

УДК 579.862:579.61:616-092:616.6-002.1/3

Л.Г. Мироненко¹, О.Г. Перетятко¹, Ю.А. Ягнюк¹, Р.В. Куцик²

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ ТА ЗДАТНОСТІ ДО БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ В ЕНТЕРОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ НА УРОЛОГІЧНУ ПАТОЛОГІЮ

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України», м. Харків
²ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет»

Резюме. У статті наведено результати дослідження факторів патогенності та здатності до біоплівкоутворення 27 штамів ентерококів, збудників інфекцій сечовивідних шляхів (ІСВШ). Встановлено, що 40,7 % штамів ентерококів, виділених від урологічних хворих, виявляли желатиназну та фібринолітичну активність, 66,7 % – гемолітичну та 88,9 % – казеїназну активність. Усі досліджені штами володіли адгезивними властивос-

тями середнього або високого рівня та антилізоцимною активністю. Переважна більшість (92,6 %) досліджених клінічних штамів ентерококів) виявляла здатність до утворення біоплівки, причому домінували серед них штами з високим ступенем біоплівкоутворення.

Ключові слова: ентерококи, адгезивна, протеолітична, гемолітична, антилізоцимна активності, біоплівки.

Вступ. Патогенність, як інтегральна характеристика збудників інфекцій, є полідетермінантною властивістю мікроорганізмів, що відображає їх здатність формувати ендogenous джерела інфекцій, колонізувати органи і тканини та ініціювати в них патологічний процес. Виявлення в ентерококів факторів патогенності сприяло перегляду оцінки їх ролі в патогенезі ентерококових інфекцій. Проте це питання є не до кінця вивченим. Основним аргументом на користь їх патогенетичної ролі є висока частота виявлення факторів патогенності у штамів, виділених при інфекційних процесах, і практично повна відсутність у штамів, виділених із кишечника здорових осіб і з об'єктів довкілля. Серед потенційних факторів патогенності, що найбільш часто вивчаються дослідниками, є цитолітичний (зокрема гемолітичний) токсин білкової природи, що володіє також властивостями бактеріоцину; протеаза та субстанція агрегації [9, 12]. До факторів вірулентності відносять також протеолітичні ферменти (желатиназу, казеїназу, колагеназу, еластазу), які сприяють міжклітинному поширенню бактерій в організмі хазяїна. Найбільш вивченим із протеолітичних ферментів ентерококів є желатиназа та серинова протеаза. Протеаза ентерококів є позаклітинною металопротеазою, яка гідролізує желатин, казеїн, гемоглобін та інші біоактивні пептиди та кодується *agr* – зчепленим авторегулюючим геном. Штами, які несуть цей ген, мають високу вірулентність. Протеаза ентерококів частіше виявляється у штамів, ізольованих із клінічного матеріалу, ніж від здорових осіб [11, 13]. При цьому не можна не відзначити, що багато, з так званих, факторів патогенності ентерококів є необхідними компонентами їх функціонування, що забезпечують їх існування у властивому їм біотопі, і не пов'язані безпосередньо з пошкодженням тканин хазяїна або пригніченням системи імунітету. Так, адгезини життєво необхідні для нормальної колонізації ентерококів у шлунково-кишковому тракті, а гідролаза жовчних кислот

підвищує їх шанси вижити в дванадцятипалій кишці.

Роль ентерококів у патогенезі інфекцій сечовивідних шляхів загальнопризнана. На їх частку припадає до 10 % усіх бактеріальних інфекцій уринарного тракту. При внутрішньолікарняних інфекціях із цією локалізацією питома вага ентерококів зростає до 15-20 %. Інфікуванню сприяють інвазивні інструментальні маніпуляції на сечовому міхурі і постійні уретральні катетери [3, 4, 6, 10].

Відомо, що важливу роль у хронізації запальних процесів при захворюваннях сечовивідної системи відіграють біоплівки. Інфекції сечовивідних шляхів (ІСВШ) прямо або опосередковано призводять до сечокам'яної хвороби (СКХ), яка є однією з розповсюджених урологічних захворювань і діагностується не менш ніж у 3 % населення світу. При лікуванні урологічної патології широко використовується різноманітний інструментарій у вигляді дренажних систем, катетерів, стентів, на поверхні яких можуть формуватися біоплівки, що призводить до розвитку катетер-асоційованих інфекцій. Мікроорганізми у складі біоплівок, сформованих при хронічних процесах, а також на медичних імплантатах та обладнанні суттєво перешкоджають специфічній терапії, значно підвищують її вартість та призводять до росту летальності [6].

У зв'язку зі зростанням етіопатогенетичної значущості ентерококів у загальній структурі ІСВШ, зростає й інтерес дослідників до детального вивчення їх патогенного потенціалу та здатності до біоплівкоутворення.

Мета дослідження. Вивчити фактори патогенності та здатності до біоплівкоутворення в ентерококів, виділених із патологічного матеріалу від осіб із ІСВШ.

Матеріал і методи. Дослідження проведено на 27 штамів, вилучених із сечі та уретри від осіб із ІСВШ, які перебували на амбулаторному лікуванні. Групою порівняння обрано ентерококи,

ізолювані з кишечника здорових осіб (23 штами). Виділення ентерококів проведено за загальноприйнятими методами, ідентифікація – за допомогою мікротест-системи – EN-COCCUStest виробництва Pliva-Lachema Diagnostika (Чеська Республіка).

Ферментативну активність штамів ентерококів визначали за їх здатністю продукувати казеїназу, желатиназу, фібринолізин та гемолізину за стандартними методиками [5]. Дослідження адгезивних властивостей проводили розгорнутим методом [1]. Антилізоцимну активність (АЛА) вивчали прискореним методом [7].

Вивчення здатності ентерококів формувати біоплівки проводили за допомогою фотометричного методу, який заснований на забарвленні, зафіксованих у пластикових чашках Петрі, біоплівок мікроорганізмів аніліновими фарбниками, у нашій модифікації. Для цього нами запропоновано використання стерильних одноразових пластикових чотирьох секційних чашок Петрі. Мікробну суспензію добової культури ентерококів щільністю 0,5 од. за Mc Farland готували з використанням денсілометра. У кожній сектор 4-секційної пластикової чашки Петрі вносили по 1,75 мл TSB-середовища з 1 % глюкозою, додавали по 0,25 мл мікробної суспензії ентерококів, для контролю – 0,25 мл середовища. Інкубували при температурі 37 °С протягом 48 годин. Після інкубації чашки триразово відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 7,2-7,4), висушували при кімнатній температурі протягом 30 хв та забарвлювали біоплівки 1 % водним розчином кристал-віолету, знову промивали фосфатним буфером і висушували. Елюацію біоплівкової маси проводили дворазово 2 мл етанолу/ізопропанолу (1:1) протягом 20 хв. Вимірювання оптичної щільності елюату здійснювали на спектрофотометрі СФ-56Л при довжині хвилі 590 нм. Про інтенсивність біоплівкоутворення судили за ступенем забарвлення елюату. Аналіз даних досліджень проводили за критеріями згідно з рекомендаціям Stepanovic S. et al. [8].

Отримані результати досліджень обробляли статистично за допомогою параметричних методів обчислення. Для оцінки якісних ознак розраховували частоту (Р, %) і стандартну похибку (m, %) [2]. Відмінності між вибірками оцінювали за t-критерієм Стьюдента, різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати видової ідентифікації ентерококів, вилучених від осіб із ІСВШ показали, що у 88,9 % випадків був ізолюваний *E. faecalis*, у 3,7 % – *E. faecium*, 7,4 % – ентерококи інших видів.

При аналізі проведених досліджень з вивчення адгезивності ентерококів, які вилучено із сечі та уретри осіб із ІСВШ встановлено, що з 27 штамів – 23 (85,1±6,8) % штамів були високоадгезивними та 4 (14,9±6,8) % – середньоадгезивними. При цьому діапазон коливання показника ІАМ в ентерококів, вилучених від осіб із ІСВШ, знаходився у межах від 2,94 до 8,89. Порівняльний аналіз із контрольною групою показав відсутність достовірних розбіжностей між адгезивними властивостями штамів обох груп ($p = 0,089$).

Таким чином, ентерококи, вилучені від осіб із ІСВШ, характеризувалися високо- та середньоадгезивними властивостями.

Слід відзначити, що кількість штамів із желатиназною активністю серед ентерококів, ізолюваних від осіб із ІСВШ, майже в чотири рази більша, ніж у групі порівняння (табл. 1). Враховуючи, що за видовим складом ентерококи, що ізолювані від осіб із ІСВШ, були представлені переважно *E. faecalis*, ми не аналізували розбіжності в кількості желатиназоактивних штамів між ентерококами різних видів.

Казеїназна активність ентерококів відноситься до маловивчених факторів вірулентності цих мікроорганізмів. Встановлено, що у 24 штамів, вилучених від осіб із ІСВШ, виявлено казеїназну активність. Експресивність казеїназної активності була достовірно вищою в ентерококів, ізолюваних від осіб із ІСВШ, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$).

Аналіз даних показав, що фібринолітичноактивних ентерококів у групі, вилучених від осіб із ІСВШ, було достовірно більше, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$).

При вивченні пенетрантності гемолітичної активності у штамів ентерококів, вилучених від пацієнтів із ІСВШ, встановлено, що більшість штамів характеризувалася гемолітичноактивним фенотипом і кількість їх була достовірно вищою, ніж у групі порівняння ($p < 0,05$). При цьому, у 16 (88,9±7,4) % штамів виявлено β -гемолізину, у 2 (11,1±7,4) % – α -гемолізину.

При аналізі експресивності АЛА ентерококів, вилучених від пацієнтів із ІСВШ, встановлено, що діапазон прояву антилізоцимної активності складав від 1 до 6 мкг/мл. При цьому, експресивність АЛА у мікроорганізмів цієї групи була достовірно вищою, ніж у штамів, вилучених із кишечника здорових людей ($p < 0,05$). Слід підкреслити, що кількість штамів із високою активністю АЛА (більше 4 мкг/мл) серед ентерококів, вилучених від осіб із ІСВШ, становила (81,5±7,5) %, із середньою активністю (2-3 мкг/мл) – (14,8±6,8) %, із низькою АЛА (менш ніж 2 мкг/мл) – (3,7±3,6) % штамів.

Наступним етапом наших досліджень було визначення в ентерококів здатності до біоплівкоутворення. Аналізуючи отримані результати, слід відмітити, що серед ентерококів, вилучених від пацієнтів із ІСВШ, штамів, здатних до біоплівкоутворення, було у 2,5 рази більше, ніж серед штамів із групи порівняння ($p < 0,05$) (табл. 2).

Аналіз результатів досліджень показав, що в ентерококів обох груп переважали штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення. Встановлено, що кількість таких штамів серед біоплівкоутворюючих ентерококів, вилучених від осіб із ІСВШ, була високою і становила (52,0±10,0) %.

Таблиця 1

Пенетрантність факторів патогенності в ентерококів, виділених від осіб із інфекціями сечовивідних шляхів

Фактори патогенності	Штами ентерококів			
	виділені від осіб із ІСВШ (n=27)		виділені від здорових осіб (n=23)	
	абс. число	питома вага (P±m,%)	абс. число	питома вага (P±m,%)
Желатиназна активність	11	40,7±9,5 ¹⁾	3	13,0±7,0
Казеїзна активність	24	88,9±6,0 ¹⁾	8	34,7±9,9
Фібринолітична активність	11	40,7±9,4 ¹⁾	3	13,0±7,0
Гемолітична активність	18	66,7±9,0 ¹⁾	2	8,7±5,9
Антилізоцимна активність	27	100 ¹⁾	12	52,2±10,4

Примітка. Різниця показників статистично достовірна (p<0,05)

Таблиця 2

Розподіл штамів ентерококів за ступенем біоплівкоутворення

Ступінь біоплівкоутворення	Штами ентерококів			
	виділених від осіб із ІСВШ (n=27)		виділених від здорових осіб (n=23)	
	абс. число	питома вага (P±m,%)	абс. число	питома вага (P±m,%)
Біоплівкоутворення відсутнє	2	7,4±5,0 ¹⁾	13	56,5±10,3
Біоплівкоутворення низького ступеня	5	18,5±7,4	3	13,0±7,0
Біоплівкоутворення середнього ступеня	7	26,0±8,4	2	8,7±5,9
Біоплівкоутворення високого ступеня	13	48,1±9,6	5	21,8±8,6

Примітка. Різниця показників статистично достовірна (p<0,05)

Відносна кількість ентерококів із середнім та низьким ступенем біоплівкоутворення у цій групі не відрізнялась і дорівнювала (28,0±9,0 %) та (20,0±8,0 %) відповідно (p>0,05).

Серед біоплівкоутворюючих ентерококів, виділених з кишечника здорових осіб, кількість штамів із високою здатністю до біоплівкоутворення становила (50,0±15,8 %), із середнім та низьким ступенем біоплівкоутворення (20,0±12,6 %) та (30,0±14,5 %) відповідно.

Таким чином, аналіз результатів наших досліджень дозволив розподілити ентерококи за ступенем їх здатності до біоплівкоутворення на абіотичних поверхнях, а також відібрати штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення для подальших досліджень.

Висновки

1. Серед ентерококів, виділених із сечі та вмісту уретри осіб із інфекціями сечовивідних шляхів, домінуючим (88,9 %) видом є *E. faecalis*.

2. Пенетрантність желатиназної, казеїназної, фібринолітичної, гемолітичної та антилізоцимної активностей у клінічних штамів ентерококів становить 40,7, 88,9, 40,7, 66,7 % та 100,0 % відповідно.

3. Усі штамів ентерококів володіють адгезивністю середнього та високого рівня, але штамів, які виділено при патологічних станах, характеризувалися вірогідно більш високим рівнем адгезії.

4. Більшість (92,6 %) клінічних штамів характеризується здатністю до біоплівкоутворення. Серед них достовірно переважають штамів з високим (48,1 %) ступенем біоплівкоутворення. Кількість штамів із середнім і низьким ступенем біоплівкоутворення достовірно менша і становить 26,0 % та 18,5 % відповідно.

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести скринінг сполук, тропних до біоплівок ентерококів, та визначити найбільш ефективні сполуки з потенціалом інгібуючої дії на біоплівки.

Література

- Брили В.И. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / В.И. Брилли // Лаб. дело. – 1986. – № 4. – С. 210-212.
- Лях Ю.Е. Анализ результатов медико-биологических исследований и клинических испытаний в специализированном статистическом пакете MEDSTAT / Ю.Е. Лях, В.Г. Гурьянов // Вестн. гигиены и эпидемиол. – 2004. – Т. 8, № 1. – С. 155-167.
- Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий / Э.Р. Толордова, И.Г. Тиганова,

- Н.В. Алексеева [и др.] // Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунол. – 2012. – № 4. – С. 56-61.
4. Меркоданова Ю.А. Механизмы уропатогенности бактерий при хроническом пиелонефрите у детей / Ю.А. Меркоданова // Саратов. науч.-мед. ж. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 383-385.
 5. Никитин В.М. Справочник методов биохимической экспресс-индикации микробов / Валентин Михайлович Никитин. – Кишенею: Карта Молдовеняскэ, 1986. – 296 с.
 6. Никитин О.Д. Роль микробных биопленок в патогенезе осложненных инфекций мочевых путей / О.Д. Никитин // Здоровье мужчины. – 2013. – № 1 (44). – С. 20-23.
 7. Соколов В.Ю. Ускоренный метод определения антилизоцимной активности микроорганизмов / В.Ю. Соколов // Лаб. дело. – 1991. – № 6. – С. 64-65.
 8. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanovic, D. Vukovic, I. Dakic [et al.] // J. of Microbiological Methods. – 2000. – № 40. – P. 175-179.
 9. Arias C.A. Management of multidrug resistant enterococcal infections / C.A. Arias, G.A. Contreras, B.E. Murray // Clin. Microbiol. Infect. – 2010. – Vol. 16. – P. 555-562.
 10. Contribution of individual Ebp Pilus subunits of Enterococcus faecalis OG1RF to pilus biogenesis, biofilm formation and urinary tract infection / Jouko Sillanpaa, C. Chang, K. Singh [et al.] // PloS one. – 2013. – № 8 (7). – P. 68813.
 11. Review of virulence factors of enterococcus: an emerging nosocomial pathogen / P. . Giridhara, K.L. Ravikumar, B.L. Umamathy [et al.] // Indian J. of Medical Microbiology. – 2009. – № 27 (4). – P. 301-305.
 12. Sreeja S. The Prevalence and the Characterization of the Enterococcus Species from Various Clinical Samples in a Tertiary Care Hospital / S. Sreeja, S. Babu, P. Prathab // J. of Clin. and Diagnostic Research. – 2012. – Vol. 6 (9). – P. 1486-1488.
 13. Strzelecki Y. Gelatinase-Associated Phenotypes and Genotypes Among Clinical Isolates of Enterococcus faecalis in Poland / Y. Strzelecki, W. Hryniewicz, E. Sadowy // Polish J. of Microbiology. – 2011. – Vol. 60, № 4. – P. 287-292.

ХАРАКТЕРИСТИКА ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ И СПОСОБНОСТИ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК У ЭНТЕРОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ С УРОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

Л.Г. Мироненко¹, Е.Г. Перетятко¹, Ю.А. Ягнюк¹, Р.В. Куцик²

Резюме. В статье приведены результаты изучения факторов патогенности и способности к образованию биопленок 27 штаммов энтерококков, возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМВП). Установлено, что 40,7 % штаммов энтерококков, выделенных от урологических больных, проявляли желатиназную и фибринолитическую активности, 66,7 % – гемолитическую и 88,9% – казеиназную активности. Все исследованные штаммы обладали адгезивными свойствами среднего или высокого уровня и антилизоцимной активностью. Подавляющее большинство исследованных клинических штаммов энтерококков (92,6 %) проявляло способность к образованию биопленок, причем доминировали среди них штаммы с высокой степенью биопленкообразования.

Ключевые слова: энтерококки, адгезивная, протеолитическая, гемолитическая, антилизоцимная активности, биопленки.

CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENICITY FACTORS AND ENTEROCOCCI ABILITY TO FORM BIOFILMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH UROLOGICAL PATHOLOGY

L.G. Myronenko¹, E.G. Peretiatchko¹, I.A. Yahniuk¹, R.V. Kutsyk²

Abstract. The article presents the results of the research of the pathogenicity factors and the ability of 27 strains of enterococci, pathogens of urinary tract infections (UTI) to form biofilms. It was found that 40,7 % of the strains of enterococci isolated from urological patients showed gelatinase and fibrinolytic activity, 66,7 % – hemolytic activity, and 88,9 % – caseinase activity. All tested strains possessed adhesive properties of intermediate or high-level and anti-lysozyme activity. The vast majority of the studied clinical strains of enterococci (92,6 %) exhibited the ability to form biofilms, and among them the strains with a high degree of biofilm formation were the dominated ones.

Key words: enterococci, adhesive, proteolytic, hemolytic, anti-lysozyme activity, biofilm.

¹State Institution of Ukraine «I.Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology National Academy of Medical Sciences of Ukraine» (Kharkiv)

²Higher State Educational Institution of Ukraine «National Medical University» (Ivano-Frankivsk)

Рецензент – проф. О.С. Хухліна

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 111-114

Надійшла до редакції 08.07.2015 року