

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ И ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЕЙ УРОЛОГИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*

Коменкова Т.С., Шадрин А.М., Зайцева Е.А.*

ФГБУ ВО ТГМУ Минздрава России, кафедра микробиологии и вирусологии, г. Владивосток; ФГБУН ИБФМ РАН, лаборатория молекулярной микробиологии, г. Пущино.*

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, факторы патогенности, протеолитическая активность, гемолитическая активность, гены *gelE* и *cylA*

Резюме: В работе изучены фенотипические проявления протеолитической и гемолитической активностей, а также гены, кодирующие эти факторы патогенности – *gelE* и *cylA* у культур *Enterococcus faecalis*, изолированных из мочи детей с инфекцией мочевыделительной системы. Исследуемые культуры уропатогенных энтерококков показали неоднородность в фенотипическом и генетическом проявлении отмеченных факторов, что требует дальнейшего изучения.

Resume: Associated traits of proteolytic and hemolytic activity and genes coding these pathogenic factors – *gelE* and *cylA* of *Enterococcus faecalis* eliminated at children's urinary tract disorders was studied in this research. Uropathogenic *E. faecalis* cultures have different phenotypic and genetic presentation of pathogenic factors. It requires further studying.

Актуальность. В последнее время *Enterococcus faecalis* занимает лидирующее позиции как этиологический фактор оппортунистических, нозкомиальных инфекций и инфекционных осложнений в кардиологии, гинекологии, гнойной хирургии, нефрологии и урологии [3, 6, 7, 8].

Установлено, что энтерококки обладают выраженным тропизмом к почечной ткани. Развитию инфекции в почечной паренхиме и дезорганизации ренальной ткани способствует наличие у энтерококков гистоповреждающих субстанций – протеазы/желатиназы, гемолизины/цитоллизина, дезоксирибонуклеазы и др. [2]. Желатиназа способствует образованию биопленок, что ведет к формированию антибиотикорезистентности и хронизации инфекционного процесса [4]. Наличие цитолитического токсина у энтерококков является важным фактором, определяющим смертность при эндокардите [1].

Изучены гены, кодирующие многие факторы патогенности энтерококков – *gelE* – желатиназа; *cylA*, *cylM*, *cylB* – цитоллизина; *srg* – сериновая протеиназа, *esp*, *asa1*, *efaA*, *agg* – адгезины; *tetM*, *vanA*, *vanB*, *vanC* – гены устойчивости к антибиотикам и др. [1, 4, 9]. Синтез и функционирование цитоллизина регулирует ряд генов: продукт гена *cylM* отвечает за посттрансляционную модификацию цитоллизина, *cylA* – активацию, *cylB* – транспорт цитоллизина [9]. Желатиназа кодируется *arg*-сцепленным ауторегулируемым геном. Доказано, что несущие его штаммы энтерококков обладают высокой вирулентностью [1]. Однако многие свойства *E. faecalis* как уропатогена все еще недостаточно изучены.

Цель: изучить протеолитическую и гемолитическую активности у *E. faecalis*, выделенных из мочи у детей с инфекцией мочевыделительной системы (ИМС).

Задачи:

- 1) Определить протеолитическую и гемолитическую активности фекальных энтерококков, изолированных у детей из мочи.
- 2) Оценить наличие генов *gelE* и *cylA* у уропатогенных *E. faecalis*.

Материалы и методы. В работе использованы культуры *E. faecalis* (n=57), изолированные от детей с ИМС. Протеолитическую (ферментация молока, разжижение желатины) и гемолитическую активности энтерококков изучали классическими бактериальными методами согласно приказа МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.

Молекулярно-генетические методы. Бактериальную ДНК у *E. faecalis* (n=20) выделяли с помощью набора «ДНК-экспресс» (Литех). Тестирование генов патогенности *gelE* и *cylA* энтерококков проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для амплификации использовали известные системы праймеров, синтезированные в «Синтол» (Москва) (табл 1).

Таблица 1. Характеристика праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательность ДНК	Размер продукта (п.н.)	Ссылка
<i>cylA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	517	Eaton T.J., Gasson M.J., 2001
<i>gelE</i>	ACCCCGTATCATTTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	419	Soares R. O. <i>et al.</i> , 2014

Реакционная смесь (20 мкл) включала бактериальный лизат (2 мкл), специфические праймеры (по 1 мкл), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (0,2 мкл), буфер 10x Tas SE B305 (2 мкл), фермент Tag – полимеразу (0,2 мкл).

ПЦР проводили на амплификаторе Mastercycler proS (Eppendorf), по протоколу: 1 цикл - 94°C, 5 мин; далее 30 циклов в режимах 94°C – 45 сек; 57°C – 1 мин (для *cylA*) и 56°C – 1 мин (для *gelE*); 72°C – 1 мин; финальное удлинение 72°C – 3 мин.

Продукты амплификации анализировали в 1% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью гельдокументирующей системы E-Box VX5/20M.

Результаты и их обсуждение.

По данным литературы известно, что энтерококки на кровяном агаре могут давать несколько типов гемолиза: α-тип – частичный гемолиз эритроцитов; β-тип – полный лизис эритроцитов; γ – тип - отсутствие гемолиза. Чаще всего штаммы *E. faecalis* не проявляют гемолитическую активность, и редко на кровяном агаре показывают гемолиз β-типа [1]. В нашем исследовании 52,6±6,6% уропатогенных *E. faecalis*, выделенных от детей с ИМС, показали гемолитическую активность. При этом выявлялось два варианта гемолиза - α- (24,6±5,7%) и β-тип (28,1±5,9%). У 47,4±6,6% изучаемых фекальных энтерококков гемолитическая активность на кровяном агаре не определялась (табл 2).

В исследованиях Мироненко Л.П. с соавторами (2014 г.) отмечено, что клинические изоляты фекальных энтерококков обладают более выраженной протеолитической активностью, в сравнении с культурами, выделенными из кишечника здоровых людей [5]. В нашей работе 71,9±5,9% исследуемых *E. faecalis*,

изолированных у детей из мочи при ИМС, показали протеолитическую активность. При этом ферментация и молока и желатины отмечалась у $29,8 \pm 6,1\%$ уропатогенных *E. faecalis*. Встречались штаммы энтерококков, которые ферментировали или только молоко ($68,4 \pm 6,2\%$) или только разжижали желатину ($29,8 \pm 6,1\%$) (табл. 2).

Таблица 2. Факторы патогенности *E. faecalis*, выделенных из мочи детей с ИМС

Факторы патогенности	Кол-во исследованных культур	Наличие ферментативной активности	
		абс. показ.	M±m, %
Гемолитическая активность:	57		
α- тип		14	24,6± 5,7
β- тип		16	28,1±5,9%
γ-тип		27	47,4±6,6%
Протеолитическая активность в отношении к:	57		
желатине		17	29,8±6,1%
молоку		39	68,4±6,2%

Таким образом, нами отмечена неоднородность проявления фенотипических свойств некоторых факторов патогенности (гемолитической и протеолитической активностей) у *E. faecalis*, выделенных из мочи у детей с ИМС.

При изучении генов, кодирующие такие факторы патогенности фекальных энтерококков как *gelE* (желатиназу) и *cylA* (цитолизин), получены вариабельные результаты. Ген *gelE* был выявлен у $80,0 \pm 9,1\%$ фекальных энтерококков, но фенотипическое проявление - разжижения желатины - отмечалось лишь у $35 \pm 10,9\%$ изучаемых культур. Похожие результаты были отмечены и другими исследователями. Согласно их данным, среди штаммов *E. faecalis*, содержащих ген *gelE*, около половины (47%) имели желатиназно-позитивный фенотип, остальные (53%) характеризовались «молчащим» геном [10]. Отсутствие экспрессии гена ряд авторов связывают с делецией в области регуляторных генов, активирующих синтез желатиназы [1, 10].

Ген, ответственный за активацию цитолизина (*cylA*) был определен у $40,0 \pm 11,2\%$ уропатогенных *E. faecalis*. Наличие гена *cylA* чаще наблюдалось у энтерококков с гемолитической активностью (α- или β - типа) ($50,0 \pm 13,8\%$). Интересно отметить, что из 6 гемолитически негативных энтерококков только у одной культуры был выявлен ген *cylA*, что требует дальнейшего изучения.

Выявлена слабая положительная связь ($r=0,49$; $p<0,05$) между наличием гена *gelE* и проявлением гемолитической активности (α- или β-типа) у энтерококков, выделенных из мочи при ИМС.

Выводы:

Отмечена вариабельность в фенотипическом проявлении протеолитической и гемолитической активностей у фекальных энтерококков, изолированных из мочи у детей с ИМС;

Выявлено большое количество уропатогенных энтерококков с «молчащими» генами *gelE* и *cylA*.

Литература

1. Бухарин О.В., Валышев А.В. Биология и экология энтерококков: монография // Екатеринбург: УрО РАН. 2012. 227 с.
2. Бухарин О.В., Гриценко В.А., Вялкова А.А. Факторы уропатогенности бактерий: роль в патогенезе и значение в диагностике пиелонефрита // Нефрология и диализ. 2001. Т.3. №4. С. 469-475.
3. Бухарин О.В., Валышева И.В., Карташова О.Л. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков // Журнал микробиологии. 2013. № 3. С. 12-18.
4. Красная Ю.В., Нестерова А.С., Потатуркина – Нестерова Н.И. Значение бактерий рода *Enterococcus* в жизнедеятельности человека // Современные проблемы науки и образования. 2014. №6.
5. Мироненко Л.Г., Перетятко Е.Г. Биологические свойства музейных штаммов микроорганизмов рода *Enterococcus* // Вісник проблем біології і медицини. 2014. Т. 4. № 4. С. 204-206.
6. Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Зайцева Е.А., Семешина О.В. Структура и антибиотикорезистентность уропатогенов, выделенных у новорожденных с инфекцией мочевых путей // Практическая медицина. 2015. № 2 (87). С. 97-100.
7. Чащина И.Л., Таточенко В.К., Бакрадзе М.К. Место цефалоспоринов в терапии инфекций мочевыводящих путей у детей // Вопросы современной педиатрии. 2012. Т. 1. № 1. С. 158-161.
8. Bittencourt E. M. Sergio S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil // Journal of Medical Microbiology. 2004. № 53. P. 1069-1073.
9. Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S. Virulence of enterococci // Clin. Microbiol. Rev. 1994. № 4. P. 462-478.
10. Strzelecki Y., Hryniewicz W., Sadowy E. Gelatinase-Associated Phenotypes and Genotypes Among Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland // Polish Journal of Microbiology. 2011. № 4. P. 287-292.