

ИЗМЕНЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ СВОЙСТВ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ ЭНТЕРОКОККОВ В УСЛОВИЯХ МЕЖМИКРОБНЫХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ

¹Потатуркина-Нестерова Н.И., ²Немова И.С., ²Артамонова М.Н., ³Хромова Е.Б.,
⁴Хохлова О.Е., ⁵Трофимова Н.В., ⁴Теплякова О.В., ³Кочергина И.А.

¹ФГБОУ ВПО «Тольяттинский государственный университет», Тольятти, Россия (445667, г. Тольятти, Самарской обл., ул. Белорусская, 14), e-mail: potaturkinani@mail.ru

²ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, Россия (432700, г. Ульяновск, ул. Л. Толстого, 42)

³ФГБОУ ВПО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Россия (454001, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129), e-mail: Eb_sh@mail.ru, ira_kochergina@mail.ru

⁴ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого», Красноярск, Россия (660022, Красноярский край, г. Красноярск, улица Партизана Железняка, 1), e-mail: khokhlovaol@mail.ru, teplyakova-olga@yandex.ru

⁵ФГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, Челябинск, Россия (454092, г. Челябинск, ул. Воровского, 64), e-mail: tnvnatalya@mail.ru

У 168 обследованных женщин с воспалительными заболеваниями репродуктивной системы выделены штаммы *Mycoplasma hominis* и *Enterococcus faecalis*. Для выявления микроорганизмов и определения их генетических детерминант патогенности применяли молекулярно-генетический метод. Подбор праймеров и температуры отжига осуществляли при использовании пакета программ «Lasergene» (США). В исследовании выявлены изменения встречаемости генетических детерминант патогенности микросимбионта *E. faecalis*, выделенного из микробных консорциумов репродуктивного тракта женщин при наличии и отсутствии в них микоплазм. Установлено, что после сокультивирования энтерококков с микоплазмами различной вирулентности у энтерококков возрастает частота встречаемости пар праймеров *cylm* (токсигенность, цитолизин), *cpd* (бактерииоцигенность), *cps* (адгезия и колонизация) по сравнению с показателями, полученными до сокультивирования.

Ключевые слова: микробиоценоз, репродуктивный тракт, межмикробные взаимоотношения, микросимбионты, патогенный потенциал.

A MODIFICATION OF UROGENITAL ENTEROCOCCUS' VIRULENT PROPERTIES ON CONDITIONS OF INTERMICROBIAL INTERACTIONS

¹Potaturkina-Nesterova N.I., ²Nemova I.S., ²Artamonova M.N., ³Khromova E.B.,
⁴Khokhlova O.E., ⁵Trofimova N.V., ⁴Teplyakova O.V., ³Kochergina I.A.

¹Togliatti State University, Togliatti, Russia (445667, Togliatti, Samara region. St. Belarus, 14), e-mail: potaturkinani@mail.ru

²Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, Russia (432700, Ulyanovsk, str. Tolstoy, 42)

³Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia (454001, Chelyabinsk, str. Brat'ev Kashirinykh, 129), e-mail: Eb_sh@mail.ru, ira_kochergina@mail.ru

⁴Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russia (660022, Krasnoyarsk, St. Partizana Zheleznyaka, 1), e-mail: khokhlovaol@mail.ru, teplyakova-olga@yandex.ru

⁵Chelyabinsk State Medical Academy of the Ministry of Health and Social Development of Russia, Chelyabinsk, Russia (454092, Chelyabinsk, ul. Thieves, 64), e-mail: tnvnatalya@mail.ru

There have been isolated strains *Mycoplasma hominis* and *Enterococcus faecalis* at women (n=168) with inflammatory disease of reproductive tract. PCR was used to detect microorganisms and identification of its genetic determinants of pathogenicity. Primer design and annealing temperature were performed using a software package «Lasergene» (USA). The studies have been revealed changes in the occurrence of genetic determinants of pathogenicity microsymbiote *E. faecalis* isolated from microbial consortium of women's reproductive tract in the presence and in the absence of mycoplasma. It has been found out that microsymbiote *M. hominis* resulted in increase of frequency of occurrence of genes such as *cylm* (toxigenicity), *cpd* (bacterial cytogenicity) and *cps* (adhesion and colonization) among enterococcus after their joint cultivation.

Key words: microbiocenosis, reproductive tract, intermicrobial interactions, pathogenic potential.

Изучение симбиозов в настоящее время заняло одно из приоритетных мест в ряду актуальных проблем современной биологии. Микроорганизмы, населяющие репродуктивный тракт женщин, представляют собой пример ассоциативного симбиоза, включающего все компоненты: макросимбионт (человек), доминантный симбионт (лактобациллы) и ассоциативные симбионты (токсоны ассоциативных микроорганизмов) [3]. Исследования в области изучения ассоциативных симбиозов направлены на изучение взаимного влияния макросимбионта и доминантного микросимбионта, а также доминантного и ассоциативных микросимбионтов.

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 [1,2].

В связи с этим целью исследования явилось изучение вирулентных свойств урогенитальных энтерококков при взаимодействии с микоплазмами в условиях ассоциативного симбиоза репродуктивного тракта женщин.

В ходе выполнения работы обследовано 168 женщин с воспалительными заболеваниями, среди которых 75 пациенток были больны аднекситом (44,6 %), 53 – кольпитом (31,6 %) и 40 – эндоцервицитом (23,8 %). Группа сравнения составили 75 практически здоровых женщин, репрезентативных по возрасту.

Количественную и качественную оценку состава вагинального микроценоза производили бактериологическим методом в соответствии с Приказом МЗ СССР № 535 от 22.04.85 [4,5,6]. Для выявления микоплазм использовали прямой вариант МФА с контрастированием фона, культуральный метод и ПЦР. Подбор праймеров и температуры отжига осуществляли при использовании пакета программ «Lasergene» (США).

Используемые праймеры для *Enterococcus faecalis*: *Cylm* – 5' ACAGGGAGACTCTCATAGTCGCGG 3'; *Cpd* – 5' CGCGTGAAGAACAATGGCCGC 3'; *Cps* – 5' GGCATCGAAGCTAATGGGTGGGT 3' (табл. 1).

Таблица 1

Использованные в работе праймеры

Ген	Фактор патогенности	Пары праймеров: прямой/обратный	Размер ампликона н.п.
Праймеры энтерококков <i>Enterococcus faecalis</i>			
1	<i>Cylm</i> (токсигенность, цитоллизин),	5'ACAGGGAGACTCTCATAGTCGCGG 3' 5'CCCCGTGCCGGGGTGCCTGGACCTG 3'	296
2	<i>cpd</i>	5' CGCGTGAAGAACAATGGCCGC 3'	528

	(бактерии-оциогенность)	5'GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG 3' '	
3	<i>cps</i> (адгезия и колонизация)	5' GGCATCGAAGCTAATGGGGTGGGT 3' 5' GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAG G 3'	298

В результате исследования установлено, что из всех обследованных женщин энтерококки были выделены из влагалищного и цервикального биотопов у 46,6 % и 26,6 % здоровых и 85,1 % и 55,9 % больных соответственно. У больных женщин энтерококки обнаруживались почти в два раза чаще, чем у здоровых. Плотность микробного обсеменения (ПМО) *E. faecalis* при воспалительных заболеваниях увеличивалась во влагалище в 2,1 раза, а в цервикальном канале – в 3,4 раза. Штаммы *Mycoplasma hominis* были выделены у всех 168 женщин.

Изучение вирулентности клинических изолятов *E. faecalis* методом внутрибрюшинного заражения мышей показало, что из 237 штаммов энтерококков, выделенных у женщин с заболеваниями репродуктивной системы, только 187 (78,9 %) вызывали гибель животных, показатель LD₅₀ /lg этих штаммов варьировал от 3,6±0,1 до 5,7±0,6. В зависимости от величины показателя штаммы были разделены на три группы. LD₅₀/lg штаммов I группы (39 штаммов) составлял от 3,6±0,1 до 4,4±0,3; II группы – от 4,5±0,4 до 5,0±0,5 (97 штаммов) и III группы – от 5,1±0,7 до 5,7±0,6 (51 штамм).

Для оценки взаимного влияния микросимбионтов на их патогенный потенциал определяли гены, детерминирующие бактериоциногенность (*cpd*), адгезию (*cps*), а также токсигенность и цитолитическую активность (*cylm*) у штаммов *E. faecalis* (n=142), выделенных из ассоциаций с *M. hominis* различной степени вирулентности после их совместного культивирования, а также у энтерококков (n=87), выделенных из микробных консорциумов, где микоплазмы не являлись участником микробного сообщества. Исследования показали, что частота встречаемости гена *cpd* у штаммов *E. faecalis*, выделенных из ассоциации с микоплазмами, составила 57 %, изолированных без микоплазм – 36,7 %.

Таблица 1

Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей гена *cpd cylm*, *cps* у культуры *E. faecalis*

Штаммы <i>E. faecalis</i> , выделенные в ассоциации с микоплазмами:	Совместное культивирование	Частота встречаемости фрагмента <i>cpd</i> гена (%)	Частота встречаемости фрагмента ген <i>cps</i> гена (%)	Частота встречаемости фрагмента <i>cylm</i> гена (%)
авирулентными	до сокультивирования	3,4±0,2	4,1±0,6	6,8±0,8

(n=29)	после 3-х суток сокультивирования	3,8±0,5	4,9±0,8	7,3±0,3
умеренно вирулентными (n=76)	до сокультивирования	14,4±1,7	15,7 ±0,7	35,5±1,3
	после 3-х суток сокультивирования	19,7±2,7*	22,3 ±2,7*	46,7±1,7*
высоко вирулентными (n=37)	до сокультивирования	54,1±2,9	67,5±3,5	48,6±7,2
	после 3-х суток сокультивирования	86,5±3,5*	92,5±4,5*	78,3±6,4 *
Выделенные в виде монокультур	до сокультивирования	3,2±0,5	3,6±0,1	2,2±0,1
	после 3-х суток сокультивирования	3,7±0,7	3,9±0,7	3,1±0,2

Примечание: * – показатель достоверности различия между уровнем частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей гена *cpd* у культур *E. faecalis* до и после их сокультивирования с *M. hominis* ($p < 0,05$).

Тестирование *E. faecalis* после сокультивирования с авирулентными, с умеренновирулентными и высоковирулентными микоплазмами в течение трех суток выявило достоверное ($p < 0,05$) повышение частоты встречаемости искомым ампликонов у вирулентных штаммов (табл.1). В дальнейшие сроки исследования частота встречаемости изучаемых ампликонов не изменялась ($p > 0,05$).

В группе энтерококков, выделенных без микоплазм, частота встречаемости генетических детерминант *culm*, *cpd*, *cps* после совместного культивирования с микоплазмами достоверно не изменялась.

Таким образом, установлено, что после сокультивирования энтерококков с микоплазмами различной вирулентности возрастает частота встречаемости всех пар праймеров *culm* (токсигенность, цитолизин), *cpd* (бактериоциогенность), *cps* (адгезия и колонизация) по сравнению с показателями, полученными до сокультивирования, что приводило к формированию более выраженной патогенности штаммов энтерококков.

Работа выполнена при поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы (№14.В37.21.2010)

Список литературы

1. Бухарин О. В., Лобакова Е. С., Немцева Н. В., Черкасов С. В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
2. Бухарин О. В., Усвяцов Б. Я., Хлопко Ю. А. Медико-экологические аспекты микросимбиоза человека // Экология человека. – 2010. – № 8. – С.28-31.
3. Бухарин О. В., Лобакова Е. С., Перунова Н. Б. и др. Симбиоз и его роль в инфекции. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 300 с.

4. Евстигнеева Н. П. Выявляемость *U. urealyticum* методом ПЦР в зависимости от состояния микробиоценоза влагалища // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 10. – С. 3-7.
5. Наумкина Е. В., Рудаков Н. В., Пахалкова Е. В. Состояние микроценоза влагалища при урогенитальных инфекциях, вызванных условно-патогенными возбудителями // Омский научный вестник. – 2009. – № 1 (65). – С.37-41.
6. Прилепская В. Н., Быковская О. В. Уреаплазменная инфекция: клиника, диагностика, лечение // Генитальные инфекции. – 2006. – № 1. – С. 46 – 52.

Рецензенты:

Ильина Н. А., д.б.н., профессор кафедры зоологии, проректор по научной работе ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова», г. Ульяновск.

Нестеров А. С., д.м.н., профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней ФГБОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», г. Ульяновск.