

УДК 579.61

DOI: 10.14427/jipai.2023.1.77

Ферментативная активность бактерий *Chryseobacterium arthrosphaerae*, колонизирующих дыхательные пути пациентов с муковисцидозом

К.В. Зубова¹, В.А. Кузнецова¹, О.В. Кондратенко², Е.В. Глинская¹¹ ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Саратов² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Самара

Enzymatic activity of *Chryseobacterium arthrosphaerae* bacteria colonizing the respiratory tract of patients with cystic fibrosis

K.V. Zubova¹, V.A. Kuznetsova¹, O.V. Kondratenko², E.V. Glinskaya¹¹ Saratov National Research State University named after N.G. Chernyshevsky, Saratov² Samara State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Samara

Аннотация

Проанализирована ферментативная активность бактерий вида *Chryseobacterium arthrosphaerae*, выделенных из дыхательных путей пациентов с муковисцидозом. Целью работы являлось изучение ферментов как фактора патогенности. Материалом для исследования являлись 20 штаммов бактерий, полученных от людей из разных субъектов Российской Федерации. В методах использовали различные дифференциально-диагностические среды, а также планшетные тест-системы. По результатам работы было выявлено, что большая часть штаммов бактерий *Chryseobacterium arthrosphaerae* обладает широким диапазоном ферментативной активности, которая может играть роль в патогенезе, например, при инвазии и колонизации. Целесообразно продолжить изучение бактерий рода *Chryseobacterium* как потенциального патогена, а также выявить клиническую роль микроорганизмов в инфекционном процессе, протекающем в респираторном тракте больных муковисцидозом.

Ключевые слова

Муковисцидоз, условно-патогенные микроорганизмы, факторы патогенности.

Введение

Бактерии рода *Chryseobacterium* принадлежат к семейству Weeksellaceae порядка Flavobacteriales. Это грамотрицательные, хемоорганотрофные, неферментирующие палочки. Характеризуются

Summary

The enzymatic activity of *Chryseobacterium arthrosphaerae* bacteria isolated from the respiratory tract of patients with cystic fibrosis was analyzed. The aim of the study was to evaluate the role of enzymes as a virulence factor. The material for the study comprised 20 strains of bacteria obtained from patients across multiple subjects of the Russian Federation. Methods employed various differential diagnostic environments, as well as tablet test systems. The results of the study revealed that most strains of *Chryseobacterium arthrosphaerae* bacteria have a wide range of enzymatic activity, which can play a role in pathogenesis, for example, during invasion and colonization. It is advisable to continue studying the bacteria of the genus *Chryseobacterium* as a potential pathogen, as well as to identify the clinical role of microorganisms in the infection process occurring in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.

Keywords

Cystic fibrosis, opportunistic microorganisms, pathogenicity factors.

широким ареалом обитания и устойчивостью в окружающей среде [1]. Также представители данного рода известны природной мультирезистентностью к большому числу антибиотиков, например, пенициллинам, цефалоспорином первого и

второго поколений, цефтриаксону, азтреонаму, хлорамфениколу, эритромицину, аминогликозидам, имипенему и меропенему.

В последние годы увеличилось число сообщений о клинических случаях инфекций, вызванных представителями рода *Chryseobacterium*. Чаще всего бактерии являлись возбудителями инфекций мочевыводящих путей и лёгких, также были способны вызывать сепсис и бактериемию [2, 3, 4]. В литературе указывалось, что наиболее подвержены инфицированию этими бактериями люди с хроническими заболеваниями, такими как муковисцидоз, а также пациенты с иммунодефицитными состояниями и находящиеся на длительном госпитальном лечении [5, 6, 7].

Несмотря на участвовавшие случаи инфекций, вызванных бактериями рода *Chryseobacterium*, факторы их патогенности недостаточно изучены, нет систематизированных данных о клинической роли и об особенностях клинических проявлений инфекции.

Целью нашего исследования являлось изучение ферментативной активности бактерий *Chryseobacterium arthrosphaerae* как потенциального фактора патогенности.

Методы

Было исследовано 20 штаммов *Chryseobacterium arthrosphaerae*, выделенных от пациентов с муковисцидозом из разных регионов Российской Федерации. Бактерии идентифицировали с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Была изучена продукция ряда ферментов, которые являются потенциальными факторами патогенности. Ферменты относились к химическому классу гидролаз, подклассам протеаз и липаз. Изучали способность к протеолизу желатина, мочевины, липазную активность, гидролиз казеина и сложных углеводов, коагулазную и фибринолитическую активность, гемолиз эритроцитов, способность к расщеплению лизина и аргенина, гидролизу эскулина. Был поставлен тест на наличие фермента триптофаназы путём улавливания индола как побочного газообразного продукта [8]. В опытах использовали как дифференциально-диагностические среды, так и планшетные тест-системы производства ООО «НПО «Диагностические системы» (г. Нижний Новгород).

Тест на желатиназу проводили путём посева суточной культуры в мясопептонный бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением

12% желатина. Предварительно желатин замачивали в холодной дистиллированной воде на 15 мин, после добавляли навеску сухого бульона и полученную смесь доводили до кипения на водяной бане. Среду разливали по пробиркам и стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. Культуру засеивали уколом и культивировали при комнатной температуре в течение 36 ч. Учёт результатов проводили через 24 ч и 36 ч соответственно.

Выявление способности к гидролизу лецитина определяли с использованием желточного агара следующего состава: пептон, натрия фосфорнокислый двузамещённый, хлорид натрия, сульфат магния, глюкоза, агар-агар и вода. Смесь стерилизовали при 112 °С в течение 30 мин. После охлаждения до 50 °С добавляли желток куриного яйца из расчёта 15 мл на 0,5 л среды, размешивали и разливали по чашкам. Посев осуществляли коротким штрихом, инкубировали в течение 5 суток, результат оценивали на третьи и пятые сутки.

Для определения способности бактерий расщеплять казеин использовали молоко 1,5% жирности, которое дробно стерилизовали в течение 3-х дней. Стерильное молоко добавляли к питательному агару (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в расчёте 2 мл молока на 10 мл среды, перемешивали и разливали по чашкам. Засеивали коротким штрихом, инкубировали в течение 7 дней.

Способность к гидролизу крахмала определяли на мясопептонном агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 1% крахмала. Культуру засеивали коротким штрихом на четыре чашки и культивировали в течение 7 суток. Учёт результатов проводился на 4-е и 7-е сутки.

Плазмокоагулазную и фибринолитическую активность исследовали путём внесения петли с культурой в пробирку со стерильной плазмой крови кролика и инкубировали при 37°C. Результат учитывали через 30 мин, 2, 4, 24 ч.

Гемолитическую активность определяли путём посева на кровяной агар (мясопептонный агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с 5% стерильной дефибрированной крови), чашки инкубировали 24 ч.

Для обнаружения таких ферментов как уреазы, лизиндегидролазы, аргининдегидролазы, а также способность к гидролизу эскулина и выделению индола использовали тест-системы для биохимической идентификации и дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий производства ООО «НПО «Диагностические системы» г. Нижний Новгород.

Результаты и обсуждение

Результаты экспериментов приведены в таблице 1.

Тест на желатиназу показал, что через 24 часа изучаемые объекты не гидролизировали желатин. Через 36 ч наблюдался воронкообразный характер разжижения желатина для 100% штаммов *Chryseobacterium arthrosphaerae*.

Для теста на наличие фермента фосфолипазы положительным результатом являлось образование вокруг колонии зоны просветления среды. Учёт результатов через 3 суток показал, что 35% штаммов имеют фермент фосфолипазу. Спустя 5 суток после начала эксперимента 100% штаммов оказались способны к гидролизу лецитина.

Для определения способности бактерий расщеплять казеин после инкубации чашки заливали 10% раствором соляной кислоты, визуализируя результат. Наличие фермента определяли по зоне просветления вокруг колоний микроорганизмов. Штаммы бактерий *Chryseobacterium arthrosphaerae* оказались неспособными к гидролизу казеина.

Гидролиз крахмала оценивали после четырехсуточного срока инкубации путём нанесения на первые две чашки раствора Люголя, окрашивающего крахмал в тёмно-синий цвет. При расщеплении крахмала вокруг колоний образуется прозрачная зона. Амилазная активность обнаружилась у

50% изучаемых объектов. При учёте результатов через семь суток результаты повторились.

Положительным результатом на плазмокоагулазу считали наличие рыхлого сгустка. Положительный результат был у 70% всех исследуемых штаммов через 24 ч культивирования. Для этих штаммов была установлена и фибринолитическая активность, сгустки растворились через 36 часов инкубирования. Штаммы с плазмокоагулазой и фибринолизинном составили 70% от общего числа исследуемых бактерий.

Гемолитической активности у бактерий не было выявлено.

Наличие фермента уреазы было обнаружено у 90% штаммов. Способность к гидролизу лизина имели 20% изучаемых бактерий, а к гидролизу аргинина – только 10% от всех изученных штаммов. 85% штаммов имели фермент гликозидгидролаза, расщепляющий эскулин. Результаты теста на наличие триптофана показали, что 30% штаммов *Chryseobacterium arthrosphaerae* имеют этот фермент.

При изучении бактерий было выявлено, что большинство изучаемых штаммов имеют ферменты, относящиеся к разным химическим классам, и обладают способностью разрушать не только белки, но и сложные сахара, а также липиды. Полученные нами данные о способности бактерий гидролизовать желатин, крахмал, эскулин согласуются с

Таблица 1. Ферментативная активность штаммов *Chryseobacterium arthrosphaerae*

Фермент	Время культивирования (час)	% штаммов с положительным результатом	% штаммов с отрицательным результатом
Желатиназа	24	0	100
	36	100	0
Фосфолипаза	72	35	65
	120	100	0
Казеиназа	168	0	100
Амилаза	96	50	50
	168	50	50
Плазмокоагулаза	0,5	0	100
	2	0	100
	4	0	100
	24	70	30
Фибринолизин	36	70	30
Гемолизин	24	0	100
Уреаза	24	90	10
Лизиндегидролаза	24	20	80
Аргининдегидролаза	24	10	90
Гликозидгидролаза	24	85	15
Триптофаназа	24	30	70

данными, приведенными в статье Борониной Л. Г. и соавторов за 2003 г. [9]. Так же, как и с данными М. Т. Brady с коллегами, показавшими наличие широкого спектра протеолитических ферментов, характерных для семейства Weeksellaceae (ранее Flavobacteriaceae), являющихся потенциальными факторами патогенности [10]. Наличие большого набора ферментов может способствовать выживанию указанных бактерий не только в окружающей среде, но и в условиях макроорганизма. Высокая биологическая активность делает представителей вида *Chryseobacterium arthrosphaerae* серьёзными конкурентами в борьбе за доминирующее положение внутри сложной иерархии условно-патогенных и оппортунистических микроорганизмов, колонизирующих человека.

Литература

1. McBride M.J. The Family Flavobacteriaceae. The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg. 2014;75(21):643-667. DOI: 10.1007/978-3-642-38954-2_130.
2. Garg S., Appannanavar S.B, Mohan B., et al. Pyonephrosis dueto *Chryseobacterium gleum*: a first case report. Indian J Med Microbiol. 2015;33(2):311-313. DOI: 10.4103/0255-0857.154894.
3. Izaguirre-Anariba D.E., Sivapalan V. *Chryseobacterium indologenes*, an Emerging Bacteria: A Case Report and Review of Literature. Cureus. 2020;12(1):e6720. DOI: 10.7759/cureus.6720.
4. Mirza H.C., Tuncer Ö., Ölmez S. et al. Clinical Strains of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* spp. Isolated from Pediatric Patients in a University Hospital: Performance of MALDI-TOF MS-Based Identification, Antimicrobial Susceptibilities, and Baseline Patient Characteristics. Microbial Drug Resistance. 2018;24(6):816-821. DOI: 10.1089/mdr.2017.0206.
5. Zhang Y., Zhao X., Su X., et al. Clinical Characteristics and Risk Factors for Intra-Abdominal Infection with *Chryseobacterium indologenes* after Orthotopic Liver Transplantation. Pathogens. 2022;11(10):1126. DOI: 10.3390/pathogens11101126.
6. Зубова К.В., Кондратенко О.В., Глинская Е.В. Особенности географического распределения некоторых пред-

Заключение

Штаммы бактерии *Chryseobacterium arthrosphaerae* имеют широкий спектр ферментов, которые относятся к факторам патогенности. В результате исследования выявлен большой процент штаммов с разнообразными ферментными системами, которые способны играть роль в инфекционном процессе и усугублении клинической картины у больных муковисцидозом. Бактерии рода *Chryseobacterium* и других близкородственных родов микроорганизмов нуждаются в дальнейшем детальном исследовании для выявления их роли в патологическом инфекционном процессе, протекающем в лёгких пациентов с муковисцидозом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что не имеют конфликта интересов.

ставителей порядка Flavobacteriales у пациентов с муковисцидозом. Сб.матер. Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию основания кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и 100-летию со дня рождения профессора Людвиги Микртычевны Заркарян. 2022: 81-85.

7. Tural D.A., Ersöz D.D., Emiralioglu N., et al. Clinical characteristics of children with cystic fibrosis infected with unusual bacteria. Minerva Pediatr (Torino). 2021;111-114. DOI: 10.23736/S2724-5276.21.06189-2.

8. Петерсон А.М., Чиров П.А. Практические рекомендации для идентификации сапрофитных и условно-патогенных бактерий по фенотипическим признакам. С.: Издательство Саратовского университета, 2005, 24 с.

9. Боронина Л.Г., Кукушкина М.П., Крутова К.В. и др. Род *Chryseobacterium* (Flavobacterium): клиническое значение, идентификация, чувствительность к антибиотикам. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2003;3(5):243-250.

10. Brady M.T., Leber A. Less Commonly Encountered Nonenteric Gram-Negative Bacilli. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. 5rd ed. Philadelphia: Elsevier. 2018:855-859. DOI: 10.1016/B978-0-323-40181-4.00151-1.

Сведения об авторах

Зубова Ксения Валерьевна – аспирант кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

Кузнецова Виктория Александровна – к.б.н., магистр кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

Кондратенко Ольга Владимировна – д.м.н., доцент, врач-бактериолог, профессор кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения РФ, 443079, г. Самара, ул. Гагарина, 18.

Глинская Елена Владимировна – к.б.н., доцент кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского», Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83.

Поступила 12.12.2022.