодні чітко означено чотири види лецитиназ: А, В, С і D. Патогенні бактерії в більшості своїй продукують лецитиназу 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 лецитинази в патогенезі патологічних 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 лецитинази грамнегативними бактеріями, здатними до роїння на щільному поживному середовищі (на прикладі бактерій роду *Proteus*).

Матеріали та методи досліджень. 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. 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 $t=45^{\circ}\text{C}$, 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 лецитиназної активності мікроорганізмів – жовтково-сольовий агар (ЖСА) – селективне для протей, пригнічує їх ріст і тому не може бути використаним з метою означення їх лецитиназної активності. Отже, на першому етапі дослідження поставлено задачу створити нове живильне середовище для одночасного вияву лецитиназної активності та пригнічення роїння протей.

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

Використано поживне середовище із гідролізату еритроцитарної маси, скомпоноване науковцями ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. 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 % (рН 7,2). Основу автоклавують 20 хв при 1 атм., після досягнення $t=45^{\circ}\text{C}$ 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 в середовищі і перешкоджають прояву феномену роїння.

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

Для реалізації одного з етапів дослідження, оснований 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 па 1 мл. центрифугату

5 – добової бульйонної культури протею, яка була попередньо відцентрифугована при 5 тис обертів на хвилину впродовж 20 хвилин. Штатив із пробірками розміщували у термостаті при 37 °С. За міру активності вважали термін до моменту появи повного просвітлення дослідного розчину.

Штами вважали за неактивні по критерію продукції лецитінази, якщо просвітлення жовткової суміші не настало впродовж однієї години, за мало активні рахували, якщо просвітлення спостерігалось у термін від 20 до 40 хвилин, за активні – до 20 хвилин і високоактивні – при просвітленні суміші менш, ніж за 5 хвилин.

Результати досліджень та їх обговорення. Для дослідження лецитіназної активності протеїв на щільних поживних середовищах використовували 18-годинну культуру мікробів. Суспензію готували у 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. В якості контролю на кожную 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 (табл. 1).

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

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

Примітка: « + » – наявність ознаки, «—» – відсутність ознаки

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

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

Висновки. 1. Мікроорганізми роду *Proteus* володіють достатньо високою лецитіназною активністю, яка залежить від походження штамів і 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 в протеїв, а в інших видів мікроорганізмів, що здатні роїтись.

Список літератури

1. Dennis, E.A. The enzymes [Text] / E.A. Dennis // N.Y.- L. – 1983. – 3 ed. – Vol. 16. – P. 307–353.
2. The antibacterial activity of phospholipase A(2) type IIA is regulated by the cooperative lipid chain melting behavior in *Staphylococcus aureus* [Text] / J. Ocampo [at al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2010. – Vol. 1798(6). – P. 1021–10288.
3. Aronson, A.I. Plasmid-Encoded Regulator of Extracellular Proteases in *Bacillus anthracis* [Text] / A.I. Aronson, C. Bell, B. Fulroth // *J. Bacteriol.* – 2005. – Vol. 187. – P. 3133–3138.
4. Steffen, E.K. Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections [Text] / E.K. Steffen, D.J. Hentges // *J. Clin. Microbiol.* – 1981. – Vol. 14. – P. 153–156.
5. Temaru, E. Clostridium tetani is a Phospholipase (Lecithinase)-Producing Bacterium [Text] / E. Temaru, S. Shimura, T. Karasawa // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 2024–2025.
6. Belas, R. *Proteus mirabilis* Detective in Swarmer Cell Differentiation and Multicellular Behavior [Text] / R. Belas, D. Erskine, D. Flaherty // *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* [Текст] / Т.П. Осолодченко, І.Ю. Кучма, А.Ю. Волянський і співавт. (Україна). – № 200613244 ; заявл. 14.12.2006 ; опубл. 10.05.2007.
8. Нестерова, Г.Н. Биология протей [Текст] : учеб. пособие / Г.Н. Нестерова. – Горький : ГГУ, 1972. – 88 с.

**THE METHODS OF DETERMINING LECITHINASE ACTIVITY IN MICROORGANISMS CAPABLE OF SWARMING
(ON THE BACTERIA OF THE GENUS PROTEUS)**

Martirosyan I.O.

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

The aim of the study was a research of features of Proteus pathogeny festering -inflammatory infections and role exciter 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 discovery of lecithinase activity and suppression of swarming. The use of this nutrient medium in microbiological practice will allow promoting quality of researches.

УДК 619:638.154.2

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ НОМЕНКЛАТУРА (ТАКСОНОМИЯ) И КЛАССИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ ПЧЕЛ
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)**

Маслий И.Г., Стегний Б.Т.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Матковская С.Г.

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Биологическая номенклатура (таксономия) – общепризнанная система правил наименования живых организмов. Это универсальная и устойчивая система, употребляемая в различных областях науки и техники [7, 12, 14, 15].

Таксономия – теория классификации и систематизации, рассматривает методы и правила классификации. Таксономическая единица (Таксон) – любая классификационная единица в систематике (семейство, род, вид и т.д.).

Классификация – систематизация на основе процесса его исторического развития с последующим разделением на группы по сходным признакам, повторяющимся из поколения в поколение.

Классификация вирусов чрезвычайно подвижная система. Получаемые новые знания о вирусах – структурной и молекулярной организации, особенностях репликации, филогенетических взаимоотношениях – служат основанием для ее перестроек. Постоянно ведется работа по изучению новых вирусов. Происходит перераспределение вирусов в пределах семейств, создаются новые семейства. Всю проводимую работу фиксирует и узаконивает МКТВ (ICTV) – международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses) [7, 12, 14, 15].

Современная классификация является универсальной для всех – вирусов позвоночных, беспозвоночных, растений, простейших и прокариотов.

Она основана на фундаментальных свойствах вирионов.

В основу современной классификации положены следующие критерии: тип нуклеиновой кислоты, ее структура; наличие липопротеиновой оболочки; стратегия вирусного генома; размер и морфология вирионов, тип симметрии, число капсомеров; феномены генетических взаимодействий; круг восприимчивых хозяев; патогенность (в т.ч. и патологические изменения в клетках, образование внутриклеточных включений); географическое распространение; способ передачи; антигенные свойства.

Ведущими являются признаки, характеризующие нуклеиновую кислоту, морфологию, стратегию вирусного генома и антигенные свойства.

Каждая группа признаков детализируется в зависимости от уровня знаний и степени изученности конкретного вируса.

Известна The LHT System of Virus Classification, которая основана на химических и физических символах, таких как нуклеиновые кислоты (ДНК или РНК), симметрия (спиральный, кубический или комплексный тип), наличие суперкапсида, диаметр капсида, количество капсомеров. Аббревиатура названия данной классификации состоит из фамилий авторов (Lwoff, Horne and Tournier).

Она заключается в следующем:

ТИП (Phylum)

Vira – царство ВИРА