

Введение Семейство Enterobacteriaceae включает более 50 родов, которые объединяют много видов патогенных и условно-патогенных для человека бактерий. По современной классификации три рода энтеробактерий, *Proteus*, *Morganella* и *Providencia*, объединяют в трибу Proteeae [1]. Представители этих родов вызывают оппортунистические и госпитальные инфекции различной локализации. Чаще всего это инфекции мочевыводительных путей, хотя возможны инфекции дыхательных путей, кожи, слизистых оболочек. Описаны случаи сепсиса, бактериемии и менингита [2,3]. *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* обладают различными факторами вирулентности – адгезинами, уреазой, фимбриями и др. [4]. Внеклеточная протеиназа *P. mirabilis* способна расщеплять иммуноглобулины и рассматривается как один из факторов вирулентности [5]. Данные о внутриклеточных протеиназах *Proteus* и о протеолитических ферментах бактерий р. *Morganella* и *Providencia* отсутствуют. Неизвестна роль протеолитических ферментов в вирулентности этих патогенов. Показано, что предобработка патогенных бактерий гомосеринлактоном приводит к повышению устойчивости протеаз [6]. Целью данной работы была идентификация клинических изолятов, представителей р. *Proteus*, *Morganella* и *Providencia*, а также сравнительная характеристика протеолитической активности этих штаммов с использованием различных белковых субстратов. Материалы и методы исследования Штаммы бактерий (*Proteus* sp. 17 и 57) были получены от профессора, д.б.н. С.Ю. Хайтлиной (институт цитологии, РАН, Санкт-Петербург) и *Providencia* sp. 6 – музея кафедры микробиологии ИФМиБ. Бактерии культивировали при 37°C с интенсивностью качания 200 об/мин (вибростенд, В. Braun, Германия). В качестве инокулята использовали 12 часовую культуру, выращенную на среде LB [7] (%): триптон - 1.0, дрожжевой экстракт - 0.5, NaCl - 0.5, pH 8.5. Среда LBA содержала 2% агара. Для определения казеинолитической активности использовали среду (г/л): казеин - 5, дрожжевой экстракт - 5, NaCl - 5, агар - 2%. Определение общего количества белка проводили по методу М. Брэдфорд [8]. Прирост биомассы измеряли нефелометрически на фотоэлектрокалориметре КФК-2 при длине волны 590 нм. Количество биомассы выражали в единицах светопоглощения в кювете толщиной 1 см. Идентификацию бактерий проводили по классическим микробиологическим методам [9] и молекулярно-биологическому методу, основанному на гомологии 16S рРНК [10]. Получение клеточного лизата проводили следующим образом: 200 мл культуральной жидкости центрифугировали при 13000 об/мин, осадок отмывали дважды в растворе 0.8% NaCl. Клетки ресуспендировали в 0.1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 5 мМ трис-HCl с pH 7.5 и подвергали ультразвуковому воздействию при 40С в течение 8 - 9 секунд 8 раз с интервалом в 60 секунд. Для удаления разрушенных клеток и их обломков суспензию центрифугировали в течение 20 мин при 20000 об/мин и 40С. Клеточный экстракт отбирали и замораживали до использования. Расщеплению

азоказеина проводили по методу [11]. За единицу активности принимали такое количество активности, которое приводит к повышению поглощения на 0.1 единицы. Протеолитическое расщепление актина проводили по методу, описанному в работе [12]. Для электрофореза белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия использовали стандартную методику [13]. Зимографию в ПААГ с желатином (1 мг/мл) осуществляли согласно методу [14].

Математическую обработку данных проводили в программной среде «Microsoft Excel» путем расчета среднеквадратичного отклонения ( $\sigma$ ). Результаты считали достоверными при среднеквадратичном отклонении  $\sigma < 0.05$ . В качестве критерия достоверности получаемых разностей использовали критерий Стьюдента, принимая за достоверный уровень значимости  $p < 0.05$ . Результаты исследований и их обсуждение

Бактериальные штаммы № 17 и 57 были выделены от урологических больных и предварительно идентифицированы как представители рода *Proteus*, штамм 6 – *Providencia*. Была проведена дифференцировка штаммов до вида с использованием классических микробиологических тестов и молекулярно-биологического метода, основанного на гомологии 16 S рРНК. Результаты изучения различных признаков штаммов представлены в таблице 1, из которой видно, что штаммы №17, 57 и 6 различаются по ряду признаков. На основании изученных свойств штамм 17 можно отнести к роду *Proteus*, штамм 57 к роду *Morganella*, а штамм 6 – *Providencia*. Однако для представителей рода *Morganella*, как правило, не характерно наличие гемолитических свойств. А штамм 57 проявил слабые гемолитические свойства. Использованный набор микробиологических тестов не позволяет сделать однозначный вывод о принадлежности исследуемых культур к тем или иным видам. Для более точной идентификации необходимо использование современных молекулярно-биологических методов.

Таблица 1 – Микробиологическая характеристика штаммов бактерий

Исследуемые свойства	№17	№57	№6
Окраска по Граму	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Подвижность	+	+	+
Роевание (2% агар)	+	+	+
Протеолиз казеина	+	+	+
Гемолиз	+++	+	+
Синтез сероводорода	+	+	+
Расщепление глюкозы	+	+	+
Расщепление мальтозы	+	+	+
Расщепление маннита	-	-	-
Расщепление сахарозы	+	+	+

С целью идентификации микроорганизмов по последовательности гена 16S рРНК из клеток была выделена тотальная ДНК и проведена ПЦР-реакция с праймерами к гену 16S рРНК. ДНК-продукты были секвенированы в компании «СИНТОЛ» и затем последовательности генов 16 S рРНК были проанализированы на гомологию с известными генами в базе данных NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Результаты анализа представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Идентификация бактериальных штаммов на основании гомологии гена 16 S рРНК

Штамм	Результат секвенирования
№ 17	<i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI Ch-TSB28, 99%
№ 57	<i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI Ch-TSB30, 99%
№ 6	<i>Proteus mirabilis</i> strain FUA1240, 99%
№ 6	<i>Proteus mirabilis</i> strain CIFRI P-TSB-13, 99%

strain FFL2, 99% *Proteus mirabilis* strain HI4320, 99% № 57 *Morganella morganii* strain 3B4A, 98% № 6 *Providencia stuartii* strain S2SA-Sa 97% Таким образом, полученные данные позволяют идентифицировать штамм 17 как *P. mirabilis* с вероятностью 99%, штамм 57 как *M. morganii* с вероятностью 98%, а штамм 6 как *P. stuartii* с вероятностью 97%. Для определения наличия внеклеточных протеолитических ферментов, расщепляющих казеин, выращивали бактерии на молочном агаре. Показано, что протеолитическую активность в отношении казеина проявляет только штамм *P. mirabilis* (рис. 1). Вокруг колоний штаммов *M. morganii* и *P. stuartii* не обнаружено зоны просветления среды. Кроме того, видно, что колония *P. mirabilis* образует концентрические круги, что характерно для роящихся штаммов. Эти результаты согласуются с данными литературы, согласно которым многие штаммы р. *Proteus*, способные к роению, могут секретировать протеазы, расщепляющие казеин [15]. Известно, что только представители р. *Proteus* способны к ползучему росту на среде, содержащей 2% агара. Бактерии р. *Morganella* и *Providencia* такой способностью не обладают. Таким образом, только штамм *P. mirabilis* 17 обладал выраженной внеклеточной протеолитической активностью, и это коррелировало со способностью штамма к роению. Исследовали внутриклеточную протеолитическую активность в штаммах энтеробактерий с использованием трех белковых субстратов – азоказеина, желатина и актина. Протеолитическую активность по расщеплению азоказеина определяли в клеточных экстрактах 24 и 48 часовых культур, полученных при разрушении клеток ультразвуком. На рисунке 2 представлены результаты исследования активности в клетках на 48 час роста. Видно, что в клетках штамма *P. mirabilis* активность по отношению к азоказеину проявляется на низком уровне, в то время как в клетках штамма *M. morganii* эта активность выше в 4-4.5 раз, а в клетках *P. stuartii* – в 2 раза. Рис. 1 – Рост клинических изолятов на молочном агаре. 1 – *M. morganii*. 2 – *P. stuartii*. 3 – *P. mirabilis*. Стрелкой показана зона гидролиза казеина молока Рис. 2 – Расщепление азоказеина клеточными лизатами энтеробактерий. 1 – *M. morganii*, 2 – *P. stuartii*, 3 – *P. mirabilis* 1 2 3 Рис. 3 – Зимография клеточных лизатов энтеробактерий, субстрат – желатин. 1 – *P. mirabilis*, 2 – *P. stuartii*, 3 – *M. morganii* Расщепление желатина исследовали методом зимографии, который позволяет визуализировать в пробах белки, обладающие способностью расщеплять белковые субстраты, что проявляется в виде прозрачной зоны или зон на голубом фоне геля. Исследование клеточных лизатов энтеробактерий на 24 час культивирования не выявило ферментов, способных расщеплять желатин. Однако в клетках на 48 час культивирования обнаружена внутриклеточная активность (рис. 3). Также как и в случае с азоказеином наибольшую активность проявил штамм *M. morganii*. В экстракте обнаружено несколько пептидных зон, обладающих высокой активностью в отношении желатина (м.м 25-35 кДа, а также в высокомолекулярной области). В лизате бактерий шт. *P. stuartii* меньше

протеолитической активности, расщепляющей желатин. 1 2 3 4 Рис. 4 – Расщепление актина клеточными лизатами энтеробактерий. 1 – актин, 2 – клеточный лизат *M. morganii* + актин, 3 – клеточный лизат *P. mirabilis* + актин, 7 – клеточный лизат *P. stuartii* + актин Все три штамма были исследованы на наличие внутриклеточных протеолитических ферментов, способных специфически расщеплять актин. Изучали активность в клетках на 48 час культивирования. Расщепление актина контролировали электрофоретически по исчезновению пептидной зоны, соответствующей актину (пептид с молекулярной массой 43 кДа) (рис. 4). Из трех штаммов только клеточный экстракт *M. morganii* проявлял активность по отношению скелетно-мышечного актина, расщепляя его неограниченно. Клеточные экстракты *P. mirabilis* и *P. stuartii* не проявляли активности по отношению к актину. Таким образом, виды бактерий, относящиеся к трибе *Proteeae*, различаются по протеолитической активности. Только вид *P. mirabilis* проявляет высокую внеклеточную протеолитическую активность, что соотносится со способностью штамма к роению. В тоже время самая высокая внутриклеточная активность обнаружена в бактериях *M. morganii* при использовании в качестве субстратов азоказеина и желатина. Аналогичная активность в клетках *P. stuartii* была гораздо ниже. Из трех штаммов только в клетках *M. morganii* обнаружена активность, расщепляющая актин неограниченно. Обнаруженные различия в спектре протеолитических ферментов могут отражать различия в вирулентности бактерий, относящихся к разным родам энтеробактерий. Изучение протеиназ патогенов важно с точки зрения поиска новых мишеней для понимания механизмов развития и терапии инфекционных заболеваний.