

МІКРОБІОЛОГІЯ

УДК 57.083.1:579.86:579.22

Л. Г. Мироненко, О. Г. Перетятко, Т. В. Холодна

АНТИЛІЗОЦИМНА АКТИВНІСТЬ ЕНТЕРОКОКІВ, ВИЛУЧЕНИХ ІЗ РІЗНИХ ЕКОТОПІВ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України» (м. Харків)

Роботу виконано в рамках планових НДР філії музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України» за темами по договорам: НН/1 – 2006; НН/1 – 2008: «Підтримка та розвиток Музею-Депозитарію патогенних для людини мікроорганізмів».

Вступ. Інтерес до вивчення біологічних властивостей ентерококів зумовлений їх клінічною значимістю. З кожним роком в багатьох країнах світу зростає роль їх у виникненні нозокоміальних та гнійно-септичних захворювань [7, 11, 12]. При цьому, фактори персистенції, які спрямовані на інактивацію захисту хазяїна, є найменш вивченими. Донедавна бактеріальна персистенція вважалася «малими» факторами патогенності, на сьогоднішній день деякі вчені оцінюють вірулентність і персистентність мікроорганізмів як окремі аспекти їх патогенності [1, 3].

Відомо, що антилізоцимна ознака бактерій є конститутивним фактором, який взаємодіє з лізоцимом – важливою ланкою неспецифічної резистентності організму та визначає тривалість виживання їх на етапах транслокації і персистенції [4]. Вивчення патогенетичного значення антилізоцимної активності (АЛА) мікроорганізмів роду *Enterococcus* в розвитку гнійно-септичних захворювань знаходиться на початковому етапі. Немає свідчень про зміни АЛА при транслокації ентерококів з місць їх природного вегетування в інші еко-ніші.

За даними наукової літератури у грампо-зитивних мікроорганізмів АЛА зустрічається рідко [6]. У ентерококів ця ознака визначена у 60,8 % ізолятів з наростанням її

експресивності в ряду «зовнішнє середовище – здорові – хворі люди» [3].

Мета дослідження полягала в вивченні пенетрантності та експресивності АЛА в ентерококів, вилучених з різних екоотопів.

Об'єкт і методи дослідження. У роботі було використано 119 штамів мікроорганізмів роду *Enterococcus*, з яких 25 вилучено з товстого кишечника здорових дітей, 30 – з товстого кишечника дітей хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ), 28 – з вмісту трофічних виразок хворих на цукровий діабет з синдромом «діабетична стопа», 23 – з товстого кишечника цих же хворих на цукровий діабет.

Визначення антилізоцимної активності ентерококів проводили загально прийнятим методом, шляхом засіву штамів мікроорганізмів, що вивчались, на поживне середовище із різними концентраціями лізоциму від 1 до 10 мкг/мл [5]. Ефект інактивації лізоциму визначали по росту на середовищі індикаторної культури *Micrococcus luteus var. lysodeikticus* АТСС 2665 біля антилізоцимоактивних штамів ентерококів. Кількісну оцінку антилізоцимної активності штаму проводили по максимальній концентрації лізоциму в середовищі, яка інактивувалась даним штамом [5].

Штам *Micrococcus luteus var. lysodeikticus* АТСС 2665 отримали з філії музею мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України».

Результати досліджень і їх обговорення. Результати визначення пенетрантності АЛА у ентерококів, вилучених із вмісту товстого кишечника здорових та хворих на ГКІ дітей наведено в табл. 1.

Таблиця 1

**Пенетрантність АЛА у штамів ентерококів,
вилучених із товстого кишечника здорових та хворих на ГКІ дітей**

Екотоп походження ентерококів:	Кількість вивчених штамів	Кількість штамів, що проявляють АЛА	
		абс.	(M±m), %
кишечник дітей, хворих на ГКІ	30	19	63,3±8,8*
кишечник здорових дітей	25	6	24,0±8,5

Примітка: “*” – різниця показників статистично достовірна (p<0,05).

Слід відзначити, що серед ентерококів обох проаналізованих груп було виявлено штами з АЛА. При цьому встановлено, що серед ентерококів, вилучених від хворих на ГКІ пенетрантність АЛА була в 2,6 разів вищою, ніж у штамів, вилучених від здорових дітей (p<0,05).

Аналіз експресивності АЛА показав, що всі антилізоцимоактивні ентерококи, які вилучено з кишечника здорових дітей (контрольна група) характеризувались низькою активністю (1 мкг/мл). На відміну від групи порівняння діапазон прояву антилізоцимної активності у ентерококів, вилучених від дітей, хворих на ГКІ, складав від 1 до 3 мкг/мл. Слід підкреслити, що питома вага штамів з низькою АЛА (менш ніж 2 мкг/мл) серед ентерококів, вилучених від хворих на ГКІ дітей, складала (80,0±7,3) %, штамів з середньою активністю (2–3 мкг/мл) – (20,0±7,3) %. При цьому, середнє значення АЛА у мікроорганізмів роду *Enterococcus*, вилучених із вмісту товстого кишечника хворих на ГКІ, було достовірно вищим в 1,4 рази, ніж у штамів, вилучених із кишечника здорових дітей (p<0,05). Можливо, що низький рівень інактивації лізоциму у представників нормофлори є достатнім для захисту від бактерицидної дії факторів природної резистентності, що забезпечує стабільність мікробіоценозів.

Пенетрантність і середній рівень експресії АЛА штамів, вилучених від хворих на ГКІ, були достовірно вищими у *E. faecalis*, ніж у *E. faecium* (p<0,05). Всі антилізоцимоактивні ентерококи, які вилучено з кишечника здорових дітей належали до виду *E. faecalis*.

Таким чином, аналіз наших даних по вивченню АЛА у ентерококів, вилучених з кишечника хворих на ГКІ і здорових дітей показав, що пенетрантність і експресивність даної активності залежала від наявності запального процесу в кишечнику, що узгоджується з даними інших дослідників [1]. Більш виражена експресія АЛА у ентерококів, вилучених від хворих, підтверджує відому думку про віднесення факторів персистенції до факторів патогенності.

Ентерококи належать до убіквітарних мікроорганізмів, які можуть вегетувати як у кишечнику (природній екології), так і в інших біотопах організму людини з ініціацією там гнійно-запального процесу.

Відомо, що при міграції патогенів в інші біотопи вегетування відбувається модифікація факторів персистенції, в тому числі АЛА. З іншого боку, можливість міграції мікробів із одного біотопу в інший може бути пов'язана з його кількісною характеристикою та рівнем АЛА [2, 8]. Дослідники встановили, що у стафілококів, вилучених зі шкіри біля місця ураження більш виражена експресія АЛА, ніж у стафілококів, ізольованих з місця ураження або здорової шкіри.

Для оцінки інформативності АЛА ентерококів, вилучених із патологічного матеріалу, нами було проаналізовано результати вивчення цієї ознаки у штамів, ізольованих із виділень трофічних виразок і кишечника хворих на цукровий діабет з синдромом “діабетична стопа”. Дані представлені в табл. 2.

Таблиця 2

Пенетрантність АЛА у штамів ентерококів, вилучених від хворих на цукровий діабет

Екотоп походження ентерококів:	Кількість вивчених штамів	Кількість штамів, що проявляють АЛА	
		абс.	(M±m), %
трофічні виразки	28	26	92,8±4,9
товстий кишечник	23	17	86,9±7,0

При аналізі отриманих даних не виявлено достовірної різниці між пенетрантністю АЛА у штамів обох проаналізованих груп ($p > 0,05$).

Під час досліджень встановлено, що діапазон експресії АЛА ентерококів, вилучених із трофічних виразок складав від 1 до 4 мкг/мл. При цьому, середній рівень АЛА у штамів, ізольованих із трофічних виразок дорівнював ($2,25 \pm 0,1$) мкг/мл. Аналіз показав, що низька АЛА спостерігалась у ($32,2 \pm 8,8$) % штамів цієї групи, середня – у ($50,0 \pm 8,3$) % і висока – у ($17,8 \pm 7,2$) % штамів. Серед антилізоцимоактивних ентерококів, вилучених із трофічних виразок до виду *E. faecalis* належало 27 штамів і до виду *E. faecium* – 2.

Відомо, що підвищення АЛА ентеробактерій в шлунково-кишковому тракті є фактором ризику розвитку ендогенних інфекцій [5]. На наш погляд, це положення відноситься і до ентерококів, кишкові штами з високим рівнем АЛА можуть бути потенційно небезпечними. З ніш природного вегетування, шляхом транслокації ентерококи можуть потрапляти в фагоцити регіонарних лімфатичних вузлів, де проліферують і потім гематогенним шляхом розносяться в різні органи, викликаючи ендогенні інфекції. Для перевірки даного припущення ми паралельно вивчали рівень АЛА у мікроорганізмів роду *Enterococcus*, вилучених із вмісту товстого кишечника цих же хворих.

Оцінка експресивності АЛА серед штамів, вилучених із кишечника хворих на цукровий діабет показала, що значення її знаходились у межах від 1 до 4 мкг/мл. При цьому, середній рівень АЛА штамів, вилучених із кишечника, складав ($2,1 \pm 0,2$) мкг/мл, що достовірно не відрізнялось від рівня АЛА штамів, вилучених із трофічних виразок ($p > 0,05$). Слід відзначити, що низьку АЛА мали ($41,3 \pm 10,2$) % кишкових штамів, середню – ($41,3 \pm 10,2$) % і високу – ($17,4 \pm 7,9$) %.

При попарному порівнянні АЛА ентерококів, вилучених від одного і того ж хворого (з трофічної виразки і з кишечника) встановлено, що в ($89,5 \pm 7,0$) % випадків здатними інактивувати лізоцим були обидва штами. Однак, в ($10,5 \pm 7,0$) % випадків наявність вказаної ознаки виявлено тільки у ентерококів, які вилучено з трофічних виразок.

Експресивність АЛА в ($52,6 \pm 11,4$) % випадків співпадала у штамів, вилучених із трофічних виразок і з кишечника, при цьому у ($30,0 \pm 14,5$) % парних штамів рееструвались високі значення АЛА, у ($50,0 \pm 15,8$) % – середні і у ($20,0 \pm 12,6$) % – низькі. Серед парних штамів з неоднаковим рівнем АЛА показники були вищими у ентерококів, ізольованих із виділень трофічних виразок.

Між АЛА штамів обох проаналізованих груп нами була встановлена пряма лінійна залежність ($r = 0,6$, $p < 0,01$).

На наш погляд, одержані результати вивчення АЛА дозволяють припустити ендогенне походження штамів, вилучених із трофічних виразок хворих на цукровий діабет з синдромом діабетичної стопи.

Наші дані співпадають с результатами досліджень мікрофлори вогнищ хірургічної інфекції м'яких тканин різної локалізації. Дослідники встановили перевагу ендогенної мікрофлори, яка має значно більшу тропність та резистентність до тканин макроорганізму і "витискує" екзогенну мікрофлору в процесі конкуренції. Однак, на думку деяких вчених, представники умовно патогенної мікрофлори, в основному грампозитивні коки, відіграють роль ініціюючих агентів раньової інфекції. При наявності невисокого персистентного потенціалу коків, не дозволяючого тривалий час протистояти захисним силам організму, відбувається швидка елімінація збудника із рани. Грампозитивні коки з високим патогенним потенціалом створюють умови для можливого розвитку у вогнищі хірургічної інфекції грамнегативних мікроорганізмів [9]. Але, існує думка і ми з цим погоджуємося, що при цукровому діабеті, мікроорганізми навіть з малим персистентним потенціалом можуть призвести до розвитку гнійно-запального процесу в м'яких тканинах. При глибокій дисфункції фагоцитарної ланки імунітету, яка характерна для цукрового діабету, мало значимим є сукупність біологічних властивостей збудників, спрямованих на інактивацію вже первинно зворушених механізмів захисту організму «хазяїна» [10].

Висновки. Пенетрантність і експресивність АЛА ентерококів залежала від наявності гнійно-запального процесу. Згідно з нашими дослідженнями, АЛА у 2,6 рази частіше зустрічалась у ентерококів, вилучених від хворих на ГКІ, ніж від здорових дітей. Середнє значення АЛА штамів, вилучених із товстого кишечника хворих на ГКІ, дорівнювало ($1,4 \pm 0,1$) мкг/мл, що в 1,4 рази перевищувало аналогічний показник у штамів, ізольованих від здорових дітей.

У хворих на цукровий діабет АЛА була характерною для ($86,9 \pm 7,0$) % кишкових штамів і ($92,8 \pm 4,9$) % штамів, вилучених із трофічних виразок. Середній рівень АЛА у штамів, ізольованих із трофічних виразок достовірно не відрізнявся від рівня АЛА кишкових штамів і складав ($2,25 \pm 0,1$) мкг/мл і ($2,1 \pm 0,2$) мкг/мл відповідно.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується вивчення інших

факторів патогенності, спрямованих на інактивацію механізмів захисту організму хазяїна, а саме антикомплементарної та антиінтерференової активностей.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Билимова С. И. Характеристика факторов персистенции энтерококков // Журн. Микробиол. – 2000. – № 4. – С. 104 – 105.
2. Брудастов Ю. А. Свойства *Escherichia coli* как факторы транслокации из кишечника во внутренние органы // Вестник ОГУ. – 2005. – № 5, Приложение Биология и медицина. – С. 9 – 14.
3. Бухарин О. В., Билимова С. И., Чертков К. Л. Механизмы выживания энтерококков в организме хозяина // Журнал микробиологии эпидемиологии иммунологии. – 2002. – № 3. – С. 100 – 106.
4. Бухарин О. В., Усвяцов Б. Я., Шеенков Н. В. Характеристика антилизоцимной активности золотистого стафилококка при разных типах течения экспериментальной инфекции // Бюлетень экспериментальной биологии и медицины. – 1993. – № 2. – С. 178 – 180.
5. Габриэлян Н. И. Энтерококки как возбудители послеоперационных инфекционных осложнений / Н. И. Габриэлян, Е. М. Горская, Т. С. Спирина [и др.] // Журн. Микробиол. – 2007. – № 4. – С. 50 – 53.
6. Соколов В. Ю. Ускоренный метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1991. – № 6. – С. 64 – 65.
7. Тюрин В. П., Тихонов Ю. Г. Современные взгляды на лечение энтерококкового эндокардита // Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. – 2004. – Т. 6, № 4. – С. 360 – 364.
8. Усвяцов Б. Я. Роль факторов персистенции и вирулентности при микробиологических изменениях в организме человека // Жур. Микробиол. – 2006. – № 4. – С. 62 – 64.
9. Фадеев С. Б., Бухарин О. В. Микробиологические особенности хирургической инфекции мягких тканей // Жур. Микробиол. – 1999. – № 4. – С. 11 – 14.
10. Французов В. Н., Хайкина Е. В., Решедько Г. К. Диагностика и лечение хирургических инфекций стопы при сахарном диабете // Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 235 – 244.
11. Deshpande L. M. Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of vancomycin-resistant enterococci from North America and Europe: a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program / L. M. Deshpande, T. R. Fritsche., G. J. Moet [et al.] // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2007. – Vol. 58, No 2. – P. 163 – 170.
12. Sood S. Enterococcal infection and antimicrobial resistance / S. Sood, M. Malhotra, B. K. Das // Indian Journal Med. Res. – 2008. – № 128. – P. 111 – 121.

УДК 57083.1:579.86:579.22

АНТИЛИЗОЦИМНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭНТЕРОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ЭКОТОПОВ

Мироненко Л. Г., Перетятко Е. Г., Холодная Т. В.

Резюме. В работе представлены результаты изучения антилизоцимной активности (АЛА) энтерококков, выделенных из разных экотопов. Установлено, что пенетрантность и экспрессивность АЛА зависит от наличия гнойно-воспалительного процесса. Способность инактивировать лизоцим выявлена у (24,0±8,5) % штаммов, выделенных из кишечника здоровых детей, у (63,3±8,8) % штаммов, изолированных из кишечника детей с острыми кишечными заболеваниями (ОКЗ). Средний уровень АЛА штаммов, изолированных от детей с ОКЗ равнялся (1,4±0,1) мкг/мл и превышал в 1,4 раза аналогичный показатель штаммов, выделенных от здоровых детей. У больных сахарным диабетом АЛА была характерна для (86,9±7,0) % кишечных штаммов и (92,8±4,9) % штаммов, выделенных из трофических язв. Среднее значение АЛА у штаммов, выделенных из кишечника и содержимого трофических язв больных сахарным диабетом составляло (2,1±0,2) мкг/мл и (2,25±0,1) мкг/мл соответственно.

Ключевые слова: энтерококки, антилизоцимная активность, экотопы.

UDC 57083.1:579.86:579.22

ANTILYSOZYME ACTIVITY of ENTEROCOCCUS, ISOLATED FROM DIFFERENT ECOTOPES

Myronenko I.G., Peretyatko E.G., Kholodnaya T.V.

Summary. The results of studying of antilysozyme activity (ALA) of enterococcus, isolated from different ecotopes are presented in this work. It was established that ALA penetrance and expressivity depended on pyoinflammatory process availability. Ability to lysozyme inactivation was detected for (24,0±8,5) % strains isolated from healthy children intestines, for (63,3±8,8) % strains isolated from intestines of children with acute intestinal diseases. Mean level of enterococcus strains ALA was (1,4±0,1) mcg/ml that exceeded the similar index for strains isolated from healthy children in 1.4 times. In patients with diabetes mellitus (86,9±7,0) % strains isolated from intestine and (92,8±4,9) % isolated from trophic ulcers had ALA. Mean levels of ALA for strains isolated from intestine and trophic ulcers were (2,1±0,2) mcg/ml and (2,25±0,1) mcg/ml respectively.

Key words: enterococcus, antilysozyme activity, ecotopes.

Стаття надійшла 11.02.2010 р.