

УДК 579.86:579.252.2:577.213.3(045)

Л.Г. Мироненко

ДЕТЕКЦІЯ ГЕНІВ ПАТОГЕННОСТІ У *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ЗА ДОПОМОГОЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

ДУ “Інститут мікробіології та імунології
імені І.І. Мечникова АМН України”,
м. Харків, Україна

Як відомо, ентерококи входять до складу нормальної мікрофлори кишечника, але досить часто їх виділяють за різних патологічних станів [1–4, 11]. Однією із складних задач є оцінка етіологічного значення ентерококів, вилучених із нестерильних локусів макроорганізму, наприклад, з раньової поверхні, піхви, кишечника. До останнього часу вирішальне значення у діагностиці неспецифічних інфекцій при визначенні етіологічної значущості надавалося чисельності мікроорганізмів, вилучених із клінічного матеріалу. Проте, з’являються роботи, в яких дослідники більш суттєвим визнають наявність у виділених культур факторів патогенності [6]. Цінність цього критерію підвищується при виявленні не одного, а декількох факторів, і особливо в патогенетично значущій дозі і рівні активності.

Відомо, що наявність у ентерококів комплексу факторів патогенності забезпечує можливість їх транслокації з місць природного перебування в інші органи і тканини, з наступною ініціацією запального процесу і підтриманням його протягом тривалого часу [4, 13]. Деякі вчені вважають, що при транслокації умовно-патогенної мікрофлори (УПМ) із місць природного перебування в інші біотопи відбувається модифікація фенотипових характеристик мікроорганізмів та збільшення їх патогенного потенціалу [7].

До теперішнього часу залишається суперечним питання про етіологічну роль ентерококів у виникненні трофічних виразок у хворих на цукровий діабет і вивчення генів патогенності, на наш погляд, буде сприяти перегляду оцінки клінічної ролі ентерококів. Раніше нами було проведено вивчення факторів патогенності ентерококів на фенотиповому рівні й доведено, що

пенетрантність та ступінь вираженості протеолітичної, гіалуронідазної та РНК-азної активності у штамів корелює з наявністю гнійно-запального процесу в екоотопі їх вегетування [5].

Мета роботи: визначення генів патогенності: *asa1* (субстанція агрегації), *esp* (ентерококовий поверхневий протеїн), *gelE* (желатиназа), *cytA* (цитолізін) і *hyl* (гіалуронідаза) у *Enterococcus faecalis* за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об’єктом досліджень були 20 штамів *Enterococcus faecalis*, вилучених у хворих на цукровий діабет з синдромом “діабетична стопа”, з них 11 штамів — з поверхні трофічної виразки, 9 — з кишечника цих хворих. Для визначення генів патогенності мікроорганізмів роду *Enterococcus* проводили ПЛР-ампліфікацію фрагментів генів, які кодують фактори патогенності: *asa1*, *esp*, *cytA*, *gelE* та *hyl*. Детекція генів патогенності проведена з використанням мультиплексної ПЛР. Дослідження проводились на базі лабораторії медичної мікробіології разом з Музеєм патогенних для людини мікроорганізмів ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України”.

Бактеріальну ДНК для проведення ПЛР-аналізу виділяли з добової культури, для цього використовувався комерційний набір “ДНК-сорб АМ” (“Амплі Сенс”, Росія).

Для детекції генів патогенності використовувались системи праймерів авторів [10]. Послідовності праймерів та розміри продуктів ампліфікації наведено у табл. 1. ПЛР проводили в об’ємі 50 мкл на ампліфікаторі, що програмується, “Терцік” (“ДНК-технологія”, Росія). Реакційна суміш мала такі компоненти: 20 mM Tris HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 од Tag-полімерази (“Амплі Сенс”, Росія), по 0,1 мкм праймерів *asa1*, *gelE* і *hyl*; по 0,2 мкм праймерів *cytA* та *esp*; 5 мкл бактеріальної суспензії.

ПЛР проводили за таких умов: початкова денатурація при температурі 95°C — 15 хв.; 30 циклів денатурації при температурі 94°C — 1 хв.; відпал при 56°C — 1 хв.; елонгація при температурі 72°C — 1 хв. В останньому циклі ампліфікації етап елонгації при температурі 72°C

Перелік праймерів, використаних у роботі

ген	Фактор патогенності	Праймер	Послідовність праймера, 5'–3'	Розмір продукту (пар нуклеотидів)
<i>asa1</i>	Aggregation substance	ASA 11 ASA 12	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375
<i>hyl</i>	Gelatinase	GEL 11 GEL 12	TATGACAATGCTTTTGGGAT AGATGCACCCGAAATAATATA	213
<i>cylA</i>	Cytolysin	CYT I CYT IIb	ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688
<i>esp</i>	Enterococcal surface protein	ESP 14F ESP 12R	AGATTTTCATCTTTGATTCTTGG AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510
<i>hyl</i>	Hyaluronidase	HYL n1 HYL n2	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276

продовжувався 10 хв. [10]. Продукти ампліфікації розділяли в 1,5% агарозному гелі, забарвленому розчином бромистого етидію, візуалізували в ультрафіолетовому світлі і фотографували.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Сумарні результати, що отримали при визначенні генів патогенності *asa1*, *esp*, *gelE*, *cylA* та *hyl* у штамів *E. faecalis* за допомогою ПЛР — детекції наведено в табл. 2.

При детекції методом мультиплексної ПЛР генів патогенності у 13 (65,0±10,9%) штамів *E. faecalis* були візуалізовані амплікони розміром, що відповідає відмітці 375 пар нуклеотидів (п.н.) на треках маркера молекулярної маси ДНК та співпадає з розміром специфічного фрагменту гену *asa1*, що свідчить про наявність субстанції агрегації у цих штамів. Слід відмітити, що з 13

штамів — 7 штамів ізолювано з трофічної виразки, а 6 — з кишечника цих хворих.

Результати наших досліджень співпадають з даними польських вчених, згідно яких ген *asa1* було визначено у 54% клінічних ізолятів [8]. Відомо, що субстанція агрегації обумовлює кон'югацію і адгезію до клітин макроорганізму, зокрема до епітелію кишечника, нирок та вегетацію на клапанах серця. Деякі вчені вважають субстанцію агрегації фактором патогенності ентерококів, пояснюючи це тим, що частіше ген *asa1* визначається серед клінічних ізолятів [4, 14].

Ген патогенності *esp*, який кодує ентероковий поверхневий білок, було визначено із ДНК 9 (45,0±11,1%) штамів, з них 3 штами вилучено з трофічної виразки, а 6 — з кишечника цих хворих. Роль *esp* гену до кінця не визначена, вважають,

Таблиця 2

Результати патогенотипування штамів *E. faecalis*, ізолюваних від хворих на цукровий діабет

	<i>asa1</i>	<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>cylA</i>	<i>hyl</i>	Штами	
						Абс.	М±m%
Комбінація генів патогенності	+	+	+	+	–	2	10,0±6,7
	+	–	+	+	+	1	5,0±4,9
	+	+	+	–	–	3	15,0±8,0
	+	–	+	+	–	3	15,0±8,0
	+	–	+	–	–	4	20,0±9,0
	–	+	+	–	–	2	10,0±6,7
	–	+	–	–	–	1	5,0±4,9
	–	–	+	+	–	1	5,0±4,9
	–	–	+	–	–	2	10,0±6,7
	–	–	–	–	+	1	5,0±4,9

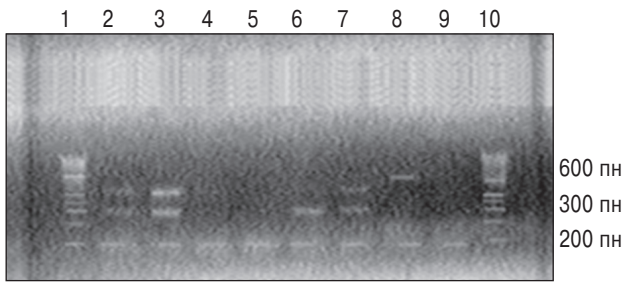


Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК фрагменту генів *asa1*, *esp*, *gelE*, *cytA*, *hyl* *E. faecalis* (1 і 10 — маркер молекулярної маси, 2–9 — клінічні штами)

що він обумовлює адгезію та колонізацію ентерококів та дозволяє уникати впливу ефекторів імунологічної відповіді [4, 12].

Із ДНК 7 (35,0±10,9)% штамів було отримано продукт ампліфікації розміром 688 п.н., що характерно для гена *cytA*. Серед них з трофічної виразки виділено 3 штами, а з кишечника — 4 штами. Цитолізін — цитолітичний (зокрема, гемолітичний) токсин білкової природи, який має також властивості бактеріоцину. Цитолізін з високою частотою виявляється у штамів *E. faecalis*, вилучених при інфекціях різної локалізації [13].

Встановлено, що кількість штамів з геном *gelE*, який кодує протеазу, становила 18 (90,0±6,7%), з них 11 (61,1±11,5%) штамів ізольовано з трофічної виразки, а 7 (38,9±11,5%) — з кишечника цих хворих ($p > 0,05$, різниця не достовірна). Протеаза ентерококів є позаклітинною металопротеазою, яка гідролізує желатин, казеїн, гемоглобін та інші біоактивні пептиди, тим самим спричиняє цитотоксичну дію. Згідно даних деяких вчених ген *gelE* найчастіше виявляється у штамів, вилучених з клінічного матеріалу, ніж у здорових осіб [3, 4, 9, 11]. Також вважають, що продукція желатинази сприяє транслокації фекальних ентерококів в інші біотопи організму [15].

Наші експерименти показали, що у 4 (20,0±9,0%) штамів, ізольованих з кишечника, визначено продукт ампліфікації розміром 276 п.н., який свідчить про наявність гена *hyl* (Hyaluronidase). Цей ген кодує гіалуронідазу — фактор, що підвищує інвазійну властивість мікроорганізмів за рахунок розщеплення гіалуронової кислоти в мембранах клітин сполучної тканини макроорганізму. Слід відмітити, що 1 штам було вилучено з трофічної виразки, а 3 — з кишечника цих хворих. У науковій літературі описані штами *E. faecalis*, які продукують гіалуронідазу, серед мікроорганізмів, що викликають хвороби періодонту [13].

Як видно з табл. 2, гени патогенності у дослідних штамів знаходились в різних комбінаціях.

Встановлено, що частіше зустрічались штами з комплексом 2–3 генів, питома вага таких штамів складала 13 (65,0±10,9%). Слід підкреслити, що лише у 2 (10,0±6,7%) штамів було визначено по одному гену.

На рисунку представлено приклад електрофореграми продуктів ампліфікації ДНК фрагментів генів *asa1*, *esp*, *gelE*, *cytA* та *hyl* штамів *E. faecalis*.

ВИСНОВКИ

1. Проведені нами дослідження показали доцільність використання мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для визначення генів патогенності мікроорганізмів роду *Enterococcus*.

2. Встановлено, що у штамів *E. faecalis*, вилучених з кишечника та трофічної виразки хворих на цукровий діабет, визначено гени патогенності: *gelE*, *asa1*, *esp*, *cytA*, і *hyl* з частотою 18 (90,0±6,7%), 13 (65,0±10,9%), 8 (40,0±11,2%), 7 (15,0±8,2%), та 2 (10,0±6,7%) відповідно.

3. Встановлено, що найбільш частіше у штамів *E. faecalis* зустрічався ген патогенності *gelE*, що кодує желатиназу — білок, який спричиняє цитотоксичну дію.

4. Доведено, що у більшості штамів *E. faecalis* 13 (65,0±10,9%) було визначено комплекс із 2–3 генів патогенності.

Автор висловлює подяку за технічну допомогу у проведенні досліджень провідному науковому співробітнику лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського АМН України” к.м.н., с.н.с. Ж.Е. В’ялих.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічні властивості ентерококів, виділених при бактеріальних уретритах та простатитах / О.І. Поліщук, В.В. Яновська, Є.О. Середняцька [та ін.] // Лаб. діагностика. — 2007. — № 3 (41). — С. 44–47.
2. Бухарин О.В. Механізми виживання ентерококів в організмі хазяїна / О.В. Бухарин, С.І. Билимова, К.Л. Чертков // Журн. мікробиол., епідеміол. і імунології. — 2002. — № 3. — С. 100–106.
3. Колоджієва В. В. Епідеміологічні особливості гнійно-септичних інфекцій, викликаних ентерококками і стрептококками групи В у пацієнтів гінекологічного стаціонара та жіночої консультації : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. мед. наук. — Санкт-Петербург, 2006. — 24 с.
4. Лисецьки П. Энтерококки: старые бактерии, новые проблемы / П. Лисецьки, Е. Микуцки, А. Сулик // Лаб.

- диагностика. — 2005. — № 1. — С. 11–13.
5. Мироненко Л.Г., Перетятко О.Г. Протеолітична активність ентерококів, вилучених з вмісту трофічних виразок хворих на цукровий діабет // Лаб. діагностика. — 2008. — № 1. — С. 67–70.
 6. Олина А. А. Неспецифические инфекционные заболевания влагаліща (медико-социальные, этиологические, клинко-діагностические особенности): автореф. дис. на соискание учен. степени докт. мед. наук. — М., 2010. — 39 с.
 7. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи / А.Р. Мавзютов, В.М. Бондаренко, Н.Ю. Жеребцова [и др.] // Журн. микробиол. — 2007. — № 1. — С. 89–97.
 8. Clonal Structure of *Enterococcus faecalis* Isolated from Polish Hospitals^ Characterization of Epidemic Clones / M. Kawalec, E. Danilowicz, A. Jakubczak [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2007. — Vol. 45, № 1. — P. 147–153.
 9. Contribution of Gelatinase, Serine Protease, and *fsr* to the Pathogenesis of *Enterococcus faecalis* Endophthalmitis / M. Engelbert, E. Mylonakis, F.M. Ausubel [et al.] // Infection and Immunity. — 2004. — Vol. 72, № 6. — P. 3628–3633.
 10. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital of *Enterococcus faecium* / Vankerckhoven V, van Autgaerden T, Vael C, [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 2004. — Vol. 42, № 10. — P. 4473–4479.
 11. Enterococcal infection and antimicrobial resistance / S. Sood, M. Malhotra, B.K. Das // Indian Journal Med. Res. — 2008. — № 128. — P. 111–121.
 12. Fisher K., Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus* // Microbiology. — 2009. — Vol. 155. — P. 11749–11757.
 13. Kayaoglu Guven. Virulence Factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship to Endontic Disease / Guven Kayaoglu // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. — 2004. — № 15 (5). — P. 308–320.
 14. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. / A. Hallgren, C. Claesson, B. Saeedi [et al.] // Int. J Med. Microbiol. — 2009. — Vol. 299, № 65. — P. 323–332.
 15. Zeng Jihg. Gelatinase Is Important for Translocation of *Enterococcus faecalis* across Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cell / Jihg Zeng, Fang Teng, Barbara E. Murray // Infection and Immunity. — 2005. — Vol. 73, № 3. — P. 1606–1612.

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ ПАТОГЕННОСТИ У *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ПРИ ПОМОЩИ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Л.Г. Мироненко

В статье представлены результаты патогенотипирования 20 штаммов *E. faecalis*, выделенных из кишечника и поверхности трофической язвы больных сахарным диабетом с синдромом “диабетическая стопа”. В реакции ПЦР установлено, что у штаммов чаще всего определялся ген патогенности *gelE* 18 (90,0±6,7%). Гены *asa1*, *esp*, *cylA*, *hyl* выявлялись в 13 (65,0±10,9%), 9 (45,0±11,1%), 7 (15,0±8,2%) и 4 (20,0±9,0%) случаях соответственно.

DETECTION OF GENES OF PATHOGENICITY IN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* BY MULTIPLEX POLYMERASE CHAIN REACTION

L.G. Myronenko

In article results of detection Genes of pathogenicity in 20 strains *E. faecalis*, isolated from patients by a diabetes with a syndrome “diabetic foot”. It is established that at strains the gene of pathogenicity *gelE* 18 (90,0±6,7%) was mostly determined. Genes *asa1*, *esp*, *cylA*, *hyl* came to light in 13 (65,0±10,9%), 9 (45,0±11,1%), 7 (15,0±8,2%) and 4 (20,0±9,0%) cases accordingly.