

УДК 61

**ФАКТОРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ЭНТЕРОКОККОВ
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)****Миронова А.В.***Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток,
e-mail: anastasiamiro@mail.ru*

В течение многих лет энтерококки не рассматривались как клинически значимые возбудители инфекционной патологии [1,2,3]. Но все чаще их стали выделять из клинического материала при различных патологических состояниях. Просмотр этиологического значения энтерококков способствовал выявлению у них факторов патогенности, а именно: гемолитических, протеолитических, адгезивных свойств. Особое значение имеет способность энтерококков быстро приобретать и распространять устойчивость ко многим антимикробным препаратам [4, 5, 6]. Возникновение и распространение резистентности энтерококков вследствие селективного давления антибиотиков на нормальную микрофлору в процессе интенсивной, часто нерациональной, антибиотикотерапии является серьезной клинической и экологической проблемой [7, 8].

Ключевые слова: воспалительные заболевания органов малого таза, энтерококковая инфекция**VIRULENCE FACTORS OF ENTEROCOCCI (LITERATURE REVIEW)****Mironova A.V.***The Pacific State Medical University, Vladivostok, e-mail: anastasiamiro@mail.ru*

For many years enterococci were not considered as clinically significant causative agents of infectious pathologies [1, 2, 3]. However, they came to be detected in the clinical material of various pathological conditions in increasing frequency. The review of the aetiological significance of enterococci has allowed revealing such factors of their pathogenicity as haemolytic, proteolytic, and adhesion properties. The ability of enterococci to acquire tolerance to many antimicrobial drugs and spread it quickly is of particular importance [4, 5, 6]. The emergence and spread of antimicrobial resistance of enterococci, which appeared due to the selective impact of antibiotics on a normal micro flora in a course of intensive, and often irrational, antibiotic therapy, is a serious clinical and ecological problem [7, 8].

Keywords: inflammatory diseases of pelvic organs, enterococcal infection

В настоящее время установлено, что вирулентность микроорганизма регулируется генами, кодирующими вирулентность, находящимися в особых регионах генома, которые именуется островками патогенности (pathogenicity islands, PAI) [9]. PAI энтерококка были впервые идентифицированы в геноме мультирезистентного к антибиотикам штамма *E. faecalis* [MMH594], который был причиной вспышки внутрибольничной инфекции в 1980-х годах [10]. Размер гена энтерококка составляет около 150 Кб и кодирует до 129 открытых рамок считывания (ORF).

Поразительная особенность была выявлена путем сравнения последовательностей, составляющих PAI в штамме MMH594 между V583 и V586 [11]. Была обнаружена способность модулировать вирулентность организма путем селективного удаление конкретных островков патогенности. Сравнение между подвидами ванкомицин-резистентных энтерококков также выявило высокую степень идентичности последовательностей PAI за исключением присутствия или отсутствия отдельных элементов. Способность к изменениям подобного рода позволяет энтерококку перемещаться в различные биотопы хозяина, вызывая развитие патологического процесса [12]. Однако

такие способности – далеко не единственный фактор вирулентности энтерококков. Ряд исследований [13], [14], [15], [16], [17], [18], [19], [20] определили различные факторы вирулентности, наиболее важными из которых являются гемолизин, желатиназа, энтерококковый поверхностный белок (ESP), агрегативная субстанция (AS), Асе MSCRAMM, капсульные полисахариды и углеводы клеточной стенки бактерий, супероксид.

Гемолизин – цитолитический белок, способный лизировать эритроциты человека, лошади и кролика. Гемолизин продуцируют штаммы энтерококка, которые продемонстрировали высокую вирулентность в экспериментальных исследованиях у животных и в клинических условиях у человека [5, 21, 22], продукция гемолизина ассоциируется с повышением тяжести инфекционного процесса [23]. Гемолизин выявляется при посеве энтерококка на питательный агар на основе бульона из говяжьего сердца с добавлением 5% крови лошади. Чашки Петри инкубируются в CO² камере при температуре в 37 °С с контролем через 24 и 48 часов. Четкая зона гемолиза вокруг колоний микроорганизмов позволяет говорить о наличии гемолизина [24].

Экспрессия гемолизина или цитолизина определяется двухкомпонентной регулирующей системой через кворум-чувствительный механизм [19].

Желатиназа – протеаза, продуцируемая энтерококками, которая способна гидролизовать желатин, коллаген, казеин, гемоглобин и другие пептиды [25]. Было показано, что желатиназа, продуцируемая штаммами *E. faecalis*, отвечает за вирулентность микроорганизма при экспериментальном эндокардите у животных [26]. Способность продуцировать желатиназу в лабораторных условиях может быть выявлена при посеве энтерококков на среду из свежеприготовленного пептон-дрожжевого экстракт-агара, содержащего желатиновые пластинки. Чашки Петри инкубируют при 37°C в течение ночи, затем охлаждают до комнатной температуры в течение двух часов. Наличие зон гало вокруг колоний свидетельствует о положительном результате [24, 27].

Энтерококковый поверхностный белок (Enterococcal surface protein [ESP] – это связанный с клеточной стенкой микроорганизма протеин, чаще обнаруживаемый у штаммов, перешедших в патогенную форму, чем у сапрофитных энтерококков (18). ПЦР амплификация гена ESP может быть выполнена при помощи праймеров ESP11 (5'-TTGСТААТGСТАGТССАСGACC-3') и Esp 12 (5'-GCGTCAACTTGСAТTGCCGAA-3'), которые соответствуют нуклеотидным позициям 1217-1238 и 2149-2171 соответственно, внутри N-терминала Esp (24). Микст для ПЦР реакции состоит из 250 нг DNA; по 0.2 μL dATP [2'-диоксиаденозин 5'-трифосфат], dCTP [2'-диоксцитозин 5'-трифосфат], dGTP [2'-диоксигуанозин 5'-трифосфат], and dTTP [2'-диокситимидин 5'-трифосфат]; 2.5 mM MgCl₂; и 2.5 U AmpliTaq DNA полимеразы в 1 x реакционном буфере (24).

Образцы проходят инициальную денатурацию при 95°C в течение двух минут и подвергаются 30 циклам денатурации [94°C в течение 45 с], отжига [63°C в течение 45 секунд] и расширения [72°C в течение одного мин]. Пять микролитров амплификационной смеси должны быть смешаны с загрузочным буфером геля и подвергали электрофорезу в один процент агарозном геле. Продукты реакции могут быть визуализированы с помощью окрашивания бромидом этидия. ДНК из культуры *E. faecalis* MMH594 и FA2-2 может быть использован в качестве положительного и отрицательного контролей соответственно для гена ESP [24].

Показано, что ESP увеличивает антибиотико-резистентность *E. faecalis* в мочевом

пузыре при экспериментальных инфекциях мочевыводящих путей. Для исследования были взяты ESP положительный штамм *E. faecalis* и изогенный ESP-дефицитный мутантный штамм. В ходе исследования, группы мышей заражали трансуретрально в дозе 100000 CFU ESP содержащего и контрольного штамма. Через 5 дней бактерии были подсчитаны в моче, мочевом пузыре и почках. У экспериментальных мышей, зараженных штаммом *E. Faecalis*, содержащим ESP, обнаружено достоверно большее число бактерий. Сделан вывод о том, что ESP способствует фиксации *E. Faecalis* к эпителию мочевого пузыря [28].

Агрегативная субстанция (AS) является феромон индуцируемым поверхностным белком *E. Faecalis*, который способствует образованию агрегатов спаривания во время конъюгации бактерий [29]. AS является медиатором эффективного энтерококкового контакта донор-реципиент для осуществления трансфера плазмиды. В естественных условиях, AS может участвовать в патогенезе энтерококковой инфекции посредством ряда механизмов [30]. К различным функциям, приписываемым AS, в дополнение к продвижению межклеточного контакта, является адгезия к клеткам-хозяевам, включая адгезию к белкам внеклеточного матрикса белков и увеличение гидрофобных свойств поверхности клетки. Было установлено, что энтерококки, обладающие AS, значительно более резистентны к фагоцитозу, чем изогенные AS-отрицательные штаммы, в связи с угнетающим воздействием на дыхательный обмен (производство активных форм кислорода) в макрофагах [31, 33].

«Ace» – это коллаген, связывающий MSCRAMM (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule) что можно перевести, как микробные поверхностные компоненты, распознающие адгезивные молекулы матрикса. Этот фактор вирулентности присутствует как у сапрофитных, так и патогенных штаммах энтерококков [34, 35]. При энтерококковой инфекции у человека производятся антитела к Ace, которые блокируют адгезию протеинам экстрацеллюлярного матрикса in vitro [16, 36]. Этот компонент вирулентности выделен в 90% наблюдений при эндокардите энтерококковой этиологии, что подтверждает его экспрессию in vivo. Аналог Ace, обозначенный как Асм, выделен в культуре *E. Faecium* [37].

Капсульные полисахариды и углеводы клеточной стенки бактерий. Оперон, кодирующий синтез капсулярного полисахарида наиболее часто обнаруживается у патогенных вариантов *E. faecalis* [38]. Была определена химическая фор-

мула второго вида капсулярного полисахарида, находящегося на поверхности как *E. Faecalis*, так и *E. Faecium* [39]. В экспериментальном исследовании, проведенном на инфицированных энтерококками мышах, были показаны защитные свойства антител, вырабатываемых против очищенной углеводной фракции клеточной стенки энтерококков. Высказано предположение о возможном использовании данных антител для профилактики энтерококковых инфекций [40]. Очищенная углеводная фракция клеточной стенки состоит из глицерола фосфата, глюкозы и остатков галактозы [40].

Внеклеточный супероксид. Изолированные от кровотока *E. faecalis* обладают способностями производить супероксид [41]. Производство супероксида, наблюдаемое при смешанных инфекциях с *Bacteroides fragilis* подкожной локализации, целесообразно для повышения выживаемости микроорганизма [42].

Заключение

Энтерококки, которые считались безобидными сапрофитными микроорганизмами, проживающими в кишечнике, в последние десятилетия явились причинами тяжелых инфекционных процессов различной локализации, отличаясь широкой антибиотикорезистентностью и выраженной вирулентностью. Проведенные исследования выявили многочисленные островки патогенности (РАИ) и генетические различия между сапрофитными и патогенными штаммами энтерококков, обладающих генами, кодирующими продукцию агрессивных протеинов различного вида (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

Необходимо проведение дальнейших исследований для выяснения механизмов клеточного и молекулярного взаимодействия энтерококков с клетками хозяина, ведущего к формированию высоко вирулентных форм энтерококков.

Список литературы

- Schaberg D.R., Culver D.H., Gaynes R.P. Major trends in microbial aetiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991;91:72s-5s.
- Mollering R.C. Jr. Emergence of *Enterococcus* as significant pathogen. *Clin Infect Dis* 1992;14:1173-8.
- Murray B.E. The life and times of *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 1990;3:45-65.
- Tendulkar P.M., Baghdayan A.S., Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: New developments in the 21 st Century. *Cell Mole Life Sci* 2003;60:2622-36.
- Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B. Haemolysin of *Streptococcus faecalis* subspecies *zymogenes* contributes to virulence in mice. *Infect Immun* 1984;45:528-30.
- Pearson H. 'Superbug' hurdles key drug barrier. *Nature* 2002;418:469.
- Marion A.K., Rose A.D., Timothy F.J., Bryan P.S., Kelly M., Susan C. et al. Response to emerging infection leading

to outbreak of Linezolid-resistant *Enterococci*. *Emerg Infect Dis* 2007;13:1024-30.

8. Paulson I.T., Banerjee L., Myers G.S., Nelson K.E., Seshadri R., Read T.D., et al. Role of mobile DNA in the evolution of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003;299:2071-4.

9. Hacker J., Kaper J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:641-79.

10. Huycke M.M., Spiegel C.A., Gilmore M.S. Bacteremia caused by haemolytic high level gentamycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1626-34.

11. Sahn D.F., Kissinger J., Gilmore M.S., Murray P.R., Mulder R., Solliday J., et al. Invitro susceptibility studies of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1588-91.

12. Shankar N., Baghdayan A.S., Gilmore M.S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in Vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 2002;417:746-50.

13. Hancock L.E., Gilmore M.S. Pathogenicity of *Enterococci*: In gram positive pathogens. *Am Soc Microbiol* 2000;251-8.

14. Garsin A.D., Sifri C.D., Mylonakis E., Qin X., Singh K.V., Murray B.E., et al. A simple model host for identifying gram positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:10892-7.

15. Jett B.D., Huycke M.M., Gilmore M.S. Virulence of *Enterococci*. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:462-78.

16. Nallapareddy S.R., Qin X., Weinstock G.M., Hook M., Murray B.E. *Enterococcus faecalis* adhesion, Ace mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen Type I. *Infect Immun* 2000;68:5218-24.

17. Sartingen S., Rozdzinski E., Muscholl-Silberhorn A. Aggregation substances increases adherence and internalization but not translocation of *Enterococcus faecalis* through different intestinal epithelial cells invitro. *Infect Immun* 2000;68:6044-7.

18. Shankar V., Baghdayan A.S., Huycke M.M., Lendahl G., Gilmore M.S. Infection derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect Immun* 1999;67:193-200.

19. Hass W., Shepard B.D., Gilmore M.S. Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* 2002;415:84-7.

20. Huycke M.M., Abrams V., Moore D.R. *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* 2002;23:529-6.

21. Chow J.W., Thal L.A., Perri M.B., Vazquez J.A., Donabedian S.M., Clewell D.B., et al. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental *Enterococcal* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2474-7.

22. Ike Y., Hashimoto H., Clewell D.B. High incidence of hemolysin production by *Enterococcus (Streptococcus) faecalis* strains associated with human parenteral infections. *J Clin Microbiol* 1987;25:1524-8.

23. Johnson A.P. The pathogenicity of *Enterococci*. *J Antimicrob Chemother* 1994;33:1083-9.

24. Vergis E.N., Nathan S., Joseph W.C., Hayden M.K., Syndman D.R., Zervos, et al. Association between the presence of *Enterococcal* virulence factors gelatinase, haemolysin and enterococcal surface protein and mortality among patients with bacteremia due to *Enterococcus faecalis*. *Clin Infect Dis* 2002;35:570-5.

25. Kreft B., Marre R., Schramm U., Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect Immun* 1992;60:25-30.

26. Gutschik E., Moller S., Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits, 3: Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1979;87:353-62.

27. Peng H.L., Novick R.P., Kreiswirth B., Kornblum J., Schlievert P. Cloning, characterization and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1988;170:4365-72.
28. Shankar N., Lockatell C.V., Baghdayan A.S., Drachenberg C., Gilmore M.S., Johnson D.E. Role of *Enterococcus faecalis* surface protein *Esp* in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 2001;69:4366-72.
29. Clewell D.B. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 1993;73:9-12.
30. Mundy L.M., Sahn D.F., Gilmore M.S. Relationship between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *J Clin Microbiol* 2000;13:513-22.
31. Sussmuth S.D., Muscholl-Silberhorn A., Wirth R., Susa M., Marre R., Rozdzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infect Immun* 2000;68:4900-6.
32. McCormick J.K., Hirt H., Waters C.M., Tripp T.J., Dunny G.M., Schlievert P.M. Antibodies to a surface-exposed, N-terminal domain of aggregation substance are not protective in the rabbit model of *Enterococcus faecalis* infective endocarditis. *Infect Immun* 2001;69:3305-14.
33. Vanek N.N., Simon S.I., Jacques-Palaz K., Mariscalco M.M., Dunny G.M., Rakita R.M. *Enterococcus faecalis* aggregation substance promotes opsonin-independent binding to human neutrophils via a complement receptor type 3-mediated mechanism. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26:49-60.
34. Rich R.L., Kreikemeyer B., Owens R.T., LaBrenz S., Narayana S.V., Weinstock G.M., et al. *Ace* is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* 1999;274:26939-45.
35. Duh R.W., Singh K.V., Malathum K., Murray B.E. In vitro activity of 19 antimicrobial agents against *Enterococci* from healthy subjects and hospitalized patients and use of an *ace* gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb Drug Resist* 2001;7:39-46.
36. Nallapareddy S.R., Singh K.V., Duh R.W., Weinstock G.M., Murray B.E. Diversity of *ace*, a gene encoding a microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules, from different strains of *Enterococcus faecalis* and evidence for production of *ace* during human infections. *Infect Immun* 2000;68:5210-7.
37. Nallapareddy S.R., Weinstock G.M., Murray B.E. Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by *Acm*, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 2003;47:1733-47. [PUBMED] [FULLTEXT].
38. Hancock L.E., Gilmore M.S. The capsular polysaccharide of *Enterococcus faecalis* and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. *Proc Natl Acad Sci* 2002;99:1574-9.
39. Huebner J., Wang Y., Krueger W.A., Madoff L.C., Martirosian G., Boisot S., et al. Isolation and chemical characterization of a capsular polysaccharide antigen shared by clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 1999;67:1213-9.
40. Huebner J., Quaas A., Krueger W.A., Goldmann D.A., Pier G.B. Prophylactic and therapeutic efficacy of antibodies to a capsular polysaccharide shared among Vancomycin-sensitive and -resistant enterococci. *Infect Immun* 2000;68:4631-6.
41. Huycke M.M., Moore D., Joyce W., Wise P., Shepard L., Kotake Y., et al. Extracellular superoxide production by *Enterococcus faecalis* requires Demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. *Mol Microbiol* 2001;42:729-40.
42. Huycke M.M., Gilmore M.S. In vivo survival of *Enterococcus faecalis* is enhanced by extracellular superoxide production. *Adv Exp Med Bio* 1997;418:781-4. [PUBMED] [FULLTEXT].