

## ХАРАКТЕРИСТИКА БИОПРОФИЛЕЙ БАКТЕРИЙ РОДА *Enterococcus*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ

Взросшее клиническое значение энтерококков актуализирует вопрос о безопасности их использования в качестве противомикробных биопрепаратов пробиотической направленности и диктует необходимость поиска алгоритма для эффективной дифференциации клинически значимых штаммов от представителей мутуалистической микробиоты.

Изучены биологические свойства бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из фекалий клинически здоровых продуктивных животных и от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями. Определены биофильные, характеризующие патогенные и непатогенные изоляты. Помимо генетических детерминант факторов вирулентности у штаммов, выделенных при патологии, обнаружены гемолитическая, желатиназная активность и факторы персистенции (АЛА, АКРА) с более высокими значениями признаков, чем у фекальных культур. Штаммы, изолированные из кишечника здоровых животных, характеризовались высокой активностью протеаз и не обладали способностью формировать биоплёнку.

Полученные результаты могут быть использованы для дифференциации патогенных вариантов *Enterococcus spp.* от симбиотических культур, входящих в состав кишечной нормобиоты.

**Ключевые слова:** *Enterococcus spp.*, дифференциация, факторы вирулентности, факторы персистенции, полимеразная цепная реакция.

Бактерии рода *Enterococcus* относятся к группе потенциально-патогенных микроорганизмов [25] и выступают в роли этиологического фактора инфекционно-воспалительных заболеваний животных [15], [18], [21]. Способность вызывать инфекционный процесс связана с наличием у энтерококков набора факторов патогенности: поверхностных белков, участвующих в процессах адгезии и инвазии [17], цитолитина [12], ферментов агрессии (протеаза [7], желатиназа [14], гиалуронидаза [5]).

С другой стороны, энтерококки, являясь представителями мутуалистической микробиоты кишечника млекопитающих и птиц [16], принимают участие в элиминации патогенных бактерий и обеспечивают колонизационную резистентность слизистых оболочек [2]. Как представителям нормобиоты энтерококкам также необходимы адгезины и бактериоцины, в том числе цитолитин.

В настоящее время клиническое значение бактерий рода *Enterococcus* существенно возросло, что актуализирует проблему дифференциации представителей мутуалистической микробиоты и этиологически значимых штаммов. Однако, до настоящего времени биологические свойства энтерококков – возбудителей

инфекционно-воспалительных заболеваний и резидентов кишечной микробиоты животных остаются мало изученными, что и предопределило цель настоящего исследования – изучить биофильные бактерии рода *Enterococcus*, выделенные от животных в норме и при патологии, и выявить наиболее информативные характеристики, позволяющие дифференцировать вирулентные и авирулентные штаммы энтерококков.

### Материалы и методы

В работе изучено 85 штаммов энтерококков, из них – 42 изолята видов *Enterococcus faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. flavescens*, *E. casseliflavus*, выделенные из фекалий клинически здоровых продуктивных животных, сформировали первую группу.

Во вторую группу были отнесены штаммы *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. durans*, изолированные от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями (15 штаммов – из экскрета половых органов самок при эндометритах, 2 – из секрета молочных желёз при маститах, 26 – из гнойного экссудата при

абсцессах мягких тканей и отитах) – всего 43 культуры.

Определение антилизоцимной (АЛА) и антикарнозиновой (АКрА) активностей энтерококков осуществляли фотометрическим методом по О.В. Бухарину с соавт. [4], [3]. За высокий уровень АКрА принимали значения признака более 2 мг/мл; за средний – от 1 до 2 мг/мл, за низкий – менее 1 мг/мл.

Образование биоплёнок бактериями оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в лунках стерильного 96-луночного полистиролового планшета [19].

Факторы вирулентности: гемолитическую и желатиназную активности культур *Enterococcus spp.* изучали по методам М.О. Биргера (1982) [8]. Активность протеаз (ПА) определяли биуретовым методом по убыли альбумина после инкубации с исследуемыми культурами микроорганизмов [6].

Генетические детерминанты факторов вирулентности: цитолизины – *cylA*, *cylB*, *cylM*, желатиназа – *gelE*, сериновая протеаза – *sprE*, гиалуронидаза – *hyl*, поверхностные белки, участвующие в адгезии – *asa*, белки-иммуносупрессоры – *esp* определяли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [13], [22], [23].

Полученные в ходе исследований численные данные были статистически обработаны [1].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований был охарактеризован персистентный потенциал энтерококков. Установлено, что способностью деградировать лизоцим обладали 100% культур в обеих группах, однако уровень выраженности изучаемого показателя характеризовался межвидовой вариабельностью.

Так, средние значения антилизоцимного признака у подавляющего числа фекальных культур были значимо ниже, чем у клинически значимых штаммов энтерококков, составив для *E. faecalis* – 1,2±0,22 против 1,6±0,03 мкг/мл ( $p<0,001$ ); для *E. faecium* 1,6±0,02 против 1,7±0,001 мкг/мл; для *E. durans* – 1,6±0,02 против 1,9±0,11 мкг/мл ( $p<0,001$ ); для *E. casseliflavus* – 1,3±0,09 против 1,7±0,001 мкг/мл ( $p<0,001$ ). Исключением явились культуры *E.*

*flavescens*: значения антилизоцимного признака у клинических изолятов данного вида были недостоверно ниже, чем у фекальных штаммов (1,3±0,02 и 1,5±0,15 мкг/мл, соответственно). Выраженность АЛА у изолятов *E. hirae* не зависела от источника выделения и составила в среднем 1,6±0,02 мкг/мл.

В целом, средние значения антилизоцимного признака были значимо выше у энтерококков, выделенных из клинического материала (1,6±0,02 мкг/мл, ( $p<0,05$ )), чем у бактерий этого рода, изолированных из кишечного биотопа животных (1,5±0,04 мкг/мл).

Определённый вклад в длительное переживание бактерий в макроорганизме вносит антикарнозиновая активность. Нами установлено, что способностью деградировать карнозин обладали все фекальные и клинические изоляты *Enterococcus spp.*

Максимальные значения АКрА были выявлены у клинических изолятов *E. faecium* – 2,4±0,18 мг/мл, *E. casseliflavus* – 2,4±0,01 мг/мл, *E. hirae* – 2,3±0,12 мг/мл и фекальных культур *E. faecalis* – 2,2±0,31 мг/мл, *E. durans* – 2,6±0,13 мг/мл. Высокий и средний уровни антикарнозинового признака чаще встречались у клинически значимых культур энтерококков, чем у симбиотических изолятов *Enterococcus spp.*, выделенных из кишечного биотопа сельскохозяйственных животных.

Следует отметить, что выраженность изучаемого признака у энтерококков – резидентов кишечной микробиоты животных (1,8±0,02 мг/мл) была достоверно ниже, чем у клинических изолятов (2,1±0,02 мг/мл, ( $p<0,001$ )).

Способность образовывать биоплёнки на абиотической поверхности была характерна для 69,8±3,5% этиологически значимых культур энтерококков, и только для 3,1±1,36% фекальных изолятов ( $p<0,001$ ), при равных средних значениях признака: 1,3±0,02 и 1,3±0,04, соответственно. Биоплёнкообразование было обнаружено у 66,7±6,08% культур энтерококков, выделенных из экскрета половых органов самок (коэффициент биоплёнкообразования (КБ) 1,2±0,07) и у 77±4,13% штаммов, изолированных из гнойного экссудата (КБ 1,3±0,06). Энтерококки, выделенные из секрета молочных желез, не обладали рассматриваемым фактором персистенции.

Комплексный подход к изучению вирулентного потенциала энтерококков, включающий как микробиологическую, так и генетическую характеристику представителей данного рода, позволил выявить, что 11,6±2,44% клинических изолятов продуцировали желатиназу. Все штаммы, обладающие данным протеолитическим ферментом, принадлежали к виду *E. faecalis*. Желатиназная активность у фекальных культур энтерококков не обнаружена.

ПЦР с лизатами фекальных и клинических изолятов энтерококков позволила выявить ген, кодирующий синтез желатиназы (*gelE*), только у клинически значимых культур *E. faecalis*, в 41,9±3,76% случаев (рис. 1).

Количественная оценка протеолитической активности фекальных и клинических изолятов *Enterococcus spp.* показала, что 100% штаммов обеих групп обладали анализируемым свойством. Более высокими значениями ПА характеризовались фекальные изоляты энтерококков – 0,52±0,028 мг·мл/мин по сравнению с клиническими (0,23±0,011 мг·мл/мин, (p<0,001)). Ген *sprE*, обуславливающий протеолитическую активность, выявлен у 48,8±3,81% клинически значимых культур *E. faecalis* и не зарегистрирован у энтерококков – резидентов кишечной микробиоты животных.

Генетическая детерминанта, кодирующая синтез гиалуронидазы, у энтерококков, выделенных из клинического материала и фекалий животных, не обнаружена.

Анализ цитолитической активности бактерий показал, что способность разрушать эритроциты была характерна для 18,6±2,97%

этиологически значимых культур *E. faecalis*. Штаммы *Enterococcus spp.*, выделенные из кишечного биотопа, гемолитической активностью не обладали.

В популяции клинических изолятов энтерококков комплекс генов, кодирующих синтез цитолизина, обнаружен у штаммов *E. faecalis*, выделенных из экскрета половых органов самок и гнойного экссудата. Гены *cylB* и *cylM*, ответственные за транспорт и посттрансляционную модификацию цитолизина, и *cylL<sub>1</sub>* – структурная субъединица цитолизина, обнаружены в геноме 37,2±3,69% культур. Реже, в 30,2±3,50% случаев, встречалась генетическая детерминанта *cylA*, обеспечивающая активацию цитолизина. У восьми штаммов *E. faecalis* (4,7±1,61%), выделенных от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, обнаружен ген *cylL<sub>5</sub>*. Полный комплекс генов *cyl*-оперона выявлен у двух штаммов *E. faecalis*, изолированных из экскрета половых органов самок при эндометритах.

Среди мутуалистических энтерококков фекальной микробиоты животных генетические детерминанты, кодирующие синтез большой и малой субъединиц цитолизина (*cylL<sub>1</sub>* и *cylL<sub>5</sub>*), зарегистрированы в 5,6±1,81% и 14,8±2,79% случаев, соответственно. Гены цитолизина (*cylA*, *cylB*, *cylM*) в популяции фекальных изолятов энтерококков не выявлены.

Генетические детерминанты, кодирующие белки клеточной стенки, ответственные за уклонение от иммунных сил макроорганизма (*esp*), и белки-адгезины (*asa*), обнаружены в геноме 44,2±3,79% и 41,9±3,76% клинически значи-



Рисунок 1 – Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков

мых изолятов энтерококков, соответственно. У фекальных культур коллекции гены *esp* и *asa* не выявлены.

Анализ полученных данных позволил выявить биологические свойства, представленные в таблице, по которым изученные группы штаммов существенно различались между собой (табл. 1).

Так, в геноме культур *Enterococcus spp.*, выделенных из клинического материала, обнаружены генетические детерминанты, кодирующие синтез факторов вирулентности. Кроме того, этиологически значимые культуры энтерококков обладали факторами вирулентности на уровне фенотипа: гемолитической, желатиназной активностями и изученными факторами персистенции (АЛА, АКРА) с более высокими значениями признаков, чем у фекальных изолятов. Симбиотические штаммы энтерококков из кишечника здоровых животных характеризовались высокой активностью протеаз и не обладали способностью формировать биоплёнки.

### Заключение

Бактерии рода *Enterococcus* представляют особый научный и практический интерес, так как, с одной стороны, являются представителями мутуалистической микробиоты желудочно-кишечного тракта млекопитающих, и, обладая рядом полезных свойств, активно используются в качестве компонентов биопрепаратов пробиотической направленности. С другой сторо-

ны, энтерококки – потенциально-патогенные микроорганизмы, выступающие в роли этиологических агентов экзогенных и эндогенных инфекционных процессов у животных.

Двойственная природа *Enterococcus spp.* диктует необходимость поиска алгоритма для эффективной дифференциации патогенных штаммов от изолятов, входящих в состав нормобиоты.

При анализе распространённости и выраженности секретируемых факторов персистенции было установлено, что способностью инактивировать такие факторы врождённого иммунитета как карнозин и лизоцим обладали энтерококки обеих групп сравнения, причём значения анализируемых персистентных характеристик были выше у клинических изолятов *Enterococcus spp.* Указанная закономерность была использована нами при разработке нового способа дифференциации энтерококков кишечной микробиоты животных [9].

Помимо секретируемых факторов персистенции у энтерококков была обнаружена способность к биоплёнкообразованию. Данным свойством обладали преимущественно этиологически значимые изоляты *Enterococcus spp.* Поскольку разница между средними значениями коэффициентов биоплёнкообразования у возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний и фекальных штаммов энтерококков была в пределах ошибки средней арифметической, приходится говорить только о тенденции.

Таблица 1 – Характеристика биофильей бактерий рода *Enterococcus*

Биологические свойства <i>Enterococcus spp.</i>	Клинические изоляты		Фекальные изоляты	
	Распространённость, %	Выраженность	Распространённость, %	Выраженность
Генетические детерминанты вирулентности	100	–	23,8±13,47	–
Протеолитическая активность, мг-мл/мин	100	0,23±0,011	100	0,52±0,028
Желатиназная активность	11,6±2,44	–	0	–
Гемолитическая активность	18,6±2,97	–	0	–
Антилизозимная активность, мкг/мл	100	1,62±0,020	100	1,51±0,039
Антикарнозиновая активность, мг/мл	100	2,05±0,016	100	1,8±0,022
Биоплёнкообразование, усл.ед.	69,8±3,5	1,3±0,02	3,1±1,36	1,3±0,04



В ходе сравнительного анализа вирулентного потенциала клинически значимых и симбиотических энтерококков выявлены существенные различия у штаммов обеих групп. В геноме энтерококков – возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний были широко распространены факторы патогенности на фенотипическом уровне. Единственные генетические детерминанты вирулентности, которые удалось обнаружить у фекальных энтерококков, были гены *cylL*<sub>1</sub> и *cylL*<sub>5</sub>, кодирующие субъединицы литического компонента цитолизина, являющегося бактериоцином.

Если, по данным ряда авторов, для этиологически значимых энтерококков характерен богатый набор факторов патогенности [24], то информация о вирулентном потенциале фекальных культур *Enterococcus spp.* весьма противоречива. Результаты исследований, полученные Н.Е. Щепитовой с соавт. (2014), подтверждают авирулентность штаммов энтерококков – резистентов кишечного биотопа сельскохозяйственных животных. В то же время согласно R. Iseppi

et al. (2015), у 62% симбиотических изолятов *Enterococcus spp.* выявлена генетическая детерминанта *gelE*, кодирующая синтез желатиназы (кокколиназы). Р. Poeta et al. (2006), исследовав геном энтерококков, выделенных из помёта птиц, установили, что часть штаммов обладала β-гемолитической активностью и содержала генетические детерминанты *cyl*-оперона (*cylA*, *cylB*, *cylM*).

Высокий уровень протеолитической активности, зарегистрированный нами у энтерококков кишечного биотопа животных, мы рассматриваем не как фактор патогенности, а как одну из важнейших характеристик молочнокислых микроорганизмов, обеспечивающую потребность бактерий в аминокислотах.

Таким образом, охарактеризованы биопротипы фекальных и клинических изолятов энтерококков, что позволило определить ведущие информативные признаки для эффективной дифференциации клинически значимых культур энтерококков от представителей нормальной микробиоты животных.

04.10.2017

#### Список литературы:

1. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологии / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьёв. – Л.: Гос. изд. мед. лит. – 1962. – 177 с.
2. Бондаренко, В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов. – М.: Медицина, 2007. – 30 с.
3. Бухарин, О.В. Способ определения антикарнозиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, О.Л. Чернова, С.Б. Матюшина // Патент РФ № 2132879. – 1999. – № 19.
4. Бухарин, О.В. Фотометрическое определение антилизосимной активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, А.В. Вальшев, Н.Н. Елагина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – № 4. – С. 117-120.
5. Вальшева, И.В. Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков кишечной микробиоты человека / И.В. Вальшева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 4. – С. 44-47.
6. Нетрусов, А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
7. Пошвина, Д.В. Видовая характеристика и протеолитическая активность энтерококков / Д.В. Пошвина, М.В. Сычева // Вестник ветеринарии. – 2014. – № 2(69). – С. 40-43.
8. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М.О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 464 с.
9. Сычева, М.В. Способ дифференциации энтерококков кишечной микрофлоры животных / М.В. Сычева, Н.Е. Щепитова, О.Л. Карташова [и др.] // Патент РФ № 2612141. – 2017. – Бюл. № 7.
10. Щепитова, Н.Е. Биологические свойства антагонистически активных энтерококков кишечной микрофлоры животных / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва, О.Л. Карташова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 13. – С. 134-138.
11. Antimicrobial resistance and virulence traits in *Enterococcus* strains isolated from dogs and cats / R. Iseppi, P. Messi, I. Anacarso [et al.] // *New Microbiol.* – 2015. – Vol. 38(3). – P. 369-378.
12. Coburn, P.S. The *Enterococcus faecalis* cytolysin: a novel toxin active against eukaryotic and prokaryotic cells / P.S. Coburn, M.S. Gilmore // *Cell Microbiol.* – 2003. – Vol. 5 – No.10. – P. 661-669.
13. Development of Multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium* / V. Vankerckhoven, T. Van Autgaerden, C. Vael [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2004. – No. 42. – P. 4473-4479.
14. Effects of *Enterococcus faecalis* for genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence / X. Qin, K.V. Singh, G.M. Weinstock [et al.] // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – P. 2579-2586.
15. *Enterococcus faecalis* clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam / L.L. Poulsen, M. Bisgaard, N. Son [et al.] // *Emerging Infectious Diseases.* – 2012. – Vol. 18. – No. 7. – P. 1096-1100.
16. Gaggi`a, F. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production / F. Gaggi`a, P. Mattarelli, B. Biavati // *Int. J. Food Microbiol.* – 2010. – Vol. 141. – P. 15-28.

17. Kafil, H.S. Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from Urinary Tract Infections / H.S. Kafil, A.M. Mobarez // *Open Microbiol. J.* – 2015. – Vol. 26. – No. 9. – P. 14-17.
18. Keis, S. Characterization of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* (VREF) isolate from a dog with mastitis: further evidence of a clonal lineage of VREF in New Zealand / S. Keis, J.M. Smith, G.M. Cook // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – Vol. 13. – P. 3331-3333.
19. O'Toole, G.A. Biofilm formation as microbial development / G.A. O'Toole, H.B. Kaplan, R. Kolter // *Annual Review of Microbiology.* – 2000. – No. 54. – P. 49-79.
20. Phenotypic and genotypic study of gelatinase and beta-haemolysis activities in faecal enterococci of poultry in Portugal / P. Poeta, D. Costa, N. Klibi [et al.] // *J. Vet. Med.* – 2006. – Vol. 53. – No. 5. – P. 203-208.
21. Pomba, C. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Enterococcus faecalis* / C. Pomba, N. Couto, A.J. Moodley // *Feline Med. Surg.* – 2010. – Vol. 12 – No. 10. – P. 802-806.
22. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk / C. Reviriego, T. Eaton, R. Martín [et al.] // *Journal of Human Lactation.* – 2005. – No. 21. – P. 131-137.
23. Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: a common trait in the genus? / T. Semedo, M.A. Santos, M.F. Lopes [et al.] // *Systematic and Applied Microbiology.* – 2003. – No. 26. – P. 13-22.
24. Virulence traits and antibiotic resistance among enterococci isolated from Eurasian otter (*Lutra lutra*) / T. Semedo-Lemsaddek, C.S. Nóbrega, T. Ribeiro [et al.] // *Vet. Microbiol.* – 2013. – Vol. 163. – No. 3-4. – P. 378-382.
25. Yuen, G.J. *Enterococcus* infection biology: Lessons from invertebrate host models / G.J. Yuen, F.M. Ausubel // *J. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – No. 3. – P. 200-210.

**Сведения об авторах:**

**Кочкина Елена Евгеньевна**, заведующий лабораторией молекулярно-генетических и бактериологических исследований кафедры микробиологии и заразных болезней факультета ветеринарной медицины Оренбургского государственного аграрного университета  
460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, e-mail: alena-200838@mail.ru

**Пашкова Татьяна Михайловна**, старший научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, кандидат биологических наук  
460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, e-mail: pashkova070782@mail.ru

**Сычёва Мария Викторовна**, заведующий кафедрой микробиологии и заразных болезней факультета ветеринарной медицины Оренбургского государственного аграрного университета, доктор биологических наук, доцент  
460014 г. Оренбург, ул. Челюскинцев, 18, e-mail: sycheva\_maria@mail.ru

**Карташова Ольга Львовна**, заведующий лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, доктор биологических наук, доцент  
460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, e-mail: labpersist@mail.ru