

УДК 576.2:591.61:623.8-07

## НЕКОТОРЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЭНТЕРОКОККОВ И BLASTOCYSTIS HOMINIS В АЛГОРИТМЕ АССОЦИАТИВНОГО СИМБИОТИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДО И ПОСЛЕ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Бугеро Н.В., Потатуркина-Нестерова Н.И.

ФГБОУ ВПО УлГУ «Ульяновский государственный университет»,  
Ульяновск, e-mail: nbugero@mail.ru

Взаимоотношения микробов-ассоциантов имеют ключевое значение в выяснении причинно-следственных связей между миром микробов и патологическим состоянием человека. Анализ проявлений многочисленных микробных ассоциаций позволяет прояснить патогенез ряда инфекционных заболеваний различной этиологии, правильно оценить происхождение тех или иных аномалий в структуре микроорганизмов, приводящих к изменению их типичных или проявлению совершенно новых необычных, биологических свойств. В работе проведен анализ биологических свойств бактерий рода *Enterococcus* и простейших *Blastocystis hominis* в условиях ассоциативного симбиотического взаимодействия до и после сокультивирования. Изучена сахаролитическая, протеолитическая, гемолитическая, колициногенная активности и антибиотикорезистентность бактерий *Enterococcus* и гемолитическая, ДНК-азная, протеолитическая, лецитовелилазная и липолитическая простейших *Blastocystis hominis*. Экспериментальные данные показали синергизм в усилении гемолитической, колициногенной, протеолитической активностей и антибиотикорезистентности со стороны бактерий энтерококков и увеличении гемолитической, ДНК-азной, протеолитической, лецитовелилазной, липолитической активностей со стороны *Blastocystis hominis*. Антагонизм наблюдался только в отношении сахаролитической способности бактерий.

**Ключевые слова:** *Blastocystis hominis*, энтерококки, ассоциативный симбиоз, патогенез, инфекционные заболевания

## SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF ENTEROCOCCI AND BLASTOCYSTIS HOMINIS IN THE ALGORITHM OF ASSOCIATIVE SYMBIOTIC INTERACTION BEFORE AND AFTER THE COCULTURE

Bugero N.V., Potaturkina-Nesterova N.J.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: nbugero@mail.ru

Interrelation of microbes – associates play a key role in defining causal-result relations between the world of microbes and pathological condition of a man. An analysis of displays of numerous microbial associations allows us to explain pathogenesis of a number of infection diseases of different etiology, correctly estimate an origin of various anomalies in structure of micro-organisms that lead to alteration in their typical, or display new unusual biological characteristics. The work contains an analysis of biological traits of bacetrias of *Enterococcus* type and the simplest *Blastocystis hominis* in terms of associative symbiotic interaction before and after co-cultivation. The authors have studied saccharolytic, proteolytic, hemolytic, colicinogenic activity and anti-bacterial resistance of *Enterococcus* bacterias and hemolytic, DNA, proteolytic, leciiovetilazious, and lipolytic activity of the simplest *Blastocystis hominis*. Experimental data has shown a synergism in strengthening of hemolytic, colicinogenic, proteolytic activity and anti-bacterial resistance among enterococcus bacterias and increase in hemolytic, DNA, proteolytic, eciiovetilazious, and lipolytic activity among *Blastocystis hominis*. Antagonism has been displayed only concerning saccharolytic ability of bacterias.

**Keywords:** *Blastocystis hominis*, enterococcus, associative symbiosis, pathogenesis, infective diseases

В последние годы в России официально регистрируется более 1,2 млн больных различными паразитоценозами, среди которых отмечается рост заболеваемости кишечными протозоозами [1].

Известно, что у лиц, страдающих заболеваниями пищеварительного тракта, очень высок показатель паразитарных инвазий, в частности бластоцистоза [2]. Данная протозойная инфекция этиологически ассоциирована с простейшими *Blastocystis hominis*, паразитирующими преимущественно в толстом отделе кишечника человека [8, 9].

Возбудитель бластоцистной инвазии является микроорганизмом, к усилению агрессии которого, с одной стороны, могут приводить факторы, снижающие защитные

силы макроорганизма, а с другой стороны – микроорганизмы, входящие в состав биоценоза. Естественно, что при освоении биотопов тела человека между микробами складываются определенные взаимоотношения, которые отражаются на качественной и количественной характеристике того или иного микробного пейзажа [4].

Анализ направленности межмикробных взаимоотношений ассоциативных микросимбионтов позволяет прояснить патогенез широкого спектра заболеваний, правильно оценить происхождение тех или иных аномалий в структуре микросимбионтов, приводящих к изменению их типичных или проявлению новых биологических свойств [9].

Нарушая баланс микроорганизмов, данные возбудители способствуют созданию благоприятных условий для развития патологических процессов [8]. Результаты собственных исследований показали, что blastocистная инвазия сопровождается качественными и количественными изменениями микрофлоры кишечника человека. Выявлено, что на фоне blastocистоза увеличивается обсемененность толстой кишки условно-патогенными бактериями рода *Enterococcus* – *E.faecalis*, которые относят к нормальным симбионтам. Интенсивные исследования последних лет позволили установить, что данные бактерии синтезируют существенное количество веществ, так называемых факторов вирулентности, способствующие развитию инфекционного процесса. К таким факторам можно отнести поверхностные белки, участвующие в процессе адгезии и инвазии, экскретируемые белки и токсины, обеспечивающие повреждение тканей хозяина, а также факторы, индуцирующие воспаление [7].

Ранее нами были изучены персистентные свойства энтерококков в монокультуре и при сокультивировании с *Blastocystis hominis*. Выявлено нарастание экспрессии персистентных характеристик у бактерий энтерококков при blastocистозе, которое ограничивает размножение паразитов в кишечнике больных, что представляет собой процесс взаимной адаптации, направленный на обеспечении совместного длительного паразитирования в макроорганизме.

Тем не менее не изученными остаются другие не мало важные биологические свойства бактерий рода *Enterococcus* и простейших *Blastocystis hominis* в ходе межмикробных взаимодействий, в частности в протозойно-бактериальных ассоциациях.

В связи с этим целью нашего исследования явилось изучение биологических свойств, таких как сахаролитическая, протеолитическая, гемолитическая, колициногенная активности и антибиотикорезистентность бактерий *Enterococcus* и гемолитическая, ДНК-азная, протеолитическая, лецитоветилазная и липолитическая простейших *Blastocystis hominis* до и после совместного культивирования.

### Материалы и методы исследования

Исследования микробного пейзажа кишечника проводили в период с 2006 по 2010 год на базе бактериологических лабораторий ГУЗ «Покровская больница», городской клинической больницы №40 г. Санкт-Петербурга. Определение гемолитической, протеолитической, ДНК-азной и колициногенной активностей определяли по методике Биргера [5], липолитическую активность с использованием метода Slifkin [9], лецитоветилазную по методике Теца [6],

антибиотикочувствительность исследуемых культур определяли с использованием методики Навашина, Чучалина, Белоусова [3]. Микробный пейзаж кишечника изучали согласно Приказу № 535 от 22.04.85 МЗ РСФСР «Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях и лечебно-профилактических учреждениях». Выявление blastocист в препаратах проводили путем микроскопии нативных или окрашенных мазков. Для получения культур простейших *B.hominis* использовали среду Suresh. Культивирование с целью изучения взаимного влияния микробов-ассоциантов проводили in vitro на модифицированной среде Surech (приоритетная справка № 2008115689).

В работе использованы 188 штаммов микроорганизмов, выделенных от больных с патологией желудочно-кишечного тракта: 78 штаммов простейших *Blastocystis hominis*, 66 штаммов *Enterococcus faecalis*. Было обследовано 120 человек в возрасте от 20 до 70 лет (80% – женщины).

### Результаты исследования и их обсуждения

Результаты исследований свидетельствуют о достаточно высокой встречаемости бактерий рода энтерококков у лиц, инвазированных blastocистами.

При изменении вирулентности blastocист от  $LD_{50}/lg 0$  до  $5,3 \pm 0,2$  статистически достоверно резко изменялась обсемененность кишечника микробами *Enterococcus faecalis*. Значения их обсемененности изменялись от  $lg 3,1 \pm 0,3$  до  $lg 8,1 \pm 0,3$  КОЕ/г ( $p \leq 0,001$ ).

Проведенные исследования показали, что в ходе контакта *E.faecalis* с blastocистами отмечены изменения их патогенных свойств: усиление (синергизм), ослабление (антагонизм) и индифферентное влияние.

Синергизм при сокультивировании *E.faecalis* и blastocист проявляется в увеличении коэффициента гемолитической и колициногенной активностей бактерий до  $6,6 \pm 0,5$  и  $5,1 \pm 0,21$  ед соответственно (до сокультивирования –  $1,5 \pm 0,03$  и  $3,92 \pm 0,13$ , в монокультурах –  $1,7 \pm 0,3$  и  $2,9 \pm 0,13$  ед соответственно,  $p \leq 0,001$ ).

В результате совместной инкубации простейших и бактерий изменилась так же чувствительность последних к антибактериальным препаратам у всех 66 штаммов (100%) (табл. 1). Усиление антибиотикорезистентности штаммов выделенных после совместного культивирования по отношению к культурам, выделенным из кишечника, произошло в 1,69 раза.

Изучение протеолитической активности энтерококков также выявило синергидное взаимодействие. До совместного культивирования данным видом активности обладали 32 культуры (52,31%), после – все 66 (100%), в монокультурах – 26 (20,77%).

У всех изолированных *E. faecalis* была изучена сахаролитическая активность, по отношению к следующим углеводам: лактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, фруктоза (табл. 1).

Как показано в табл. 1, после взаимодействия бактерий с бластоцистами *in vitro* сахаролитическая активность значительно снизилась.

**Таблица 1**

Сравнительная характеристика чувствительности к антибиотикам штаммов *E. faecalis*

№ п/п	Антибиотики	<i>E. faecalis</i> , выделенные после сокульт-ия (n = 130)	<i>E. faecalis</i> , выделенные до сокульт-ия (n = 130)	<i>E. faecalis</i> , изолированная из монокультур (n = 130)
		МПК (мкг/мл)	МПК (мкг/мл)	МПК (мкг/мл)
1.	Азитромицин	60,6 ± 0,7**	39,3 ± 0,4*	32,2 ± 0,2*
2.	Ципрофлоксацин	47,3 ± 0,5**	25,9 ± 0,4*	20,6 ± 0,1*
3.	Цефазолин	10,4 ± 0,3*	7,9 ± 0,7*	6,3 ± 0,2*
4.	Гентамицин	39,2 ± 0,8**	18,3 ± 0,6*	14,7 ± 0,5*

Примечание: \* –  $P < 0,05$ ; \*\* –  $P \leq 0,001$ .

Полученные данные свидетельствуют об антагонистическом воздействии простейших *B. hominis* на способность энтерококков гидролизовать углеводы (табл. 2).

Определение факторов патогенности *Blastocystis hominis* показало синергидное взаимодействие бактерий и простейших, которое привело к усилению ДНК-азной, гемолитической, липазной, лецитоветилазной и протеолитической активностей.

Из 78 изолятов паразитов после совместной инкубации со штаммами *E. faecalis* 58 культур (84,1%) приобрели способность

разрушать эритроциты крови человека. Тогда как до инкубации данным свойством обладали только 26 штаммов (38,41%).

В монокультуре (табл. 2) способность разрушать эритроциты крови человека сохранили только 5 штаммов (4,6%). Коэффициент гемолитической активности штаммов простейших, выделенных из кишечного микробиоценоза, составил  $1,48 \pm 0,02$  ед, культур из ассоциации с *E. faecalis* после совместной инкубации повысился до  $3,2 \pm 0,02$  (в монокультурах –  $0,7 \pm 0,1$  ед,  $p \leq 0,001$ ).

**Таблица 2**

Сравнительная характеристика сахаролитической активности *Enterococcus faecalis* до и после совместного культивирования с *B. hominis*

Ферментируемые углеводы	Активность ферментации	Количество штаммов <i>E. faecalis</i>		
		монокультуры n = 130	до сокульт-ия n = 130	после n = 130
Лактоза	Нормальная	130	85	–
	Замедленная	–	45	130
	Отсутствие	–	–	–
Мальтоза	Нормальная	130	85	–
	Замедленная	–	45	31
	Отсутствие	–	–	99
Глюкоза	Нормальная	130	–	–
	Замедленная	–	85	–
	Отсутствие	–	45	130
Сахароза	Нормальная	130	–	–
	Замедленная	–	130	–
	Отсутствие	–	–	130
Фруктоза	Нормальная	130	–	–
	Замедленная	–	130	–
	Отсутствие	–	–	130

Среди штаммов бластоцист, выделенных из консорциума после взаимодействия *in vitro*, ДНК-азной активностью обладали

62 культуры (97,3%), коэффициент ДНК-азной активности составил  $4,7 \pm 0,3$  ед. В группе изолятов, изолированных из тол-

стой кишки способность к разрушению ДНК выявили у 27 культур (90,1%), коэффициент активности равнялся  $1,6 \pm 0,2$  ед.,  $p \leq 0,001$ . Из монокультур бластоцист только 9 (9,9%) характеризовались ДНК-азной активностью, коэффициент –  $0,9 \pm 0,4$  ед. Изучение липолитической активности культур после сокультивирования показало увеличение значений коэффициентов до  $5,7 \pm 0,3$  ед. (у штаммов, полученных до сокультивирования –  $1,38 \pm 0,5$ , из монокультуры –  $0,5 \pm 0,6$  ед.,  $p \leq 0,001$ ).

Способность продуцировать лецитиназу также увеличивалась у простейших после совместного культивирования с бактериями *E.faecalis*. Лецитоветилазная активность проявилась у 58 культур (96,7%), коэффициент активности составил  $5,3 \pm 0,2$  ед. Коэффициент лецитоветилазной активности штаммов бластоцист, изученных до совместного культивирования, равнялся  $1,69 \pm 0,5$  ед., у бластоцист из монокультуры –  $0,8 \pm 0,4$  ед.,  $p \leq 0,001$ .

Заключительным этапом исследований, посвященных изучению факторов патогенности, простейших-ассоциантов явилось определение протеолитических ферментов. Как показали исследования, 74 культуры бластоцист в результате взаимодействия с *E.faecalis* in vitro (49,0%) приобрели способность гидролизовать молочный белок. Из группы бластоцист, выделенных из ассоциаций толстой кишки, данной способностью характеризовались 39 изолятов (25,83%), у бластоцист из монокультуры протеолитической активностью обладали 13 штаммов (8,6%).

### Заключение

Таким образом, в ходе межмикробных взаимодействий ассоциативных микросимбионтов синергизм проявлялся в усилении гемолитической, колициногенной, протеолитической активностей и антибиотикорезистентности со стороны бактерий и увеличении гемолитической, ДНК-азной, протеолитической, лецитоветилазной, липолитической активностей со стороны *Blastocystis hominis*. Антогонизм – только в отношении сахаролитической способности бактерий.

### Список литературы

1. Романенко Н.А., Сергиев В.П. Охрана окружающей среды как важнейший компонент профилактики массовых паразитов в экстремальных природно-климатических условиях севера России // Мед. паразитол. – 2008. – № 3. – С. 16–19.
2. Торопова Н.Т., Сафронова Н.А., Гордеева Л.М. Паразитарная фауна кишечника у детей, страдающих атопическим дерматитом. Аспекты диагностики патогенеза // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 1998. – №2. – С. 27–32.
3. Навашин С.М., Чучалин А.Г., Белоусова Ю.Б. Антибактериальная терапия пневмонии у взрослых: учеб. пособие. – М., 1998. – С. 28.

4. Изучение этиопатогенетической роли *Blastocystis hominis* в патологии желудочно-кишечного тракта / Н.И. Потатуркина-Нестерова, Ю.Ю. Красноперова, Н.М. Чебан, Н.А. Ильина // С.-Петербург. Гастро-2000: материалы 2-й объединенной Всероссийской и Всеармейской научной конференции. – СПб., 2000. – №1–2. – С. 194.

5. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина. – 1982. – 464 с.

6. Тец В.В. //ЖМЭИ. – 1997. – №1. – С. 106–111.

7. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Córdoba province, Argentina / S. Guignard, H. Arienti, L. Freyre, H. Lujan, H. Rubinstein, M. Frasi // European Journal of Epidemiology. – 2000. – V. 16. – P. 287–293.

8. Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water // Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health. – 2000. – V. 31. – P. 112–117.

9. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates // Veterinary Parasitology. – 2003. – V. – 113. – P. 321–325.

### References

1. Romanenko N.A., Sergiev V.P. Oхрана okruzhajuwey sredy kak vazhnejshij komponent profilaktiki massovyh parazitov v jekstremal'nyh prirodno-klimaticheskikh uslovijah severa Rossii. Med. parazitol., 2008, no.3, pp. 16–19.

2. Toropova N.T., Safronova N.A., Gordееva L.M. Parazitarnaja fauna kishhechnika u detej, stradajuwih atopicheskim dermatitom. Aspekty diagnostiki patogeneza. Rossijskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej, 1998, no.2, pp. 27–32.

3. Navashin S.M., Chuchalin A.G., Belousova Ju.B. Antibakterial'naja terapija pnevmonii u vzroslyh: Ucheb.posobie, Moscow, 1998, p. 28.

4. Potaturkina-Nesterova N.I., Krasnoperova Ju.Ju., Cheban N.M., Il'ina N.A. Izuchenie jetiopatogeneticheskoy roli *Blastocystis hominis* v patologii zheludochno-kishechnogo trakta. Materialy 2-oj obedinennoj Vserossijskoj i Vsearmejskoj nauchnoj konferencii «S.-Peterburg. Gastro-2000», S.-Peterburg, 2000, no. 1–2, p. 194.

5. Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovanija. Moscow, Medicina, 1982, 464 p.

6. Tec V.V. ZhMJeI, 1997, no. 1, pp. 106–111.

7. Guignard S, Arienti H, Freyre L, Lujan H, Rubinstein H., Frasi M. Prevalence of enteroparasites in a residence for children in the Córdoba province, Argentina. European Journal of Epidemiology, 2000, – no. 16, pp. 287–293.

8. Taamasri P, Mungthin M, Rangsin R, Tongupprakarn B, Areekul W, Leelayoova S. Transmission of intestinal blastocystosis related to the quality of drinking water. Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health, 2000, no. 31, pp. 112–117.

9. Abe N, Wu Z, Yoshikawa H. Molecular characterization of *Blastocystis* isolates from primates. Veterinary Parasitology, 2003, no. 113, pp. 321–325.

### Рецензент:

Ильина Н.А., д.б.н, профессор кафедры зоологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВПО УЛГПУ им. И.Н. Ульянова, г. Чебоксары;

Нестеров А.С., д.м.н., профессор кафедры инфекционных и кожно-венерологических болезней ФГБОУ ВПО УЛГУ, г. Волгоград.

Работа поступила в редакцию 25.04.2012