

## Распространённость генов бактериоциногении в популяции клинических изолятов *Enterococcus spp.*

**Е.Е. Кочкина**, зав. лаб., **М.В. Сычёва**, д.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ; **Т.М. Пашкова**, к.б.н., **О.Л. Карташова**, д.б.н., профессор, ФГБУН ИКВС УрО РАН

Антагонизм — тип симбиотических отношений между организмами, в результате которых один из участников взаимодействий (антагонист) получает селективное преимущество в борьбе за выживание за счёт конкурентных свойств. Механизмы реализации антагонистической активности микроорганизмов разнообразны: конкуренция за трофические субстраты и сайты адгезии, высокая ферментативная активность, закисление среды, изменение окислительно-восстановительного потенциала, выделение антагонистически активных метаболитов — бактериоцинов [1].

К продукции бактериоцинов и бактериоциноподобных субстанций способны многие молочнокислые микроорганизмы, в том числе бактерии рода *Enterococcus*, что обеспечивает им конкурентное преимущество в определённых экологических нишах, способствуя селекции наиболее жизнеспособных штаммов, успешной колонизации биотопа [2].

Бактериоцины энтерококков являются в настоящее время объектом детального изучения во многих странах [3, 4]. Однако основной имеющийся пул данных по этому вопросу посвящён энтероцинам симбиотических штаммов [5, 6]. Между тем известно, что антагонистическая активность микроорганизмов, реализуемая в том числе и за счёт продукции антагонистически активных метаболитов, является одним из дополнительных факторов вирулентности и персистенции патогенных бактерий. Информация о распространённости генов бактериоциногении в популяции клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, отсутствует. Не изучены связь генетических детерминант, кодирующих синтез энтероцинов, с биотопами локализации возбудителя.

Всё вышеизложенное и предопределило цель настоящего исследования — охарактеризовать распространённость генов бактериоциногении в популяции клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных.

**Материал и методы исследования.** В работе изучено 42 штамма энтерококков. В зависимости от источника выделения культуры энтерококков были разделены на три группы. Первую группу представляли изоляты *E. casseliflavus* и *E. hirae*, выделенные из секрета молочных желёз коров, больных маститом. Во вторую группу были отнесены 15 изолятов видов *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, выделенные из экскрета половых органов самок при эндометритах. В третью группу входили культуры энтерококков (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens*), изолированные из гнойного экссудата при абсцессах, флегмонах и отитах — 25 штаммов.

При помощи ПЦР у энтерококков определяли гены, кодирующие синтез известных бактериоцинов: энтероцин А — *entA*, энтероцин В — *entB*, энтероцин Р — *entP*, энтероцин L50A — *entL50A*, энтероцин L50B — *entL50B*, энтероцин AS-48 — *entAS-48*, цитолизин — *cylLs* [7]. Для ПЦР-амплификации применяли известные праймеры (табл.), синтезированные компанией «СИНТОЛ» (Россия).

ПЦР проводили в термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Реакционная смесь включала 1 мкл бактериального лизата, по 0,5 мкл специфических праймеров, 0,8 мкл дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (10 mM, Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 10×ПЦР-буфера (Хеликон, Россия), 1,5 мкл хлорида магния (25 mM, Fermentas, Литва), 1 мкл фермента *Taq*-полимеразы (5 ед/мкл, Хеликон, Россия). Реакционную смесь доводили до 25 мкл водой без нуклеаз (Fermentas, Литва).

ПЦР для выявления генов, кодирующих синтез энтероцинов, проводили по протоколу: для генов *entA*, и *Cyl* 1 цикл — 95 °С, 5 мин.; 30 циклов — 95 °С, 30 с., 58 °С, 30 с., 72 °С, 30 с.; 1 цикл элонгации — 72 °С, 5 мин. Для генов *entB*, *entP*, *entAS-48*, *entL50A* и *entL50B* температура отжига праймеров составляла 56 °С. Полученные в результате первой амплификации ПЦР-продукты генов *entA* и *entB* использовались в качестве матрицы (по 0,2 мкл) для проведения второй ПЦР с применением «вложенных» праймеров по протоколам для соответствующих генов (табл.).

Продукты амплификации генов анализировали путём электрофоретического разделения в горизонтальном в 1,5–2-процентном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Результаты

визуализировали в ультрафиолетовом свете. Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении светящейся полосы определённой молекулярной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва).

Полученные данные были обработаны статистически [8].

**Результаты исследования.** При исследовании клинических изолятов *Enterococcus spp.* на наличие генетических детерминант бактериоциногении обнаружено, что 13 культур (31,0±7,14%) обладали тем или иным геном, кодирующим синтез энтероцинов.

Среди этиологически значимых культур энтерококков распространённость генов, кодирующих синтез бактериоцинов, изменялась в зависимости от локализации возбудителя. Так, наиболее часто генетические детерминанты бактериоциногении выявлялись у штаммов, выделенных из секрета молочных желёз при маститах (100%) и среди культур *Enterococcus spp.*, изолированных из экскрета половых органов самок (53,3±11,76%). У культур второй группы, выделенных из материала, в норме не содержащего микроорганизмов, гены бактериоциногении встречались значительно реже (12,0±6,50% P<0,001).

Выявленная закономерность, вероятно, связана с потребностью энтерококков в конкретных факторах патогенности для успешной колонизации определённого биотопа. Так, широкая распространённость генов, кодирующих синтез энтероцинов, среди культур, выделенных из половых органов самок и секрета молочных желёз, вероятно, позволяет им адаптироваться в экологических нишах с большим видовым разнообразием и высокой плотностью заселения биотопа, обеспечивая конкурентное преимущество за счёт бактериоциногенной активности.

Самым распространённым в популяции этиологически значимых энтерококков оказался ген энтероцина В (38,5±13,50%), который был обнаружен только в геноме культур, выделенных из экскрета половых органов самок и секрета молочных желёз при мастите.

Генетическую детерминанту *cylL<sub>s</sub>*, кодирующую синтез структурной субъединицы цитолизина, чаще регистрировали у изолятов *E. faecalis* – возбудителей эндометрита, чем у культур из раневого экссудата. Частота её обнаружения составила 23,1±11,69% и 7,7% случаев соответственно.

Гены энтероцина А и Р обнаружены соответственно у 15,4±10,01% и 23,1±11,69% *non-faecalis* штаммов энтерококков, изолированных из разных биотопов (рис.).

Среди культур *Enterococcus spp.* изолятов, содержащих генетические детерминанты энтероцинов AS-48, L50A и L50B, выявлено не было. Из литературных данных известно, что гены вышеуказанных бактериоцинов расположены в плазидах, которые не являются жизненно необходимым компонентом генома и часто элиминируются. В то время как генетические детерминанты бактериоциногении А, В и Р, локализуясь в хромосомах бактериальных клеток, находятся в более стабильном состоянии [9]. Вероятно, это объясняет выявленное нами преобладание генов энтероцинов А, В и Р в популяции *Enterococcus spp.*

Все культуры энтерококков имели в геноме одну генетическую детерминанту бактериоциногении. Исключением явился изолят *E. durans*, который содержал комплекс из двух генов бактериоциногении: *entB* и *entP*.

Генами, кодирующими синтез энтероцинов, культуры *E. faecalis* обладали в значимо меньшем проценте случаев (21,2±7,11%) по сравнению с изолятами *non-faecalis* видов (77,8±13,85%; (P<0,001). Ранее была выявлена широкая распространённость

Праймеры, использованные для выявления генов бактериоцинов *Enterococcus spp.*  
(Foulquié Moreno M.R. et al., 2003)

Ген	Праймер	Последовательность 5'-3'	Размер продукта реакции, п.о.
entA	AF AN AR	GGTACCACTCATAGTGGAAA AATGTACGGTCGATTGGGCCA CCCTGGAATTGCTCCACCTAA	138
entB	BF BN BR	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG AACTTATCTAAAGGTGGAGCAAGAGTATACATTTGCTAACCC	201
entP	PF PR	GCTACGCGTTCATATGGTAAT TCCTGCAATATTCTCTTTAGC	87
entAS-48	AS-48F AS-48R	GAGGAGTATCATGGTTAAAGA ATATTGTTAAATTACCAA	339
entL50A	L50AF L50AR	ATGGGAGCAATCGCAAATTA TTTGTAAATTGCCATCCTTC	98
entL50B	L50BF L50BR	ATGGGAGCAATCGCAAATTA TAGCCATTTTCAATTTGATC	274
cylLs	cylLs1 cylLs2	GAAGCACAGTGCTAAATAAGG GTATAAGAGGGCTAGTTTCAC	240

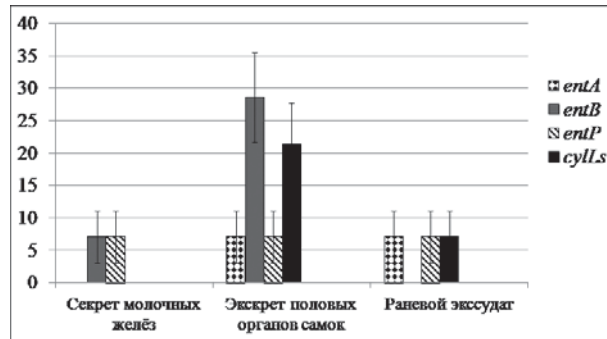


Рис. – Распространённость генов, кодирующих синтез энтероцинов, в популяции клинических изолятов *Enterococcus spp.*:

гены *entA* – энтероцин А, *entB* – энтероцин В, *entP* – энтероцин Р, *cylLs* – структурная субъединица цитолизина, *entL50A* – энтероцин L50A, *entL50B* – энтероцин L50B, *entAS-48* – энтероцин AS-48.

генетических детерминант вирулентности среди культур *E. faecalis*, выделенных из клинического материала, в то время как среди изолятов энтерококков других видов гены, кодирующие синтез факторов патогенности, обнаружены не были [10].

Полученные нами результаты позволяют предположить, что клиническая значимость *non-faecalis* видов энтерококков связана с бактериоциногенной активностью, что подтверждает факт широкого распространения генов, кодирующих синтез энтероцинов, среди указанных культур.

#### Выводы.

1. В популяции этиологически значимых изолятов энтерококков выявлена широкая распространённость генов, кодирующих синтез бактериоцинов.

2. Пенетрантность генетических детерминант бактериоциногенности зависела от источника вы-

деления клинических изолятов *Enterococcus spp.* и нарастала в ряду: гнойный экссудат – экскрет половых органов самок – секрет молочных желёз.

3. Продукция бактериоцинов является одним из механизмов реализации патогенного потенциала энтерококками – возбудителями инфекционно-воспалительных заболеваний животных.

#### Литература

1. Каблинова Т.В., Калипарова М.П., Крайнова Е.П. Оценка антагонистической активности микроорганизмов как фактора вирулентности респираторной микрофлоры // Научная сессия Пермского государственного медицинского университета имени академика Е.А. Вагнера. Пермь, 2015. С. 28–31.
2. Eijsink V.G., Axelsson L., Diep D.B. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication // *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2002. Vol. 81. No. 1–4. P. 639–654.
3. Abengózar M.Á., Cebrián R., Saugar J.M. et al. Enterocin AS-48 as Evidence for the Use of Bacteriocins as New Leishmanicidal Agents // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017. Vol. 24. No. 61(4). doi: 10.1128/AAC.02288–16.
4. Graham C.E., Cruz M.R., Garsin D.A., Lorenz M.C. Enterococcus faecalis bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans* // *Proc. Natl. Aca. Sci USA*. 2017. Vol. 114(17). P. 4507–4512.
5. Щепитова Н.Е., Сычева М.В., Карташова О.Л. Биологические свойства антагонистически активных энтерококков кишечной микрофлоры животных // *Вестник Оренбургского государственного университета*. 2014. № 13. С. 134–138.
6. Acedo J.Z., Ibarra Romero C., Miyata S.T. et al. Draft Genome Sequence of *Enterococcus canintestini* 49, a Potential Probiotic That Produces Multiple Bacteriocins // *Genome Announc*. 2017. Vol. 5(40). pii: e01131–17. doi: 10.1128/genomeA.01131–17.
7. Foulquié Moreno M.R., Callewaert R., Devreese B. et al. Isolation and biochemical characterization of enterocins produced by enterococci from different sources // *Journal of Applied Microbiology*. 2003. No. 94. P. 214–229.
8. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Гос. изд-во мед. лит, 1962. 180 с.
9. Ермоленко Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы. Обзор литературы // *Вестник Санкт-Петербургского университета*. 2009. Сер. 11. Вып. 3. С. 184–201.
10. Пошвина Д.В., Сычёва М.В. Распространение генетических детерминант вирулентности среди клинических изолятов энтерококков, выделенных от животных // *Молекулярная диагностика 2014: сб. тр. VIII всерос. науч.-практич. конф. с междунар. участ. М., 2014. Т. 2. С. 464–465.*