

УДК 579.022.033.043

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА

Кривохижая М.В.¹, Наврулин В.О.¹, Калиниченко Е.О.², Воробьева Л.И.¹

1 - Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

2 - ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И.И. Мечникова АМН Украины»

Стафилококки представляют собой грамположительные неподвижные факультативные анаэробные кокки, которые способны расти в присутствии высокой концентрации соли (10-15%) [1, 2].

Наибольшее значение в патологии человека имеет *Staphylococcus aureus* - золотистый стафилококк (при росте на твердых питательных средах вырабатывает каротиноиды, окрашивающие колонии в золотистый цвет). По данным литературы, здоровое носительство золотистого стафилококка в нижних носовых ходах наблюдается у 70—90% обследованных лиц, у некоторых из них (20%) носительство может продолжаться длительное время [3-6]. Среди носителей особую опасность представляют медицинские работники лечебно-профилактических учреждений хирургического и акушерского профиля [3, 5, 6].

В патогенезе развития стафилококкового заболевания играют роль два фактора — состояние иммунной системы макроорганизма и вирулентность возбудителя. Для колонизации организма и защиты от иммунной системы хозяина стафилококки используют различные факторы агрессии [4, 5, 7, 8]. В частности, *S. aureus* продуцирует плазмокоагулазу (стафилокоагулазу) - фермент, участвующий в активации фактора VII свертывания крови, превращающего протромбин в тромбин, и подавляющий бактерицидные свойства сыворотки (сущность действия - превращение фибриногена в фибрин на поверхности бактериальных клеток, в результате чего образуемая фибриновая пленка предохраняет клетки от фагоцитоза); лецитовителлазу (лецитиназу) – энзим, расщепляющий лецитин (важный компонент клеточных мембран лейкоцитов), что приводит к дегрануляции полиморфонуклеарных нейтрофильных лейкоцитов и макрофагов [4-7, 9-13].

Вышеперечисленные признаки также являются ведущими тестами для идентификации патогенных штаммов стафилококков [1, 2, 14].

В медицинских учреждениях для обеззараживания широко используются бактерицидные лампы. Делящиеся клетки бактерий повреждаются УФ-излучением главным образом из-за денатурации белков и повреждения биологических мембран [1, 14-16]. Вместе с тем, клетки, находящиеся в покое, повреждаются менее всего, способны мутировать и давать начало штаммам, характеризующимся гетерогенностью патогенности [15, 16]. Исходя из вышеизложенного, изучение влияния УФ-излучения на из-

менчивость популяций микроорганизмов по факторам агрессии является актуальным.

Работа выполнена в рамках НИР ГУ «ИМИ им. И.И. Мечникова АМНУ» “Застосування електромагнітних полів (ЕМП) для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів”, № держреєстрації 0107U001639.

Материалы и методы

Для исследований использовали эталонный штамм *S. aureus* ATCC 25923, полученный из филиала Музея микроорганизмов ГУ «ИМИ им. И.И. Мечникова АМНУ» и циркулирующие штаммы золотистого стафилококка, предоставленные бактериологическими лабораториями СЭС г. Харькова. В эксперименты были взяты штаммы, синтезирующие пигмент стафилоксантин и продуцирующие ферменты лецитиназу и коагулазу.

Суспензию микроорганизмов готовили согласно стандарту мутности по шкале McFarland (1,0 ед.) с помощью прибора Densi-La-Meter (Lachema, Чехия). Синхронизацию культур проводили воздействием низкой температуры [17].

В качестве повреждающего фактора была использована ртутно-кварцевая лампа ПРК-4, которая обеспечивала диапазон длин волн ультрафиолетового облучения $\lambda=240-578$ нм.

Облучение микробной суспензии ультрафиолетом проводилось в кварцевых пробирках в течение 10, 20 и 30 минут. Облученные и контрольные культуры высевали на питательный агар (ПА) и культивировали 18 ч. при 37 °С. Исследовали не менее 30 изолятов каждого штамма.

Колониеобразующие единицы (КОЕ) определяли методом серийных разведений [14], синтез лецитиназы и стафилоксантина - общепринятыми методами [1, 14]. Изучение плазмокоагулазной активности проводили согласно методике количественного определения активности коагулазы с помощью серийных разведений [18]. Результаты учитывали по образованию сгустков через 18-20 часов, с последующим расчетом активности по формуле:

$$A = \frac{n + 2n}{2} \times 10, \quad \text{где} \quad (1)$$

A – активность коагулазы, усл. ед./ мл ;
n – максимальная степень разведения образца, в котором наблюдается образование сгустка.

Для статистического анализа полученных данных, были использованы программы STATISTICA 8.0.550 и Microsoft Office Excel 2003. Достоверность распределений определяли с помощью критерия Стьюдента, с вычислением средней величины (M), средней ошибки величины (m), значения достоверности (p). Для анализа полученных результатов проводилась его группировка по атрибутивным и вариационным признакам. При определении достоверности влияния фактора на исследуемые признаки

использовался дисперсионный анализ, для установления взаимосвязи признаков использовался корреляционный анализ [19]. В результате были получены абсолютные числа, которые выражали количественные и описательные признаки.

Результаты и обсуждения

В ходе исследований было установлено, что ультрафиолетовое излучение приводило к снижению колониеобразующих единиц у всех взятых в опыты штаммов стафилококков (табл.1). Так, колониеобра-

зующая способность у эталонного штамма золотистого стафилококка, уменьшалась в 1,07 раз при экспозиции 10 мин., в 1,27 раз при экспозиции в 20 мин., и в 2,8 раз при 30-ти минутном воздействии УФ-излучения. Что касается циркулирующих штаммов золотистого стафилококка №1 и №2, то количество клеток, способных к образованию колоний уменьшалось в 1,27 и 1,28 раз (соответственно) при 10-ти минутной экспозиции, при 20-ти минутной – в 1,15 и 1,23 раза, а при 30 минутном воздействии ультрафиолета – в 1,57 и 2,55 раза соответственно.

Таблица 1. Влияние ультрафиолета на колониеобразующую способность стафилококков

Штамм	Средние показатели жизнеспособности, lg (КОЕ/мл) (M±m)			
	Контроль	Время воздействия УФ-излучения, мин.		
		10	20	30
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	9,18±0,067	8,52±0,036	7,21±0,011	4,40±0,070
<i>S. aureus</i> , штамм №1	9,46±0,231	7,40±0,074	8,22±0,055	6,02±0,031
<i>S. aureus</i> , штамм №2	9,20±0,079	7,18±0,016	7,46±0,022	3,60±0,015
<i>S. aureus</i> , штамм №3	9,38±0,065	7,38±0,088	4,53±0,015	5,98±0,026

Примечание: *10⁹ – пересчет на степень разведения.

Для циркулирующего штамма №3 было отмечено снижение количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,26 раз при 10-минутной экспозиции, при 20 минутах количество клеток, способных к образованию колоний уменьшалось в 2,07 раз, а при 30 мин – в 1,56 раз (рис. 1). Согласно полученным

нами данным, для некоторых штаммов, характерно увеличение количества колониеобразующих единиц с увеличением экспозиции облучения ($F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$, при $p < 0.001$), что, по-видимому, связано с преодолением порога активации систем SOS-репарации.

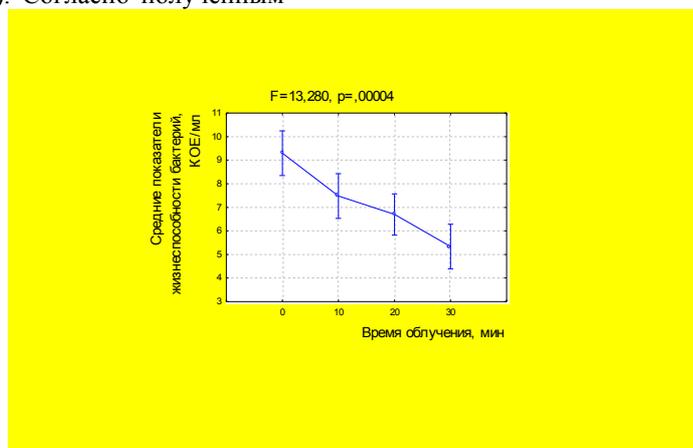


Рис. 1. Средние показатели зависимости жизнеспособности клеток *S. aureus* от экспозиции облучения

стафилоксантин защищает бактерии от атак нейтрофилов, позволяет противостоять действию синглетного кислорода в фагосомах [9].

При колонизации макроорганизма важным для патогенных стафилококков является синтез каротиноидов, обеспечивающих устойчивость бактерий к действию иммунной системы человека. Известно, что

стафилококков по способности образовывать золоти-

стый пигмент, установлено, что у штамма *S. aureus* ATCC 25923 только 81% изолятов синтезировали стафилоксантин, тогда как изоляты циркулирующих штаммов в 92-100% случаев обладали способностью продуцировать каратиноиды (табл. 2).

Облучение культур ультрафиолетом приводило к снижению синтеза стафилоксантина, вплоть до полной утраты (*S. aureus* ATCC 25923; *S. aureus*, штамм №2). Однако изоляты циркулирующих штам-

мов золотистого стафилококка №1 и №3, после 30-ти минутного воздействия УФ восстанавливали свою способность образовывать пигмент до исходных значений. Стафилоксантин является производным аналогов холестерина, продукция которого регулируется *rsbUVWsigB* системой и, как считается, осуществляется одним или несколькими белковыми субстанциями четырех генов *ORF1-orf4* (GenBank регистрационный номер X97985) [9-12].

Таблица 2. Влияние ультрафиолета на способность образовывать пигмент у штаммов *S. aureus*

Штамм	Количество изолятов, продуцирующих стафилоксантин, %			
	Контроль	Время воздействия УФ-излучения, мин.		
		10	20	30
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	81%	28%	0%	0%
<i>S. aureus</i> , штамм №1	97%	15%	54%	100%
<i>S. aureus</i> , штамм №2	100%	83%	13%	0%
<i>S. aureus</i> , штамм №3	92%	88%	48%	90%

При возникновении мутации хотя бы в одной из частей данной системы генов, синтез пигмента снижается или полностью ингибируется, что приводит к снижению вирулентности или жизнеспособности мутантных штаммов [11, 12, 20]. Поэтому целесообразно было провести дальнейшие исследования по изучению влияния УФ-излучения на факторы патогенности стафилококков (лецитиназу и плазмокоагулазу).

Экспериментально установлено, что все взятые в опыт изоляты синтезировали лецитиназу. Одна-

ко, после воздействия УФ-излучения изоляты эталонного штамма теряли способность продуцировать лецитовителлазу (табл. 3).

Нами была выявлена взаимосвязь между синтезом стафилоксантина и продукцией лецитиназы: обнаружена корреляция между этими признаками с коэффициентом Пирсона $r=0,56$ при $p=0,05$ (рис. 3), т.е. данные признаки изменяются прямо пропорционально, но изменения активности синтеза лецитовителлазы менее значимы, чем стафилоксантина.

Таблица 3. Влияние ультрафиолета на способность продуцировать лецитовителлазу у штаммов *S. aureus*

Штамм	Количество изолятов, продуцирующих лецитовителлазу, %			
	Контроль	Время воздействия УФ-излучения, мин.		
		10	20	30
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	100%	98%	72%	69%
<i>S. aureus</i> , штамм №1	100%	100%	100%	100%
<i>S. aureus</i> , штамм №2	100%	100%	100%	100%
<i>S. aureus</i> , штамм №3	100%	100%	100%	100%

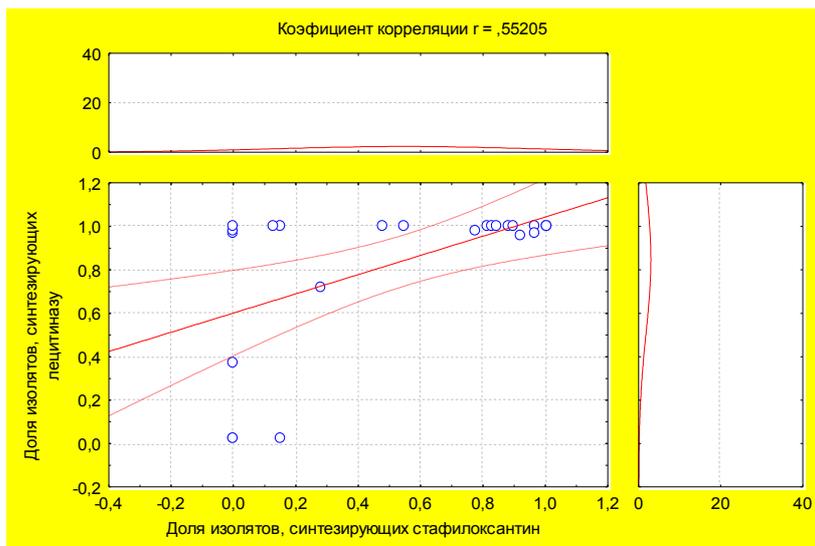


Рисунок 3. Зависимость изменчивости показателей синтеза стафилоксантина и лецитиназы

При изучении взаимосвязи между синтезом вышеуказанных признаков и жизнеспособности клеток бактерий взаимосвязи выявлено не было. Корреляция была довольно низкой, коэффициент Пирсона составил $r=0,15$ ($p=0,05$). Полученные статистические данные указывают на независимое изменение признаков.

Коагулазную активность была определена только у изолятов эталонного штамма золотистого стафилококка и составила 480 усл.ед/мл. Облучение ультрафиолетом привело к образованию колоний, обладающих повышенной, пониженной и не обладающих плазмокоагулазной активностью, т.е часть бактерий утрачивала способность коагулировать плазму (33,3-44,4% изолятов), а часть (33,3-66,6%) - увеличивала активность в 2 раза ($p=0,001$). (табл. 4).

Исходя из значений критерия Фишера и критерия Стьюдента, закономерно будет заключить, что изменения плазмокоагулазной активности *S. aureus* ATCC 25923 не зависят от длительности воздействия ультрафиолета, поскольку ответ сходен во всех взятых экспозициях (табл. 5, 6). Ответной реакцией на облучение было достижение крайних значений данной выборки. Из них 55% колоний достигали минимальных значений (равны нулю), другие 45% достигали максимума (960 усл.ед/мл).

На примере плазмокоагулазной активности можно проследить особенности адаптивного ответа стафилококков. Так, отклонения от контроля указывают на то, что при воздействии неблагоприятного фактора, такого, как ультрафиолет, увеличивается разнообразие организмов с крайними значениями признака, в данном случае, активности плазмокоагулазы (рис. 4).

Таблица 4. Влияние ультрафиолета на коагулазную активность стафилококков

№ опыта	Активность плазмокоагулазы, усл.ед/мл			
	Контроль	Время воздействия УФ излучения, мин		
		10	20	30
1	480	240	960	960
2	480	0	0	15
3	480	960	960	0
4	480	960	0	60
5	480	960	960	960
6	480	480	960	960
7	480	0	0	0
8	480	0	960	0
9	480	0	960	960

Таблица 5. Значение критерия Фишера(F) для плазмокоагулазной активности *Staphylococcus aureus*

$F_{S_{20}/S_{10}}$	1,27	$F_{расчет} < F_{факт}$ (0,001)
$F_{S_{30}/S_{20}}$	1,04	$F_{расчет} < F_{факт}$ (0,001)
$F_{S_{30}/S_{10}}$	1,32	$F_{расчет} < F_{факт}$ (0,001)

Таблица 6. Значение критерия Стьюдента(t) для плазмокоагулазной активности *Staphylococcus aureus*

$t_{10'/20'}$	0,2	$t_{расчет} < t_{факт}$ (0,001)
$t_{30'/20'}$	0,63	$t_{расчет} < t_{факт}$ (0,001)
$t_{30'/10'}$	0,08	$t_{расчет} < t_{факт}$ (0,001)

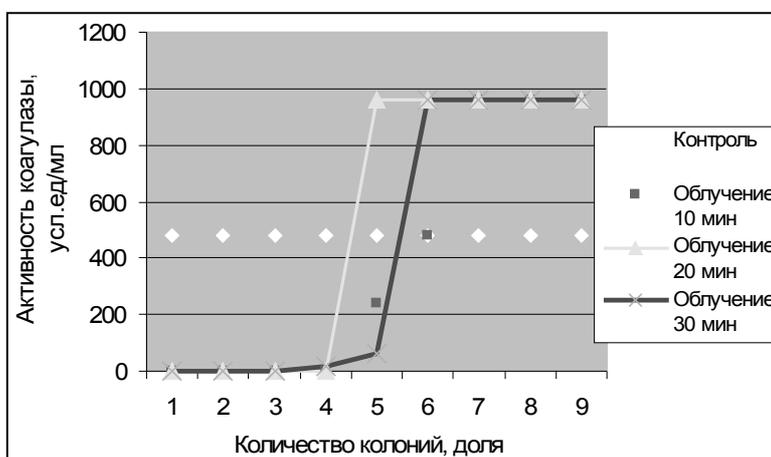


Рисунок 4. График зависимости активности плазмокоагулазы от времени УФ-облучения

В ходе исследований также было отмечено, что у обработанных УФ-излучением клеток *S. aureus* терялась характерная для стафилококков устойчивость к высокому осмотическому давлению. Это проявлялось в прекращении роста бактерий на элективном желточно-солевой агаре. Такие изоляты составили 2-4% от общего количества.

Выводы

1. Экспериментально установлено, что после воздействия УФ-излучения, у штаммов золотистых стафилококков разнопланово изменялась активность проявления факторов агрессии (синтез пигмента, продукция плазмокоагулазы и лецитиназы).
2. У 33-66% облученных изолятов плазмокоагулазная активность увеличивалась в 2 раза, а 33-44% изолятов теряли способность продуцировать данный фермент.
3. Появление изолятов-мутантов может приводить к ошибочному диагностическому заключению.

Список литературы

1. Лабинская А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических

исследований [Текст] : учеб. пособие для слушателей системы последиplomного образования / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ешина (Учебн.-метод. объедин. по мед. и фарм. образованию вузов России) М.: Медицина, 2005, 319 с.; ил.; – 3000 экз; ISBN: 5-225-046.

2. Поздеев О.К. Медицинская микробиология [Текст]: учеб. пособие для студентов мед. вузов / Поздеев О.К.; под. ред. Покровского В.И.– М.: ГЕОТАР-МЕД, 2008 – 784 стр. Предм. указ.: с. 736-753 – 20 000 экз. – ISBN: 978-5-9704-0794-3.

3. Замазій Т.М. Персистенція *Staphylococcus aureus* серед учнів медичного коледжу [Електронний ресурс] / Т.М. Замазій, О.М. Маланова, М.В. Кучма, Л.М. Руденко, Г.М. Большакова // Annals of Mechnikov Institute. -2010. - №1. С.30-33. – ISSN 1993-4327. – Режим доступу до журналу: <http://www.nbu.gov.ua/e-journals/AMI/2010/10ztmtpsa.pdf>.

4. Олексин А.В. Экологически важные свойства популяции микроорганизмов [Текст] / А.В. Олексин // Соровский образовательный журнал, сер. Биология, – 2001 – Т.7, № 8 – с 7-12. – Библиогр.: с 12.

5. Супотницкий М.В. Патогенность бактерий [Текст] / М.В.Супотницкий // Микроорганизмы, токсины и эпидемии. — 2-е изд. доп. М., 2005 — 376 с. : ил. — гл. 1,3. — Режим доступа: электронный ресурс — <http://supotnitskiy.ru/book/>.
6. Kauser F. Medical Microbiology [Text] / Kauser, F. H. Eckert J., Bienz K.A, Zinkernagel R.M.; preface: Kauser, F. — New York: Thieme, 2005 — 726p. 177 il.; 97 tabl. — Lit.: p. 659-662, index: p. 663-724. — ISBN 3-13-131991-7
7. Мельников Н.И. Ферменты патогенности и токсины бактерий [Текст] / Н.И. Мельников, В.Н. Мельников, М.Г. Гимранов. — М.: Медицина, 1969 — 252 с. — 2500 экз.
8. Пригожин И. Познание сложного. Введение [Текст] / И. Пригожин, Г. Николис Перевод с англ.: Пригожина И., — М.: Мир, 1990 — 344 с.; ил. — Библиогр.: с. 326-335с. — 16300 экз. — ISBN 5030015825. Перевод изд. Exploring complexity. An introduction/ G. Nicolis, I. Prigogine, W.H. Freeman and Company, 1989 — ISBN 0716718596, (в пер).
9. Liu G.Y. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity [Text] / Liu G.Y., Essex A., Buchanan J.T., // J Exp Med — 2005 July 18 — № 202 (2) — p.209-215.
10. Katzif S. CspA Regulates Pigment Production in *Staphylococcus aureus* through a SigB-Dependent Mechanism [Text] / Katzif S., Lee E. H., Law A. B. // Journal of Bacteriology — December 2005 — Vol. 187 — № 23 — p. 8181-8184.
11. Wieland B. Genetic and biochemical analyses of the biosynthesis of the yellow carotenoid 4,4'-diaponeurosporene of *Staphylococcus aureus* [Text] / Wieland B., Feil C., Maercker E.G., Thumm G, Lechner M, Bravo J M, Poralla K, Götz F // Journal of Bacteriology — December 1994 — Vol. 176 — №176(24) — p. 7719-7726.
12. Xiong Z. Carotenoid pigment levels in *Staphylococcus aureus* and sensitivity to oleic acid [Text] / Xiong Z., Kapral F. A // J Med. Microbiol — 1992 — Vol. 37 — p. 192-194.
13. Yotis W.W. The Behavior of Uv-Induced Coagulase-Positive and Negative Mutants of *Staphylococcus aureus* [Text] / Yotis W.W., Bertucci J., Fitzgerald T. // Yale Journal of Biology and Medicine — 1972 — № 45 — p. 150-162.
14. Герхард Ф. Методы общей бактериологии [Текст] : в 3ч. Ч 1. Методы общей бактериологии / Ф. Герхард. Перевод с англ. : Кондратьевой Е.Н., Калакутского Л.В. — М.: Мир, 1983 — 354с.; ил. Библиогр.: с 533-534. — 11 300 экз. — ИБ 3305. Перевод изд. Manual of Methods for General Bacteriology / P. Gerhardt. American Society for Microbiology, 1981 — DC 20006.
15. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий [Текст] : монография / И.А. Баснакьян; М.: Медицина,

2003. —136с.; ил. — Библиогр.: с 114-129 — ISBN: 5-225-04368-2.

16. Владимиров Ю. А. Инактивация ферментов ультрафиолетовым облучением [Текст] / Ю. А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал, сер. Биология, — 2001 — Т. 7, № 2 — С. 20-27. — Библиогр.: с 27.

17. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами [Текст] / Баснакьян И.А. — М.: Медицина, 1992. — С.29-59.

18. Никитин В.М. Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов [Текст] / В.М. Никитин. — Кишинев : Картя Молдовеняскэ, 1986. — 296 с. — 3000 экз. — ИБ № 3459.

19. Лакин Г.Ф. Биометрия [Текст] : учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Высшая школа, 1990 г., 352 с.; ил. Библиогр.: с 346-347 — Предм. указ.: 349-350. — 20000 экз; ISBN: 5-06-000471-6

20. Девис Р. Генетика бактерий [Текст] / Р. Девис, Д. Ботстайн, Дж. Рот, Перевод с англ.: Зографа Ю.Н. — М.: Мир, 1984, — 176с.; ил. -5000 экз. — ИБ 3993. Перевод изд. A Manual of genetic engineering. Advanced bacterial Genetic/ Ronald W.D., Botstein D., Roth R. R., Cold Spring Harbor, 1980.

УДК 579.022.033.043

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА ПОД ВЛИЯНИЕМ УЛЬТРАФИОЛЕТА

Кривохижая М.В., Наврулин В.О., Калинин Е.О., Воробьева Л.И.

Ультрафиолетовое излучение широко применяется для обеззараживания воздуха специальных помещений в лечебно-профилактических учреждениях. Поэтому, изучение действия УФ-излучения на факторы агрессии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов имеет важное значение для решения прикладных медицинских и биологических проблем. Проведенные исследования показали, что после воздействия УФ-излучения у отдельных изолятов золотистых стафилококков изменялись синтез пигмента, продукция лецитиназы и активность плазмокоагулазы. Появление мутантов может затруднять идентификацию патогенных штаммов и приводить к ошибочному диагностическому заключению.

Ключевые слова: золотистый стафилококк, ультрафиолетовое излучение, факторы агрессии

УДК 579.022.033.043

МІНЛИВІСТЬ ФАКТОРІВ ПАТОГЕНОСТІ ЗОЛОТАВОГО СТАФІЛОКОКУ ПІД ВПЛИВОМ УЛЬТРАФІОЛЕТА

Кривохижая М.В., Наврулін В.О., Калініченко О.О., Вороб'єва Л.І.

Ультрафіолетове опромінення широко застосовується для знезараження повітря спеціальних приміщень у

лікувально-профілактичних закладах. Тому, вивчення впливу УФ-опромінення на фактори агресії патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів має важливе значення для вирішення прикладних медичних і біологічних проблем. Встановлено, що після впливу УФ-опромінення у деяких ізолятів змінювались синтез пігменту, продукція лецитінази і активність плазмозмоагулази. Поява мутантів може утруднювати ідентифікацію патогенних штамів стафілококів і призводити до помілкових діагностичних заключень.

Ключові слова: золотавий стафілокок, ультрафіолетове опромінення, фактори агресії

УДК 579.022.033.043

VARIABILITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS PATHOGENICITY FACTORS UNDER THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET

Kryvohizhaya M.V., Navrulin V.O., Kalinichenko O.O., Vorob'yeva L.I.

Ultraviolet radiation is widely used for air disinfection facilities at special medical institutions. Therefore, studying the effects of UV radiation on pathogenic factors of aggression and shareware pathogenic microorganisms is important for resolving of medical and biological applied problems. Found that after exposure of UV radiation in some isolates changed pigment synthesis, production of letsitinazy and activity of plazmokoahulazy. The emergence of mutants could trouble the identification of pathogenic strains of staphylococcus and cause mistaken diagnostic conclusions.

Key words: *Staphylococcus aureus*, ultraviolet radiation, factors of aggression