

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА И СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Прудников А.Р., Окулич В.К.

*Витебский государственный медицинский университет,
кафедра клинической микробиологии, г. Витебск*

Резюме. Разработана методика определения способности микроорганизмов синтезировать эластазу. Установлена способность всех штаммов синегнойной палочки и большей части стафилококков продуцировать эластазу, что можно использовать для идентификации данных микроорганизмов в микробиологических лабораториях.

Ключевые слова: эластаза, микроорганизмы

Resume. We developed the technique of determining the ability of microorganisms to synthesize elastase. Installed capacity of all strains of *Pseudomonas aeruginosa* and most of staphylococci produce elastase, which can be used for identification of these microorganisms in microbiological laboratories.

Keywords. elastase, microorganisms

Введение. В основе всех метаболических реакций в бактериальной клетке лежит деятельность ферментов. Большинство гидролаз являются экзоферментами, которые, выделяясь в окружающую среду, расщепляют крупные молекулы до мономеров и димеров, способных проникнуть внутрь клетки и обеспечивают ее источниками углерода и энергии. Также экзоферменты являются факторами агрессии и инвазии и помогают микроорганизмам преодолевать защитные барьеры макроорганизма. Одним из таких факторов является фермент эластаза. Она участвует в деградации матриксных белков - эластина, коллагена, фибронектина, ламинина, протеогликанов. Кроме того, эластаза расщепляет многие растворимые протеины - иммуноглобулины, факторы коагуляции, компоненты комплемента и многие протеазные ингибиторы [1].

Особенности патогенеза заболеваний, вызванных различными микроорганизмами, частично определяются их ферментативный спектр, который является таксономическим признаком, что в свою очередь помогает в идентификации бактерий. Например, не все микроорганизмы могут синтезировать эластазу, и только некоторые штаммы синегнойной палочки (IFO 3455, TM13, TM14, TM 49, TM 97) способны на это [3].

Для своевременного назначения лечения и определения комплекса противоэпидемических мероприятий, необходимо в максимально короткие сроки поставить этиологический диагноз и определить факторы патогенности. Внедрение в практику современных методов идентификации бактерий, позволяет в какой-то мере разрешить существующую проблему.

Цель: Разработать метод определения эластазной активности микроорганизмов и апробировать его на клинических изолятах синегнойной палочки и золотистого стафилококка.

Материалы и методы исследования.

Исследована эластазная активность 25 штаммов микроорганизмов, из которых 6 штаммов были *Staphylococcus aureus* и 19 – *Pseudomonas aeruginosa*.

Штаммы микроорганизмов были получены от пациентов, находившихся на лечении в ожоговом, гнойном хирургическом отделениях и РАО на базе Витебской областной клинической больницы.

Патологический материал забирался из гнойного очага ватным тампоном. Тампон в дальнейшем помещался в стерильную пробирку. Для выделения стафилококков применяли высокоселективный желточно-солевой агар с азидом натрия. При выделении бактерий псевдомонад - среду ЦПХ с N-цетилпиридиния хлоридом.

Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux». Для идентификации микроорганизмов использовали выделенную чистую культуру. Материалом служили изолированные колонии на чашке или чистые культуры в пробирке. Из них готовили суспензию в концентрации стандарта оптической плотности. Далее раствор суспензии вносили в лунки со средами данной тест-системы и следовали инструкции по применению.

При идентификации использовались стрипы: ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 GN – для псевдомонад. Исследования проводили в соответствии с прилагаемыми к тест-системам инструкциями.

Расчет показателя средней величины (M) и стандартного отклонения (σ) производился при помощи программы Statgraph 2.0.

Результаты исследования.

Ранее нами была разработана методика определения эластазной активности биологических жидкостей [4].

В качестве субстрата использовался эластин-Конго красный. Эластаза расщепляла эластин, и конго-красный переходил в раствор, изменяя его цвет с бесцветного на красный с максимальным спектром поглощения при длине волны 495 нм (рисунок 1).

Разработанная ранее нами методика не позволяла определять способность бактерий к синтезу эластазы, т.к. при переходе Конго красного в раствор рост и синтез ферментов микроорганизмами прекращался. Поэтому процессы синтеза эластазы бактериями и взаимодействие эластазы с субстратом были разделены.

1. На первом этапе производился посев культуры, выделенной от пациентов с панкреатитом, на скошенный агар.

2. Посев культуры на среду Мюллер-Хинтона содержащую 2% желатина. Данный субстрат был выбран из-за его доступности. При этом активировался адаптивный синтез эластазы микробами.

3. После инкубации 400 мкл жидкости, содержащей микроорганизмы и продуцированную ими эластазу, перемещали в эппендорфы и центрифугировали 1 тыс. об./мин. в течение 10 мин.

5. В эппендорфы вносили последовательно: 400 мкл раствора эластин-Конго красного в концентрации 0,8 мг на 1 мл на трис-НСIбуфера (C=0,2M) с рН 7.4 и 100 мкл надосадочной жидкости. Контрольные пробы, содержали 400 мкл буферного раствора с рН 7,4 и 100 мкл надосадочной жидкости.

6. Инкубацию проб проводили в термостате при $t=37^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов.

7. После инкубации пробы извлекали из термостата и центрифугировали.

8. Из надосадка брали в дублях по 150 мкл раствора и переносили в лунки 96 луночного полистиролового планшета.

9. Планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495) определяли оптическую плотность раствора в лунках.

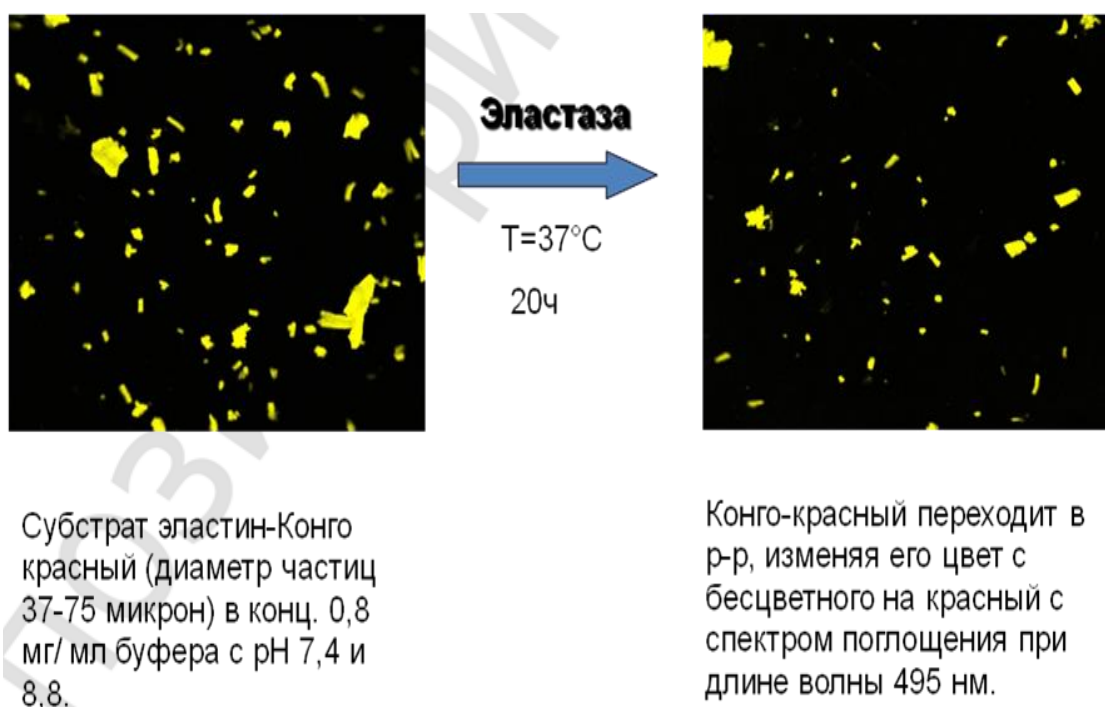


Рис. 1 – Снимок частиц эластазы до и после инкубации, полученный на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE

Промежуточный результат выражался в оптических единицах и рассчитывался как разница оптических плотностей опытных проб и соответствующих им контрольных.

Для пересчета полученных результатов в пикокаталы нами была использована формула, выведенная после построения калибровочного графика по разведенному Конго красному, в котором была отражена зависимость активности фермента от оптической плотности раствора, исходя из того, что при расщеплении 1 молекулы субстрата, в раствор переходит 1 молекула Конго красного.

$$Y = [-0,00117 + 0,0346 \times E_{\text{оп}}] \times 9,92$$

Где Y – искомый результат;

$E_{оп}$ – оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

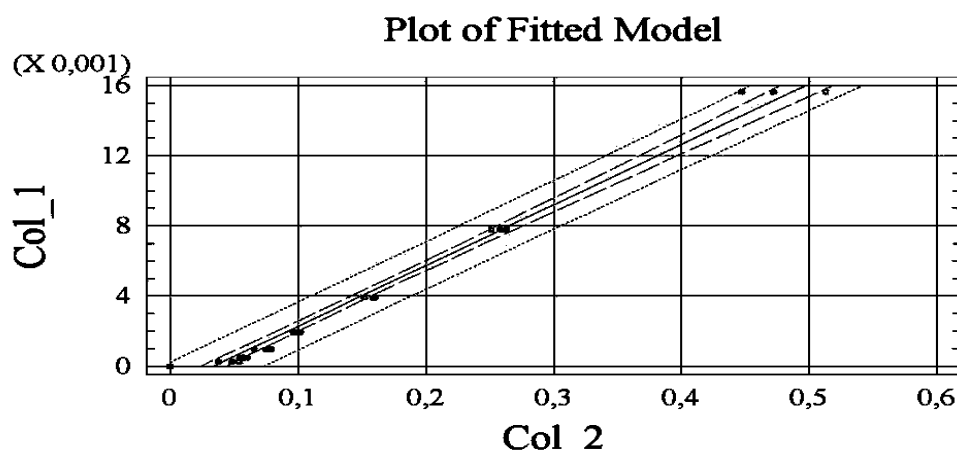


Рис. 2 - Калибровочный график для определения эластазной активности

При помощи данной методики была исследована эластазная активность 25 штаммов микроорганизмов, из которых 6 штаммов были *Staphylococcus aureus* и 19 – *Pseudomonas aeruginosa*.

Установлено, что все штаммы золотистого стафилококка обладали эластазной активностью, а у синегнойной палочки из 18 штаммов данная активность присутствовала только у 15 изолятов (83,3%).

Эластазная активность у штаммов синегнойной палочки составила $0,027 \pm 0,03$ пкат, а у штаммов золотистого стафилококка $0,041 \pm 0,02$ пкат (рисунок 3).

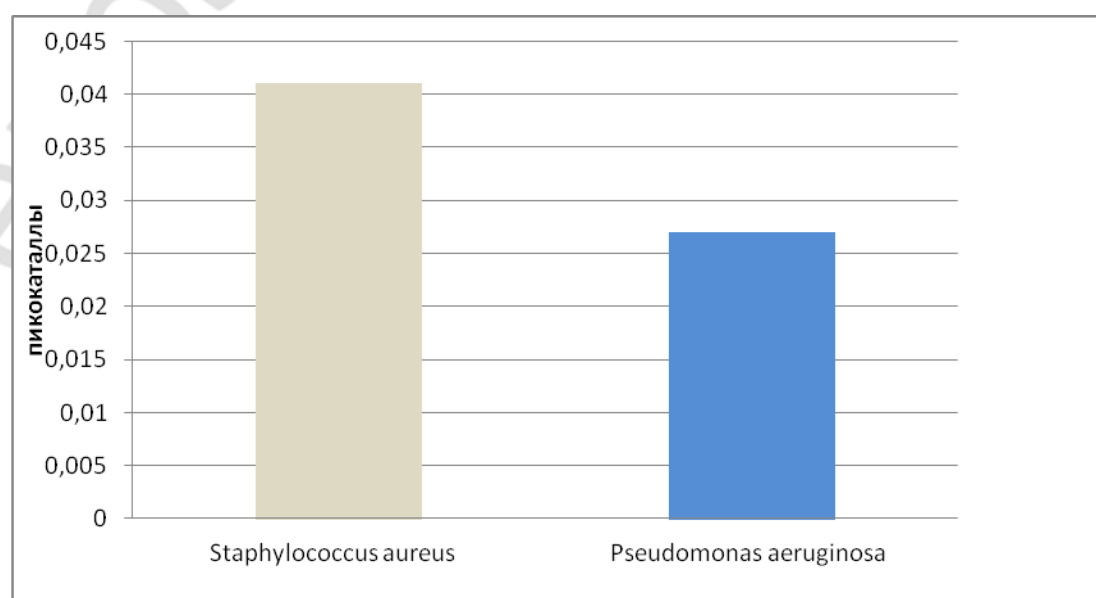


Рис. 3 - Эластазная активность различных микроорганизмов

Выводы:

1. Разработана методика определения эластазной активности микроорганизмов.

2. Установлено, что все штаммы золотистого стафилококка и 83,3% штаммов синегнойной палочки обладают эластазной активностью со средними значениями $0,041 \pm 0,02$ пкат и $0,027 \pm 0,03$ пкат соответственно.

Литература

1. Супотницкий М. Микроорганизмы, токсины и эпидемии / М. Супотницкий. – Москва: Вузовская книга, 2000. – 376 с.

2. Роль нейтрофильной эластазы в патогенезе хронической обструктивной болезни легких // Цитокины и воспаление [Электронный ресурс] – 2015. - - - Режим доступа: <http://www.cytokines.ru/2007/4/Art1.php> - дата доступа : 12.09.2015.

3. Morihara K., Tsuzuki H, Production of protease and elastase by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients. / K Morihara., H Tsuzuki // *Infection and immunity*, - 1977. – Vol 15(3), pp 679-85.

4. Методика определения активности эластазы в биологических жидкостях: инструкция на метод; рег.: №66/ А.В. Корнилов, Ю.Г. Савкина, В.К. Окулич . – 2011.