

УДК 579.252.59

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ  
E. FAECALIS В АССОЦИИ С BLASTOCYSTIS SPP. IN VITRO****Бугеро Н.В.**

ФГБОУ ВПО «УлГПУ им. И.Н. Ульянова», Ульяновск, e-mail: nbugero@mail.ru

Изменение патогенности условно-патогенных энтеробактерий в настоящее время приобретает все большее медико-биологическое значение. Темпы и масштабы превращений бактерий-симбионтов не укладываются в норму реакции фенотипа на изменение условий среды. Все это обуславливает интенсификацию исследований феномена патогенности на молекулярно-генетическом уровне. В данной работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа взаимодействий *E. faecalis* в ассоциации с *Blastocystis spp. in vitro*. Установлено, что нуклеотидные последовательности генов, детерминирующие синтез факторов патогенности, встречаются у изученных энтерококков в различных соотношениях, а частота обнаружения фрагментов искомым генов меняется после совместного культивирования их с бластоцистами, выделенными из фекалий гастроэнтерологических больных. Простейшие *Blastocystis spp.* вызывали увеличение показателей частоты встречаемости гена *gelE* (желатиназа) у энтерококков после их совместного культивирования, что является свидетельством их влияния на способность реализации патогенного потенциала ассоциативных симбионтов.

**Ключевые слова:** *Enterococcus faecalis*, *Blastocystis spp.*, вирулентность, ПЦР**MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF INTERACTIONS OF E. FAECALIS  
IN ASSOCIATION WITH BLASTOCYSTIS SPP. IN VITRO****Bugero N.V.**Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Professional Education UIGPU  
named after I.N. Ulyanov, Ulyanovsk, e-mail: nbugero@mail.ru

Modification of pathogenicity of opportunistic pathogenic enterobacteria now becomes more and more important in terms of medicine and biology. Rates and scales of transformation of bacteria-symbionts do not correspond to normal reaction of phenotype to the change of conditions of medium. All this causes an intensification of researches of pathogenicity phenomenon at molecular-genetic level. This work contains the results of molecular-genetic analysis of interactions of *E. faecalis* in associations with *Blastocystis spp. in vitro*. It is established that nucleotide sequences of genes determining the synthesis of pathogenicity factors, are present in studied enterococci with various ratios, and the frequency of detection of the fragments of the required genes changes after their cultivation with blastocystes, isolated from the excrements of gastroenterological patients. Protozoan *Blastocystis spp.* have caused increase in the parameters of frequency of occurrence of *gelE* gene (gelatinase) of enterococci after their joint cultivation, which is a sign of their influence on an ability of realization of pathogenic potential of associative symbionts. Hence, it can be expected that the mechanisms of mutual adaptation of *E. faecalis* strains in the conditions of macroorganism and in artificial nutrient mediums in a consortium with blastocystes of various virulence, include an increase in the number of individuals, which genotype contains *gelE* genes.

**Keywords:** *Enterococcus faecalis*, *Blastocystis spp.*, virulence, PCR

Молекулярно-генетический анализ при изучении ассоциативных симбиотических взаимодействий способствует выявлению основных направлений взаимoadaptации микроорганизмов в изменяющихся условиях симбиоза [5, 8].

Изменение патогенности условно-патогенных энтеробактерий в настоящее время приобретает все большее медико-биологическое значение. Относительно недавно «острова» и «островки» патогенности были обнаружены у традиционно условно-патогенных бактерий *E. faecalis* [2, 3, 4]. Однако вклад данных механизмов в формирование новых фенотипических вариантов микроорганизмов остается неизученным.

В последние годы появились данные о важной роли в формировании патобиоценозов кишечника, помимо бактерий и грибов, таких простейших как *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* и *Cryptosporidium* [6, 10]. Менее известен протозооз, обуслов-

ленный паразитированием преимущественно в толстой кишке простейших *Blastocystis hominis* [11]. 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.

Работами В.И. Пушкаревой и соавт. [9] показано, что бактерии, находясь в клетке простейших, избегают массовой гибели, а их хозяева – простейшие – поддерживают их численность и вирулентность.

Проводимые исследования по характеристике ассоциативного симбиоза простейших с другими микроорганизмами ограничиваются изучением механизмов выживания и их взаимодействия вне макроорганизма, который также представляет собой среду обитания для огромного количества видов микробов [7,10].



Таблица 1

Характеристика праймера к участку гена *gelE*

Параметр	Характеристика
Ген <i>gelE</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	TCAAGCGCCATCACTAGCAA
Обратный праймер (r) 5'-3'	AAACCGGCAGTATGTTCCGT
Расчетная температура плавления прямого праймера	+ 60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	+ 60,0°C
Теоретическая специфичность	Все, доступные для изучения штамма <i>E. faecalis</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	297

Таблица 2

Частота встречаемости фрагментов гена *gelE* у культур *E. faecalis* в общей биомассе до и после сокультивирования с *Blastocystis spp.*

<i>E. faecalis</i> в ассоциации с бластоцистами:	Совместное культивирование	Частота встречаемости фрагмента гена <i>gelE</i> (%)
Слабовирулентными ( $n = 24$ )	до сокультивирования	3,72 ± 0,3
	после 3-х суток сокультивирования	5,43 ± 0,5
Умеренновирулентными ( $n = 71$ )	до сокультивирования	15,25 ± 1,6
	после 3-х суток сокультивирования	24,64 ± 2,8*
Высоковирулентными ( $n = 37$ )	до сокультивирования	62,55 ± 4,6
	после 3-х суток сокультивирования	98,51 ± 7,3*
<i>E. faecalis</i> , выделенные в виде монокультуры ( $n = 67$ )	до сокультивирования	3,22 ± 0,2
	после 3-х суток сокультивирования	4,34 ± 0,6

Примечание: \* – показатель достоверности различия между уровнем частоты встречаемости фрагмента гена *gelE* у культур *E. faecalis* в общей биомассе до и после их сокультивирования с *Blastocystis spp.* ( $p < 0,05$ ).

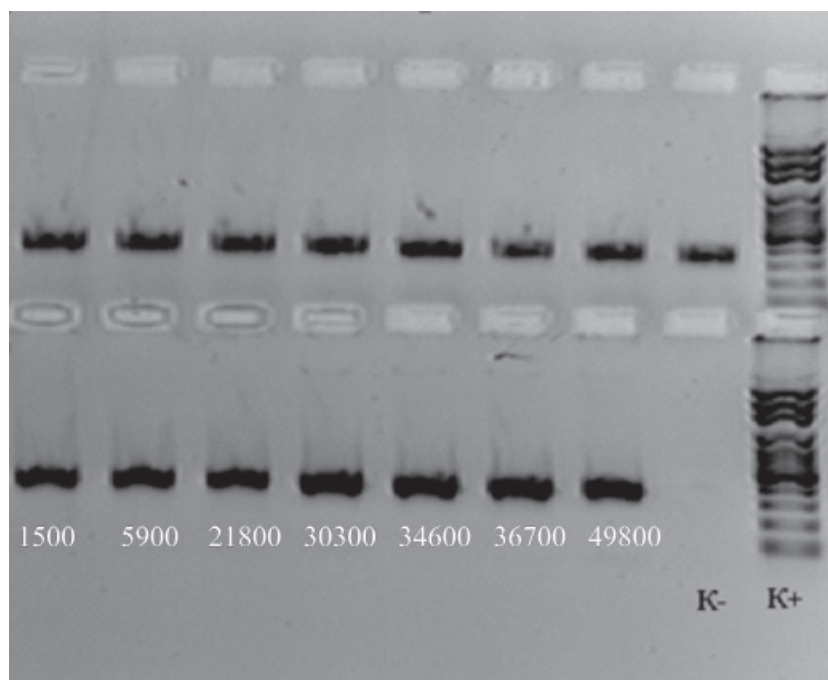


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *gelE* *E. faecalis* после сокультивирования с бластоцистами

Концентрация копий *gelE* гена *E. faecalis* представлена в протоколе № 1.

Протокол № 1. Определение абсолютной концентрации *gelE* гена *E. faecalis* после сокультивирования с *Blastocystis spp.*

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Концентрация копий/мл
B1	Образец 1 (CPS Ent f)	17,4		1500
B2	Образец 2 (CPS Ent f)	17,6		5900
B3	Образец 3 (CPS Ent f)	17,5		21800
B4	Образец 4 (CPS Ent f)	12,4		30300
B5	Образец 5 (CPS Ent f)	12,8		34600
B6	Образец 6 (CPS Ent f)	12,7		36700
B7	Образец 7 (CPS Ent f)	13,6		49800
B8	К- (CPS Ent f)			

Немаловажной характеристикой любой ПЦР-системы является ее чувствительность. Используя вариации чувствительности, в настоящее время создают тест-системы для определения, например, условно-патогенной флоры в клинически значимом количестве. Таким образом, если в пробе присутствуют представители условно-патогенной флоры в количестве меньше определенного порога, результат ПЦР-исследования будет отрицательным. На практике это позволяет избежать гипердиагностики.

Задачей данной работы было также определить чувствительность ПЦР со всеми системами праймеров, используемых для индикации *E. faecalis*.

Так, были приготовлены последовательные 10-кратные разведения из исходной бактериальной взвеси *E. faecalis*, содержащей  $5,0 \cdot 10^9$  клеток/мл. Исходная концентрация была определена по стандарту мутности и подсчету КОЕ.

Результаты определения чувствительности представлены на рис. 2.

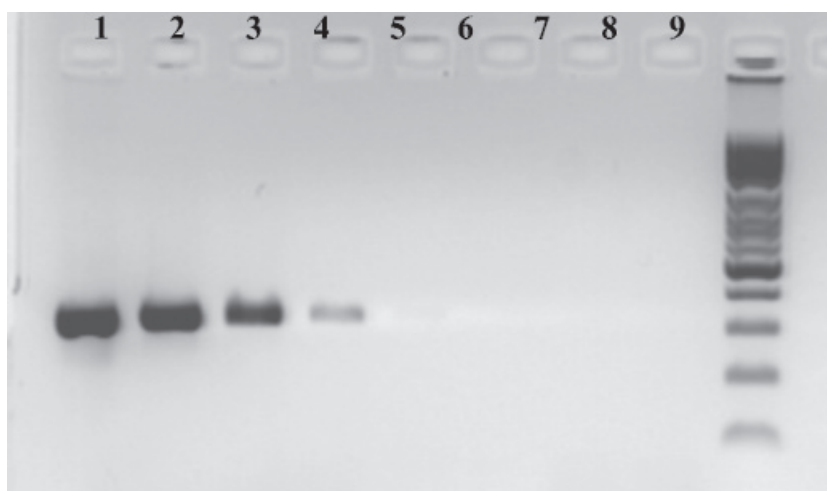


Рис. 2. Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР с праймерами к участку гена *gelE* генома *E. faecalis*. 1– $5,5 \cdot 10^5$  бактериальных клеток/мл; 2– $5,5 \cdot 10^5$  бактериальных клеток/мл; 3– $5,5 \cdot 10^4$  бактериальных клеток/мл; 4– $5,5 \cdot 10^3$  бактериальных клеток/мл; 5– $5,5 \cdot 10^2$  бактериальных клеток/мл; 6– $5,5 \cdot 10^1$  бактериальных клеток/мл; 7– $5,5 \cdot 10^0$  бактериальных клеток/мл; 8– отрицательный контроль; 9– маркер молекулярного веса

Вследствие этого чувствительность ПЦР-исследования с праймерами, использованными в данной работе, составила: для участка гена *gelE* генома *E. faecalis* –  $5,0 \cdot 10^3$  бактериальных клеток/мл.

Таким образом, в ходе проделанной работы выявлена зависимость роста числа положительных сигналов с праймерами, специфичными к *gelE* гену, от вирулентно-

сти ассоциантов ( $r = 0,75$ ) как до, так и после сокультивирования ( $p < 0,001$ ).

В дальнейшем была изучена частота встречаемости гена *gelE* у культур *E. faecalis*, выделенных из микробных сообществ кишечника, в которых отсутствовали бластоцисты. Установлено, что в группе энтерококков, выделенных без простейших, частота встречаемости генетических детер-



минант *gelE* до и после совместного культивирования с бластоцистами достоверно не изменялась ( $p < 0,005$ ).

### Заклучение

Таким образом, был произведен подбор праймеров для выявления гена патогенности энтерококков, а также оптимизация условий и режима проведения ПЦР в режиме «реального времени», позволяющего одновременно совмещать амплификацию и детекцию. Для этого использовали праймер к гену *E. faecalis*, определяющему его патогенность – *gelE* (желатиназу).

Установлено, что нуклеотидные последовательности гена *gelE*, детерминирующего синтез факторов патогенности, встречаются у изученных энтерококков в различных соотношениях, а частота обнаружения фрагментов искомого гена меняется после совместного культивирования энтерококков с бластоцистами, выделенными при заболеваниях ЖКТ.

Простейшие *Blastocystis spp.* вызывали увеличение показателей частоты встречаемости гена *gelE* у энтерококков после их совместного культивирования, что является свидетельством их влияния на способность реализации патогенного потенциала ассоциативных симбионтов.

Следовательно, можно предположить, что механизмы взаимoadaptации штаммов *E. faecalis* в условиях макроорганизма и на искусственных питательных средах в консорциуме с различными по вирулентности бластоцистами включают, в себя увеличение численности особей, в генотипе которых локализован *gelE* ген.

### Список литературы

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина. 1982. – 464 с.
2. Бондаренко В.М. «Острова» патогенности бактерий // Журн. микробиол. – 2004. – № 4. – С. 67–74.
3. Бондаренко В.М. Мавзютов А.Р., Golkocheva E. Секретируемые факторы патогенности энтеробактерий // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2002. – № 1. – С. 84–90.
4. Бондаренко В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов, 2008. – № 3 – С. 14–27.
5. Бухарин О.В. Межбактериальные взаимодействия / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвятцов, Л.М. Хуснутдинова // Микробиология. – 2003. – № 4. – С. 3–8.
6. Воробьев А.А., Лыкова Е.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства и защитные функции // Микробиологии. – 1999. – № 6. – С. 102–105.
7. Габриэлян И.Н., Горская Е.М., Спирина Т.С. Энтерококки как возбудители инфекционных послеоперационных осложнений // Журн. микробиол. – 2007. – № 4. – С. 50–53.
8. Маккреди Б.Дж., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными

методами. Молекулярная клиническая диагностика. – Методы. – М.: Мир, 1999. С. 496–506.

9. Пушкарева В.И., Величко В.В., Каминская А.А. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2005. – № 3. – С. 39.

10. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследований // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2005. – № 12. – С. 13–17.

11. 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. – Vol. 16. – P. 287–293.

12. Differentiation of the various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange staining / K. Suresh, G.C. Ng, L.C. Ho, E.H. Yap // International Journal for Parasitology. – 1994. – Vol. 24. – P. 605–606.

### References

1. Birger M.O. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovaniya. M.: Medicina. 1982. 464 p.
2. Bondarenko V.M. «Ostrova» patogenosti bakterij. // Zhurn. mikrobiol. 2004, 4:pp. 67–74.
3. Bondarenko V.M. Mavzjutov A.R., Golkocheva E. Sekretiruemye faktory patogenosti jenterobakterij // Zhurn. mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2002. no. 1. pp. 84–90.
4. Bondarenko V.M. Simbioticheskie jenterokokki i problemy jenterokokkovoju oportunisticheskoju infekcii / V.M. Bondarenko, A.N. Suvorov, 2008. no. 3 pp. 14–27.
5. Buharin O.V. Mezhbakterial'nye vzaimodejstvija / O.V. Buharin, B.Ja. Usvjacov, L.M. Husnutdinova // Mikrobiologija. 2003. no. 4. pp. 3–8.
6. Vorob'ev A.A., Lykova E.A. Bakterii normal'noj mikroflory: biologicheskie svojstva i zavitnye funkcii / A.A. Vorob'ev, E.A. Lykova // Mikrobiologii. 1999. no. 6. pp. 102–105.
7. Gabrijeljan I.N., Gorskaja E.M., Spirina T.S., Preobrazhenskaja T.B. Jenterokokki kak vozбудiteli infekcionnyh posleoperacionnyh oslozhenij. Zhurn. mikrobiol. 2007, 4:pp. 50–53.
8. Makkredi B.Dzh., Chimera D.A. Obnaruzhenie i identifikacija patogennyh mikroorganizmov molekularnymi metodami. Molekuljarnaja klinicheskaja diagnostika. Metody. M.: Mir, 1999. pp. 496–506.
9. Pushkareva V.I., Velichko V.V., Kaminskaja A.A. // Zhurn. mikrobiol., jepidemiol., immunobiol. 2005. no. 3. pp. 39.
10. Shenderov B.A. Medicinskaja mikrobnaja jekologija: nekotorye itogi i perspektivy issledovaniy // Vestnik Rossijskoju akademii medicinskih nauk. 2005. no. 12. pp. 13–17.
11. 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. Vol. 16. pp. 287–293.
12. Differentiation of the various stages of *Blastocystis hominis* by acridine orange staining / K. Suresh, G.C. Ng, L.C. Ho, E.H. Yap // International Journal for Parasitology. 1994. Vol. 24. pp. 605–606.

### Рецензенты:

Слеварев С.М., д.б.н., профессор зав. кафедрой биологии и биоэкологии ФГБОУ ВПО «УлГУ», г. Ульяновск;

Артемьева Е.А., д.б.н., профессор кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «УлГУ» им. И.Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 26.11.2012.