

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *Enterococcus*

ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова
Национальной академии медицинских наук Украины» (г. Харьков)

Работа выполнена в рамках договора НН/2/2013 «Підтримання та розвиток філіалу Музею-Депозитарію патогенних для людини мікроорганізмів».

Вступление. Энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры человека, популяционный уровень их в толстом кишечнике составляет 10^6 - 10^8 жизнеспособных клеток в 1 грамме фекалий [6]. В последнее время возросла роль этих микроорганизмов в возникновении гнойно-септических и внутрибольничных инфекций. Основными нозологическими формами, при которых выделяют энтерококки, являются инфекции мочевыводящих путей, затем следуют раневые и интраабдоминальные инфекции, далее – ангиогенные инфекции [3, 4, 5]. Несмотря на это данные об этиопатогенетической значимости микроорганизмов рода *Enterococcus* в патологии человека крайне ограничены. Пересмотру оценки роли энтерококков в патогенезе энтерококковых инфекций способствовало обнаружение у них факторов патогенности [7, 8]. Однако этот вопрос является не до конца изученным. Основным аргументом в пользу их патогенетической роли является высокая частота обнаружения генов патогенности у штаммов, выделенных при инфекционных процессах, и практически полное отсутствие у штаммов, выделенных из кишечника здоровых лиц и из окружающей среды. В связи с этим актуальными являются исследования по изучению биологических свойств, в том числе факторов патогенности, клинических штаммов энтерококков, выделенных из разных экотопов. Немаловажное значение имеет создание коллекции актуальных штаммов энтерококков для дальнейшего их использования в научных исследованиях.

До 2005 года коллекция микроорганизмов рода *Enterococcus* Музея микроорганизмов ГУ «ИМИ им. И. И. Мечникова НАМН Украины» была представлена тремя штаммами *E. faecalis*, находящимися на хранении с 1955 года. С 2006 года коллекция пополнилась актуальными штаммами и сейчас насчитывает 53 штамма.

Целью работы явилась проверка жизнеспособности и проведение патофенотипирования музейных штаммов микроорганизмов рода *Enterococcus*, находящихся на длительном хранении в лиофилизированном состоянии.

Объект и методы исследования. Объектами исследования были 45 музейных штаммов *Enterococcus*, выделенных из разных экотопов: из

толстого кишечника здоровых детей – 7; из толстого кишечника детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) – 13; из содержимого трофических язв у больных сахарным диабетом с синдромом «диабетическая стопа» – 14; из толстого кишечника этих же больных – 11. Распределение энтерококков по видовой принадлежности согласно данным паспортов штаммов представлено на **рис. 1**.

Культуры хранились в лиофилизированном состоянии при температуре 6-8 °С. Для проведения исследований содержимое ампул суспендировали в сахарном бульоне и высевали на энтерококкагар (Оболенск), посева инкубировали 48 часов при температуре 37 °С. Для проверки стабильности биохимических свойств использовали EN-COCCUStest производства PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехия. В рамках исследования определяли адгезивную, желатиназную, казеиназную и гемолитическую активности энтерококков [1, 2, 4]. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Excel 2007, «Biostat-4».

Результаты исследований и их обсуждение. В ходе исследования установлено, что все, взятые в опыт лиофилизированные образцы *Enterococcus* были жизнеспособными. Для установления соответствия первичным характеристикам были изучены биохимические свойства энтерококков и проведена их видовая идентификация. Анализ результатов показал соответствие биохимических свойств исследуемых энтерококков исходному фенотипу, указанному в паспортах штаммов (**рис. 1**).

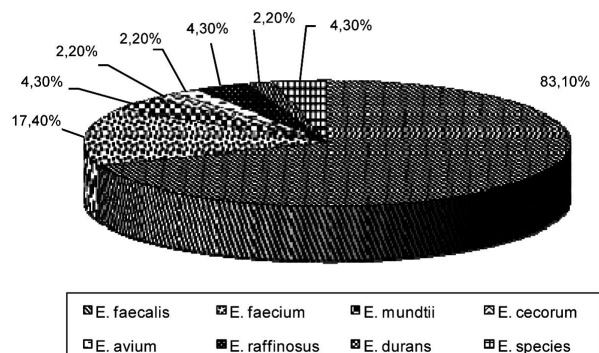


Рис. 1. Распределение энтерококков по видовой принадлежности.

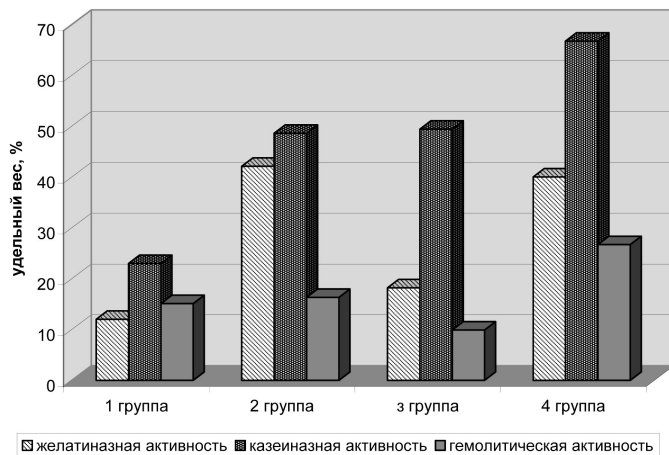


Рис. 2. Пенетрантность желатиназной, казеиновой и гемолитической активностей энтерококков.

Примечание: 1 группа – штаммы, выделенные из кишечника здоровых детей; 2 группа – штаммы, выделенные из кишечника детей с ОКИ; 3 группа – штаммы, выделенные из кишечника у больных сахарным диабетом; 4 группа – штаммы, выделенные из трофических язв у больных сахарным диабетом.

Следует отметить, что доминирующими среди изученных нами штаммов энтерококков были виды *E. faecalis* и *E. faecium*, с меньшей частотой встречались другие виды, а именно: *E. mundtii*, *E. cecorum*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. durans*. При этом из кишечника здоровых детей выделены *E. faecalis*, *E. faecium*, а также *E. avium* и *E. raffinosus*. Видовой состав энтерококков, выделенных от детей с ОКИ, представлен *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. cecorum*. Среди энтерококков, выделенных из толстого кишечника у больных сахарным диабетом, идентифицированы виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. raffinosus*, *E. durans*. Штаммы, выделенные из трофических язв у больных сахарным диабетом, представлены видом *faecalis*.

Следующим этапом нашей работы было определение факторов патогенности у музейных энтерококков и проведение сравнительного анализа патогенного потенциала штаммов в зависимости от экотопов их выделения.

Установлено, что все взятые в опыт штаммы характеризовались адгезивной активностью, при этом экспрессивность ее зависела от экотопа вегетирования энтерококков. Следует отметить, что высокими адгезивными свойствами характеризовались штаммы, выделенные из кишечника детей с ОКИ. Индекс адгезивности (ИАМ) у этих

штаммов составлял ($6,7 \pm 0,5$), что в 1,4 раза превышало аналогичный показатель штаммов, выделенных от здоровых детей ($4,7 \pm 0,8$) ($p < 0,05$). Высокой степенью адгезивности обладали штаммы, выделенные от больных сахарным диабетом, при этом средний показатель ИАМ у штаммов из трофических язв составлял ($10,3 \pm 0,4$), что в 1,5 раза выше аналогичного показателя кишечных штаммов, выделенных у этих же больных ($6,8 \pm 0,3$) ($p < 0,05$).

При анализе протеолитической активности энтерококков установлено, что ее пенетрантность зависела от наличия воспалительного процесса в экотопе вегетирования штаммов (рис 2). Так, желатиназная и казеиновая активность почти в 2 раза чаще регистрировалась у штаммов, выделенных из кишечника детей с ОКИ и из трофических язв у больных сахарным диабетом, нежели в группах сравнения ($p < 0,05$). Также в этих группах определена большая экспрессивность казеиновой активности.

При анализе гемолитической активности энтерококков, выделенных из кишечника здоровых детей и детей, больных ОКИ, достоверных различий не выявлено. Следует отметить, что среди энтерококков, изолированных из трофических язв у больных сахарным диабетом, штаммов, обладающих гемолизом, выявлено в 2,6 раз больше, чем среди кишечных штаммов ($p < 0,05$).

Выводы. В результате проведенных исследований установлено, что все штаммы энтерококков, находящихся на длительном хранении в лиофилизированном состоянии были жизнеспособными.

Установлена более выраженная пенетрантность и экспрессивность факторов патогенности (адгезивной, желатиназной, казеиновой и гемолитической активностей) среди штаммов, выделенных из экотопов, характеризующихся наличием гнойно-воспалительного процесса. Проведенные нами исследования позволили дополнить паспорта музейных штаммов микроорганизмов рода *Enterococcus* данными их патотипирования.

Перспективы дальнейших исследований. Считаю целесообразным продолжить исследования в данном направлении и провести патотипирование музейных штаммов энтерококков, выделенных из разных экотопов.

Литература

1. Брилис В. И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В. И. Брилис // Лабораторное дело. – 1986. – №4. – С. 210 – 212.
2. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии / Ф. Герхардт ; [пер. с англ.]. – М.: Мир, 1984. – Т. 2. – 472 с.
3. Мироненко Л. Г. Видовий склад та антибіотикорезистентність ентерококів, ізольованих від хворих на нейрохірургічну патологію / Л. Г. Мироненко, І. П. Ткачик, О. Г. Перетятко // Лабораторна діагностика. – 2013. – № 1. – С. 39 – 43.
4. Мироненко Л. Г. Протеолітична активність ентерококів, вилучених з вмісту трофічних виразок хворих на цукровий діабет / Л. Г. Мироненко, О. Г. Перетятко // Лабораторна діагностика. – 2008. – № 1. – С. 67 – 70.
5. Сисин Е. И. Возбудители внутрибольничных инфекций: энтерококки / Е. И. Сисин // Уход. – 2013. – №3. – С. 47–48.
6. Янковский Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления / Д. С. Янковский. – К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с.

- AhrC and Eep Are Biofilm Infection-Associated Virulence Factors in *Enterococcus faecalis* / Kristi L. F. [et al.] // *Infect. Immun.* – 2013. – Vol. 81, №5. – P. 1696-1708.
- Teixeira N. The incongruent gelatinase genotype and phenotype in *Enterococcus faecalis* are due to shutting off the ability to respond to the gelatinase biosynthesis-activating pheromone (GBAP) quorum-sensing signal / N. Teixeira, S. Santos, P. Hancock // *Microbiology.* – 2012. – № 158 – P. 519–528.

УДК 615. 015. 8:616-078

БИОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ РОДУ *Enterococcus*

Мируненко Л. Г., Перетятко О. Г.

Резюме. Наведено результати перевірки життєздатності 45 ліофілізованих зразків клінічних штамів мікроорганізмів роду *Enterococcus*, що знаходяться на збереженні в Музеї мікроорганізмів. Проаналізовано експресивність та пенетрантність факторів патогенності (адгезивної, желатиназної, казеїназної та гемолітичної активностей) ентерококків у залежності від екотопу вегетування. Уточнено та доповнено паспорти штамів.

Ключові слова: ентерококи, адгезивна, желатиназна, казеїназна та гемолітична активності.

УДК 615. 015. 8:616-078

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *Enterococcus*

Мируненко Л. Г., Перетятко Е. Г.

Резюме. Приведены результаты проверки жизнеспособности 45 лиофилизированных образцов микроорганизмов рода *Enterococcus*, выделенных из клинического материала и находящихся на хранении в Музее микроорганизмов. Проанализирована экспрессивность и пенетрантность факторов патогенности (адгезивной, желатиназной, казеиназной и гемолитической активностей) энтерококков в зависимости от экотопа вегетирования. Уточнены и дополнены паспорта штаммов.

Ключевые слова: энтерококки, адгезивная, желатиназная, казеиназная и гемолитическая активности.

UDC 615. 015. 8:616-078

Biological Properties of the Microorganisms Museum Strains from the *Enterococcus* Genus

Myronenko L. G., Peretyatko E. G.

Abstract. Enterococci are representatives of the normal human intestinal microflora, but in the recent years the role of these microorganisms increased the causing of the suppurative-septic and nosocomial infections. The main nosological forms, where enterococci are released, are urinary tract infections, wound, intraabdominal and angiogenic infections. In this regard studies on the biological properties including risk factors, clinical strains of enterococci released from different ecotopes are relevant.

The purpose of the study was vitality testing and pathofenotyping of the microorganisms museum strains from the *Enterococcus* genus, located on the long-term storage at the Microorganisms Museum in the freeze-dried state.

The objects of the study were 45 museum strains of the *Enterococcus*, released from different ecotopes: from the intestines of the healthy children and children with acute intestinal infections, from the intestines and the lining of the trophic ulcers from patients with diabetes mellitus.

For the research the contents of the vials were suspended in sugar broth and plated on enterokokkagar, platings were incubated 48 hours at the temperature of 37 °C. The reidentification of enterococci was performed using EN – COCCUStest produced by PLIVA – Lachema Diagnostika, Czech Republic. Adhesive, gelatinase, caseinase and hemolytic activities of the enterococci were determined by conventional methods.

Analysis of the results for species identification of the enterococci demonstrated the compliance of the biochemical properties with the original phenotype specified in the strains passport. Dominant among the strains that we study were species *E. faecalis* (83,1%) and *E. faecium* (17,4%), less frequently occurred other species, namely: *E. mundtii* (4,3%), *E. cecorum* (2,2%), *E. avium* (2,2%), *E. raffinosus* (4,3%), *E. durans* (2,2%), *Enterococcus species* (4,3%). All strains used in the experiment were characterized by adhesive activity, with its expressiveness depended on enterococci vegetation ecotope. The adhesiveness index (AI) for the strains released from children with acute intestinal infections and from trophic ulcers from patients with diabetes mellitus 1,4 – 1,5 times higher than the same value of the strains from the comparison group.

In the analysis of the enterococci proteolytic activity was found that its penentrance was dependent on the presence of the inflammation in strains vegetation ecotope. Thus, the gelatinase and caseinase activity almost 2 times more often was registered in strains released from intestines of the children with acute intestinal infections and from trophic ulcers from patients with diabetes mellitus, rather than in the comparison group. Also in these groups is determined greater expressiveness of the caseinase activity. Strains having hemolytic activity, were determined 2,6 times greater among the enterococci released from trophic ulcers from patients with diabetes mellitus than among intestinal strains from the same patients ($p < 0,05$). The results of the conducted studies demonstrate that all strains of enterococci that are on long-term storage in a lyophilized state were viable. Was conducted their pathofenotyping. Was established more evident penentrance and expressivity of pathogenicity factors among strains isolated from ecotopes characterized by the presence of inflammatory processes.

Keywords: enterococci, adhesive, gelatinase, caseinase and hemolytic activities.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 15. 09. 2014 р.