

Образование биоплёнок клиническими изолятами энтерококков

Д.В. Пошвина, аспирантка,
ФГБОУ ВПО Оренбургский ГАУ

Изучение биологических свойств клинических изолятов *Enterococcus* sp., выделенных от животных, актуально, поскольку отмечается рост числа инфекционно-воспалительных заболеваний энтерококковой этиологии [1, 5]. В отличие от факторов вирулентности [2], персистентные характеристики энтерококков, в том числе способность к биоплёнкообразованию, только начинают изучаться. Биоплёнки – это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, состоящие как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся форм, заключённых в экзополимерный матрикс. Формирование биоплёнок сопровождается высоким уровнем толерантности к антителам, антибиотикам, антисептикам, дезинфектантам и фагоцитам, неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии [3] и является важным фактором патогенеза энтерококковых инфекций. Установлено, что в образовании биоплёнок у бактерий рода *Enterococcus* важную роль играют поверхностные белки (ESP), которые обеспечивают адгезию энтерококков к различным поверхностям и создают условия для последующей инвазии в ткани хозяина за счёт ряда факторов вирулентности [6]. Известны гены энтерококков, кодирующие синтез поверхностных белков. Однако данные о распространённости биоплёнкообразования среди энтерококков, выделенных из клинического материала от животных, немногочисленны.

В связи с вышеизложенным очевидна необходимость изучения биоплёнкообразования у клинических изолятов *Enterococcus* sp., что позволит объективно оценить вклад данного свойства возбудителей в патогенез инфекционно-воспалительных заболеваний.

Материалы и методы. Материалом для исследования явились 34 штамма энтерококков, выделенных от животных при инфекционно-воспалительных заболеваниях: 14 штаммов – из экскрета половых органов самок при эндометритах коров, собак и кошек, 2 из секрета молочных желез при маститах коров, 18 – из гнойного экссудата при абсцессах мягких тканей и отитах кошек и собак. Выделение микроорганизмов осуществляли путём секторного посева исследуемого материала на желчно-эскулиновый агар с азидом натрия (Hi Media, Индия). Посевы инкубировали в термостате при 37°C в течение 24 ч. При обнаружении характерного для энтерококков роста (образование коричнево-чёрного преципитата вокруг колоний) проводили пересев колоний на агар Шедлера (HiMedia, Индия).

Идентификацию культур проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием известных праймеров [7]. Синтез праймеров осуществлён компанией «СИНТОЛ» (г. Москва). Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-ЭКСПРЕСС» (Литех, Россия).

Образование биоплёнок клиническими изолятами бактерий рода *Enterococcus* оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах. Коэффициент биоплёнкообразования рассчитывали как отношение A_{492} опыт/ A_{492} контроль. Положительным считали значения более 1,1 [8].

Распространённость генов, кодирующих поверхностные компоненты энтерококков (ESP), изучали с помощью метода ПЦР с использованием известных праймеров [9].

Полученные результаты были обработаны статистически [4].

Результаты исследований. Использование полимеразной цепной реакции позволило идентифици-

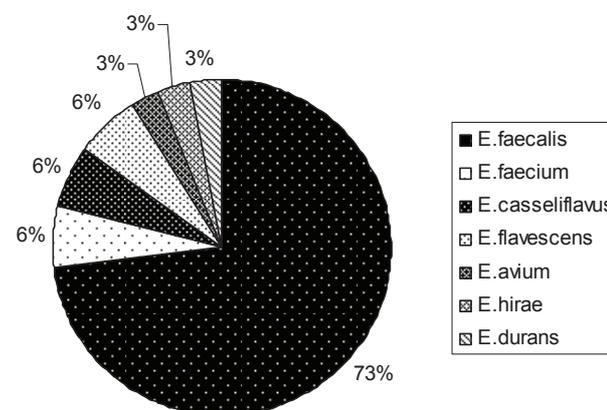


Рис. 1 – Видовой спектр клинических изолятов энтерококков

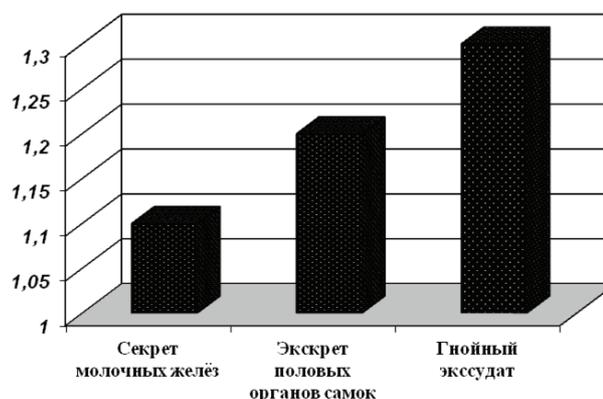


Рис. 2 – Коэффициент биоплёнкообразования клинических изолятов *Enterococcus* sp. в зависимости от источника выделения

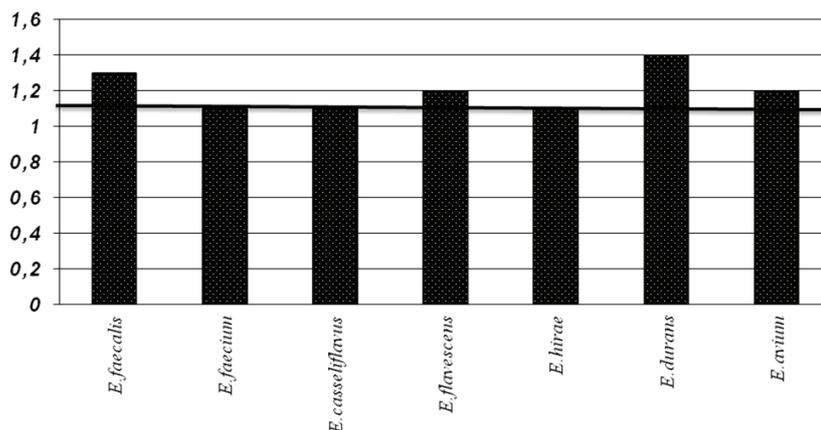


Рис. 3 – Коэффициент биоплёнкообразования клинических изолятов *Enterococcus* sp.

ровать 7 видов энтерококков. Среди них ведущее место занимали культуры вида *E. faecalis* (73%). В 6% случаев (по 2 штамма) клинические изоляты были представлены видами *E. faecium*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens*. В единичных случаях высевали *E. avium* (3%), *E. hirae* (3%), *E. durans* (3%) (рис. 1).

Способность образовывать биоплёнки была обнаружена у $71 \pm 9,2\%$ культур энтерококков. Данным свойством обладали виды *E. faecalis*, *E. avium*, *E. flavescens*.

В зависимости от биотопа выделения наиболее высокие показатели свойства отмечены у штаммов, изолированных из гнойного экссудата: среднее значение коэффициента биоплёнкообразования (КБ) составило $1,3 \pm 0,06$ (рис. 2). Клинические изоляты, выделенные из экскрета половых органов самок, характеризовались более низкими значениями признака – $1,2 \pm 0,07$. Энтерококки, изолированные из секрета молочных желёз, не обладали способностью формировать биоплёнки. Вероятно, колонизация данного биотопа обеспечивается другими факторами персистенции.

Кроме того, выявлена межвидовая вариабельность признака. Наиболее высокие значения коэффициента биоплёнкообразования были отмечены у культуры *E. durans* (рис. 3). Клинические изоляты *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* не образовывали статические биоплёнки в лунках полистироловых планшетов.

Гены, обуславливающие синтез поверхностных белков (Esp), обнаружены только у клинических изолятов вида *E. faecalis*. Среди культур, выделенных из экскрета половых органов самок, данный ген встречался в $57 \pm 13,2\%$ случаев. Ген Esp выявлен у подавляющего большинства штаммов ($67 \pm 11,1\%$), изолированных из гнойного экссудата. Культуры энтерококков, полученные из секрета молочных желёз, не содержали генетических детерминант, кодирующих синтез поверхностных белков.

Корреляционный анализ показал наличие достоверной ($p < 0,001$) высокой положительной связи ($r = 0,632$) между наличием генов Esp и способностью энтерококков формировать биоплёнки.

Вывод. Показано, что клинические изоляты энтерококков обладают способностью образовывать биоплёнки. Выявленная высокая достоверная положительная связь между изученным свойством и наличием гена Esp подтверждает важную роль поверхностных белков в первоначальной адгезии и формировании биоплёнок энтерококками [10].

Наряду с антилизозимной, антикарнозиновой и другими способами секреторной защиты бактерий образование биоплёнок способствует персистенции энтерококков в макроорганизме.

Литература

1. Черных О.Ю. Энтерококковая инфекция нутрий // Ветеринария. 2009. № 1. С. 22–24.
2. Бухарин О.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л., Сычёва М.В. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 3. С. 13–18.
3. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. Т. 2. № 3. С. 4–15.
4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит., 1962. 180 с.
5. De Herdt P., Defoort P., Van Steelant J. et al. *Enterococcus cecorum* osteomyelitis and arthritis in broiler chickens // Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift. 2008. Vol. 78. P. 44–48.
6. Ramadhan A.A., Hegedus E. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci // J Clin Pathol. 2005. Vol. 58. No. 7. P. 685–686.
7. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42 (8). P. 3558–3565.
8. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Ann. Rev. Microbiol. 2000. No 54. P. 49–79.
9. Vankerckhoven V., Van Outgaerden T., Vael C. et al. 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 Isolates of *Enterococcus faecium* // J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42. No 10. P. 4473–4479.
10. Heikens E., Bonten M.J., Willems R.J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162 // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189. No. 22. P. 8233–8240.