

МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ, ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ ТВАРИН

УДК 579.672: 579.842.1/.2

ВИВЧЕННЯ АНТИБІОТИКОЧУТЛИВОСТІ ШТАМУ БАКТЕРІЙ *ENTEROBACTER SAKAZAKII* M1

Бергілевич О.М.

В статті наведено результати вивчення чутливості штаму бактерій *E. Sakazakii* M1 стосовно антибіотичних речовин. Попередньо штам було виділено та ідентифіковано з сирого збірного молока та задепонованов колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів. Результати проведених досліджень показали, що штаму бактерій *E. sakazakii* M1 чутливий до лінкоміцину, помірностійкий до олеандоміцину, левоміцитину, цефотаксму. Проте, даний штам виявився резистентний до більшості використаних в досліді антибактеріальних препаратів, а саме до ванкоміцину, еритроміцину, неоміцину, енроксилу, рифампіцину, налідиксової кислоти.

Постановка проблеми в загальному вигляді. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотичних речовин є дуже важливим моментом в боротьбі із збудниками захворювань людини і тварин. Особливо це є актуальним є у випадку виникнення атибіотикорезистентності мікроорганізмів.

На сьогодні у світі *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp.*) визнано емерджентним патогенним мікроорганізмом, який навіть в невеликих кількостях являє собою загрозу для здоров'я споживачів і його визначення є обов'язковим на при виробництві сухих дитячих сумішей. Бактерії *Enterobacter sakazakii* широко поширені в навколишньому середовищі і потрапляють в сировину та під час виготовлення харчових продуктів з водою, пилом, повітрям, з рук працівників та технологічного обладнання [5].

Тому ці мікроорганізми слід розглядати, як потенційні забруднювачі харчових продуктів протягом харчового ланцюга їх виробництва. А детальне вивчення властивостей цього мікроорганізму є актуальним завданням [1,4,6].

Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. В останні 25 років у високо розвинутих країнах світу, в тому числі Великобританії, Бельгії, Франції, США, Нідерландах все частіше реєструються випадки летальності серед новонароджених дітей з ознаками менінгіту, сепсису та некротичного ентероколіту, які пов'язують з вживанням сухих молочних сумішей для дитячого харчування, з яких було виділено патогенний збудник із родини *Enterobacteriaceae* - *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter spp*) [3,4,6]. Також цей мікроорганізм виділяють із сировини та різноманітних харчових продуктів, а саме: сирого молока, молочних продуктів, сухого молока, м'яса та м'ясних продуктів, сирих та готових овочів та фруктів, спецій та напоїв під час порушення санітарно-гігієнічних умов виробництва. Природними джерелами *E. sakazakii* є фекалії тварин, вода, ґрунт, гризуни та комахи [5].

Було встановлено, бактерії *E. sakazakii* є мають природню стійкість до всіх макролідів, лінкоміцину, кліндаміцину, стрептограміну, рифампі-

цину, фосфоміцину, проте чутливі до аміноглікозифів, тетрацикліну, хлорамфеніколу [7].

При вивченні антибіотикочутливості виділених ізолятів *E. sakazakii* з різних клінічних матеріалів (мокроти, шкіра, фекалії, перитоніальна рідина, слизова оболонка ока) при спалаху захворювання 13 малюків у Франції у 1994 році було встановлено їх чутливість до ціпрофлосаніну, амікацину, гентаміцину, піперацину та тріметопіму та стійкість до доксицикліну [3].

Встановлено, що найбільш дієвими при лікуванні інфекцій викликаних *E. Sakazakii* є ампіцилін-гентаміцин або ампіцилін-хлорамфенікол та цефотаксим і цефуроксим [3,6].

Метою досліджень було вивчити чутливість до антибіотиків штаму бактерій *Enterobacter sakazakii*.

Матеріал і методи досліджень. Матеріалом для дослідження був штам бактерій *E. sakazakii* M1, який вперше в Україні був виділений з сирого збірного молока корів та за депонований в колекції Національного центру штамів мікроорганізмів Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів (м. Київ) під реєстраційним номером 503 (Свідотство на штам від 17.11.2010р). Зазначений штам має добре виражені характерні для даного виду мікроорганізмів стабільні морфологічні, культуральні та біохімічні властивості.

Для вивчення антибіотикочутливості вищезазначеного штаму використовували диско-дифузійний метод. В основу методу покладена дифузія антибіотику з паперового диска у щільне живильне середовище (МПА), в яке попередньо було внесено 1 см³ мікробної суспензії бактерій *E. sakazakii* на фізрозчині, з концентрацією бактеріальних клітин 1,5 x 10³ КУО/см³, що при відповідає стандарту мутності 0,5 за МакФарландом і встановлюється за допомогою денсіламетра. Мікробну суспензію готували з добової агарової культури, яку змивали фізрозчином. Так як, диско-дифузійний метод дозволяє лише опосередковано зробити висновок про антибіотикочутливість мікроорганізму, то результатом дослідження є віднесення мікроорганізму до однієї з

категорій чутливості: чутливий, помірно-стійкий або резистентний [2].

Інтерпретацію результатів визначення чутливості штаму бактерій *Enterobacter sakazakii* до антибіотиків проводили по граничних значеннях діаметрів зон пригнічення росту в мм згідно методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів" (табл.1).

Таблиця 1

Критерії інтерпретації результатів визначення чутливості штаму бактерій *Enterobacter sakazakii* до антибіотиків

Діаметр зон пригнічення росту мікроорганізму, мм		
чутливий	помірно-стійкий	резистентний
≤12	13 - 17	≥18

Результати досліджень. Встановлено, що штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 має такі характеристики.

Морфологічні властивості: грамнегативні, рухливі палички (перетрихи). Спор та капсул не утворює. Клітини мікроорганізму маю розміри до 2 – 3 мкм в довжину та до 1 мкм в ширину (рис.1 та рис.2).

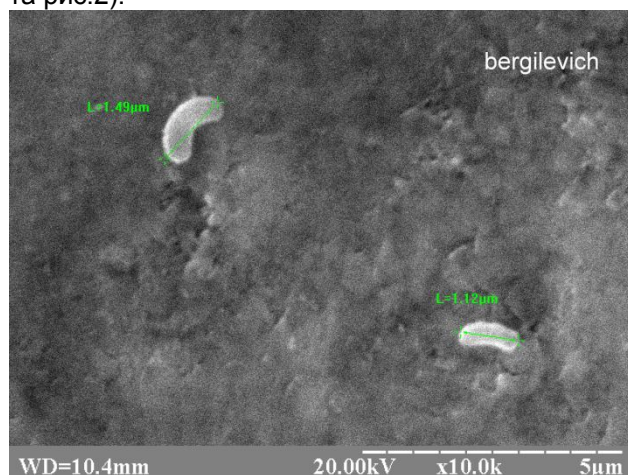


Рис.1.Поодинокі клітини штаму бактерій *Enterobacter sakazakii*M1 (растровий електронний мікроскоп)

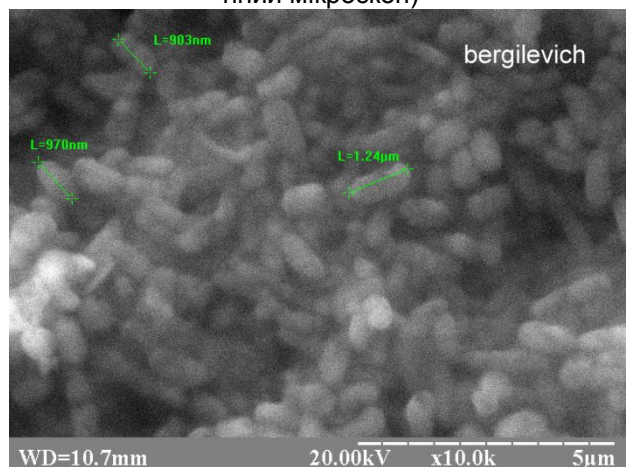


Рис.2. Скупчення клітин штаму бактерій *Enterobacter sakazakii*M1 (растровий електронний мікроскоп)

Культуральні властивості: факультативний анаероб. Температурні межі росту цього штаму сягають від мінімальних 5 – 8°C до максимальних 41 – 45°C, оптимальна температура 37 – 44°C. Росте на живильних середовищах для ентеробактерій: бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* по Масселю, глюкозо-жовчному агарі з кристал віолетом та нейтральним червоним, триптон-соевому агарі.

При культивуванні на бульйоні збагачення для бактерій родини *Enterobacteriaceae* по Масселю ріст штаму відмічається у вигляді помутніння бульйону та зміни кольору бульйону з зеленуватого на жовтуватий.

При культивуванні на глюкозо-жовчному агарі з кристал віолетом утворює за температури 36°C пурпурні колонії на 24 годину культивування.

При культивуванні на триптон-соевому агарі за температури 25°C утворює гладкі мукоїдні колонії жовтого кольору розміром в діаметрі 1 – 2 мм на 24 годину культивування, та діаметром 2 – 3 мм – на 48 годину.

Біохімічні властивості: характерні для бактерій роду *Enterobacteriaceae* оксидазонегативний, каталазопозитивний, утворює кислоти (ферментація) з глюкози, лактози, негативна реакція на D-сорбітол (табл.2).

Таблиця 2

Біохімічні властивості штаму бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 (результати RapiD 20E-тесту)

Тест	<i>E. sakazakii</i> M1
Оксидаза	-
Каталаза	+
Лізіндекарбоксилаза	-
Орнітиндекарбоксилаза	+
Уреаза	-
Утилізація цитратів	+
Глюкозидаза	+
Аргініндегідролаза	+
Реакція Фогес-Проскауера	+
Індол	-
Глюкоза	+
Лактоза	+
Сахароза	+
Дульцит	-
Адонит	-
Рафіноза	(+)
D-сорбітол	-
Мальтоза	+
Маніт	+

Для повної характеристики даного штаму ви вивчили його чутливість до антибактеріальних препаратів. Результати цієї роботи наведені в таблиці 3.

Як видно з таблиці 3 досліджуваний штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 був чутливий до лінкоміцину, помірно-стійкий до олеандоміцину, левоміцитину, цефотаксму.

Таблиця 3
Результатів вивчення антибіотикочутливості штаму бактерій *Enterobacter sakazakii* до антибіотиків

Антибактеріальні препарати	Діаметр зон пригнічення росту мікроорганізму, мм	Чутливість
Налідиксова кислота	35±0,67	резистентний
Рифампіцин	35±0,34	резистентний
Енроксил	34±0,12	резистентний
Неоміцин	34±0,22	резистентний
Еритроміцин	30±0,54	резистентний
Ванкоміцин	30±0,43	резистентний
Цефотаксим	17±0,22	помірно-стійкий
Левоміцитин	15±0,24	помірно-стійкий
Олеандоміцин	12±0,56	помірно-стійкий
Лінкоміцин	10±0,14	чутливий

Штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 виявився резистентний до більшості використаних в

досліді антибактеріальних препаратів, а саме до ванкоміцину, еритроміцину, неоміцину, енроксилу, рифампіцину, налідиксової кислоти.

Висновки

1. Вивчено морфологічні, біохімічні властивості та антибіотикочутливість нового штаму бактерій *Enterobacter sakazakii* M1, який може викликати харчові захворювання у людей.

2. Встановлено, що штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 має характерні для даного виду біохімічні властивості, а саме, це глюкозидазна активність (утворення кислоти із α -метил-D-глюкозиду), негативна реакція на оксидазу та D-сорбітол.

3. Встановлено, що штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 був чутливий до лінкоміцину, помірно-стійкий до олеандоміцину, левоміцитину та цефотаксиму.

4. Найбільшу чутливість штам бактерій *Enterobacter sakazakii* M1 проявив ванкоміцину, еритроміцину, неоміцину, енроксилу, рифампіцину, налідиксової кислоти, при цьому зона затримки росту становила від 30±0,54 мм до 35±0,67 мм.

Література

1. Бергілевич О.М. Методологічні підходи щодо оцінки мікробіологічного ризику *Enterobacter sakazakii* [Текст] / О. М. Бергілевич // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.С. Гжицького. Том 11 №2 (41). Ч. 4., 2009. – Львів— С. 3 – 7.
2. Методичні вказівки "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. Затверджено Наказом № 167 МОЗ України 05.04.2007.
3. Caubilla-Barron J. E. Genotypic and Phenotypic Analysis of *Enterobacter sakazakii* Strains from an Outbreak Resulting in Fatalities in a Neonatal Intensive Care Unit in France [Text] / Caubilla-Barron J. E. Hurrell, S. Townsend, P. // JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2007. – P. 3979–3985.
4. FAO/WHO *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. [Text] / Meeting Report. Microbiological risk assessment series, 2004. – 6с.
5. Friedemann M. *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder) [Text] / Friedemann M. // International Journal of Food Microbiology. – V. 116. – 2007. – P.1–10.
6. Lai K. K. *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults - Case reports and a review of the literature [Text] / Lai K. K. // Medicine, 2001. – 80. – P.113 – 122.
7. Stock I. Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains [Text] / Stock I, Wiedemann B. // Clin Microbiol Infect, 2002. – 8. – P.564 – 578.

УДК 619:616.961.55.635.4

ВИВЧЕННЯ АКТИВНОСТІ ОН- І О-АНТИГЕНІВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Бойко О.П.

В статті наведені результати дослідження активності ОН- і О-антигенів *Ps. aeruginosa*. Встановлено, що обидва антигени при внутрішньовенному введенні з триденним інтервалом у зростаючих дозах стимулюють у тварин-донорів утворення достатньо високих титрів антитіл, що дозволяє рекомендувати цю схему для отримання імунних сироваток проти *Ps. aeruginosa*. Реакція непрямой імунофлуоресценції може слугувати як ефективний імунологічний метод ретроспективного аналізу псевдомонозної інфекції.

Постановка проблеми. Діагностика псевдомонозної інфекції ґрунтується головним чином на виділенні та ідентифікації *Ps. aeruginosa* класичними бактеріологічними методами, які є довготривалими, трудомісткими і не завжди ефективними [1, 2, 3].

В доступній нам літературі ми знайшли лише одну роботу, присвячену використанню мето-

ду флуоресціюючих антитіл (МФА) для індикації та ідентифікації збудника псевдомонозної інфекції [4].

МФА застосовується у ветеринарній та медичній практиці для виявлення збудників ряду інфекційних захворювань, зокрема вірусних (герпес, ящур, грип, сказ, інфекційний ринотрахеїт) та бактеріальних (сибірка, бруцельоз, лістеріоз, са-