

ment of the postoperative period. A Letter of the MH RF of May 6. – 2014. – № 15-4/10/2-3190.

5. Shifman E.M., Kulikov A.V., Krugova L.V., Vartanov V.Ya., Marshalov D.V. Safety of uterotonics: what should an anesthesiologist know about them? // Anesthesiology and Reanimatology. – 2017. – Vol. 62(3). – P. 220-224.

6. Gallos I.D., Williams H.M., Price M.J., Merriel A., Gee H., Lissauer D., Moorthy V., Tobias A., Deeks J.J., Widmer M., Tunçalp Ö., Gülmezoglu A.M., Hofmeyr G.J., Coomarasamy A. Uterotonic agents for preventing postpartum haemorrhage: a network meta-analysis // Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2018. – Issue 4. Art. No.: CD011689. DOI:10.1002/14651858.CD011689.pub2.

7. Gizzo S., Patrelli T.S., DiGangi S., Carozzini M., Saccardi C., Zambon A., Bertocco A., Fagherazzi S., D'Antona D., Nardelli G.B. Which Uterotonic Is Better to Prevent the Postpartum Hemorrhage? Latest News in Terms of Clinical Efficacy, Side Effects, and Contraindications // Reprod Sci. – 2013. – № 20 (9). – P. 1011-1019.

8. Jonsson M., Hanson U., Lidell C. ST depression at caesarean section and the relation to oxytocin dose. A randomised controlled trial // Br. J. Obstet. Gynaecol. – 2010. – № 117. – № 76-83.

9. Kovacheva V.P., Soens M.A., Tsen L.C. A randomized, double-blinded trial of a «rule of threes» algorithm

versus continuous infusion of oxytocin during elective caesarean delivery // Anesth. – 2015. – № 123. – № 92-100.

10. Martinez-Quintana E., Rodriguez-Gonzalez F. Pregnancy and coronary artery dissection // Clin. Invest. Arterioscler. – 2015. – № 27 (4). – P. 215-219.

11. Pinder A.J., Dresner M., Calow C., Shorten G.D., O Riordan J., Johnson R. Haemodynamic changes caused by oxytocin during caesarean section under spinal anaesthesia // Int. J. Obstet. Anaesth. – 2002. – № 11. – P. 156-9.

12. Snegovskikh D., Clebone A., Norwitz E. Anesthetic management of patients with placenta accreta and resuscitation strategies for associated massive hemorrhage // Curr Opin Anaesthesiol. – 2011. – № 24. – P. 274-281.

13. Thomas J.S., Koh S.H., Copper G.M. Haemodynamic effects of oxytocin given as i.v. bolus or infusion on women undergoing Caesarean section // Br. J. Anaesth. – 2007. – № 98. – P. 116-119.

14. Vallera C., Choi L.O., Cha C.M., Hong R.W. Uterotonic Medications Oxytocin, Methylergonovine, Carboprost, Misoprostol // Anesthesiology Clin. – 2017. – № 35. – P. 207-219.

15. Vercauteren M., Palit S., Soetens F., Jacquemun Y., Alahuhta S. Anaesthesiological considerations on tocolytic and uterotonic therapy in obstetrics // Acta anaesth. Scand. – 2009. – № 53. – P. 701-709.

Координаты для связи с авторами: Дегтярев Евгений Николаевич – врач отделения анестезиологии и реанимации акушерского стационара Амурского областного перинатального центра, аспирант кафедры акушерства и гинекологии ФПДО АмГМА, тел. +7-924-675-10-15, e-mail: dormicumtrade@gmail.com; Шифман Ефим Мунович – д-р мед. наук, президент Ассоциации акушерских анестезиологов-реаниматологов, профессор кафедры анестезиологии и реаниматологии ФУВ ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, заслуженный врач Республики Карелия, эксперт по анестезиологии и реаниматологии Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения, член Президиума ФАР, член редколлегии журнала «Анестезиология и реаниматология»; Жуковец Ирина Валентиновна – д-р мед. наук, зав. кафедрой акушерства и гинекологии ФПДО АмГМА; Ходус Сергей Васильевич – канд. мед. наук, зав. кафедрой анестезиологии, реанимации, интенсивной терапии и скорой медицинской помощи АмГМА.



УДК 579.61

Т.С. Коменкова¹, Е.А. Зайцева¹, Н.В. Стрельникова^{2,3}

ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЖЕЛАТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ У КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет, 690002, пр-т Острякова, 2,
тел. 8-(423)-245-17-06, e-mail: vgti.nauka@mail.ru, г. Владивосток;

²Дальневосточный государственный медицинский университет, 680000, ул. Муравьева-Амурского, 35,
тел. 8-(4212)-76-13-96, e-mail: nauka@mail.fesmu.ru;

³Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.И. Сергеева, 680009, ул. Краснодарская, 9,
тел. 8-(4212)-39-04-05, e-mail: kkb1@dvtc.khv.ru, г. Хабаровск

Резюме

В последнее десятилетие возросла этиологическая роль бактерий рода *Enterococcus*. Известно, что тяжесть системных заболеваний обуславливает наличие гена *gelE*, кодирующей синтез желатиназы. Установлено, что штаммы *E. faecalis*, продуцирующие данный фермент, более вирулентны.

В работе проанализированы фенотипические особенности и генетическое разнообразие желатиназной активности у клинических изолятов *Enterococcus faecalis*, выделенных в дальневосточном регионе России. Отмечена фенотипическая и генетическая вариабельность желатиназной активности среди клинически значимых *E. faecalis*. Ген *gelE*, детектировался у 74,5±6,1 % *E. faecalis*, выделенных в Приморском и Хабаровском краях. Однако *in vitro* разжижение желатины наблюдалось только у 30,2±7,1 % изучаемых энтерококков. Выявлено большое количество *E. faecalis* с «молчащим» геном *gelE*, что требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, *gelE*, желатиназная активность.

T.S. Komenkova¹, E.A. Zaitseva¹, N.V. Strelnikova²

PHENOTYPIC AND GENETIC CHARACTERISTICS OF GELATINASE ACTIVITY IN CLINICALLY RELEVANT *ENTEROCOCCUS FAECALIS* IN THE FAR EAST OF RUSSIA

¹Pacific state medical university, Vladivostok;

²Far Eastern state medical university;

³Regional clinical hospital № 1 of Khabarovsk Region Health Ministry, Khabarovsk

Summary

The etiological role of the genus *Enterococcus* has increased in the last decade. It is known that the severity of systemic diseases is associated with gelatinase activity encoded by *gelE* gene. It has been revealed that gelatinase-producing *E. faecalis* are more virulent.

In the present study the phenotypic features and genetic diversity of gelatinase activity of *E. faecalis* clinical isolates in the Far East of Russia were analyzed. It has been described that clinically relevant *E. faecalis* have phenotypic and genetic variability of gelatinase activity. Presence of *gelE* gene was detected in 74,5±6,1 % of *E. faecalis*. However, *in vitro* liquefaction of gelatin was observed only in 30,2±7,1 % of studied enterococci.

A large number of *E. faecalis* with a «silent» *gelE* gene has been identified. It requires further study.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *gelE*, gelatinase activity.

В последнее десятилетие возросла этиологическая роль бактерий рода *Enterococcus* [10, 13]. Колонизируясь на слизистых оболочках полости рта, кишечника, коже, периуретральной области, обладая особой тропностью к почечной ткани, они могут вызывать эндокардит, инфекции кожи и мягких тканей, мочеполовой системы, остеомиелит, катетер-ассоциированные инфекции и др. [5, 6, 11, 12, 13].

В настоящее время идентифицированы разнообразные факторы вирулентности энтерококков, наиболее важными из которых являются гемолизин (Cyl), желатиназа (GelE), энтерококковый поверхностный белок (Esp), субстанция агрегации (As), адгезин коллагена (Ace), сериновая протеаза (SprE) и т. д. [1, 5, 7, 8, 13].

Желатиназа (цинк-зависимая металлопротеиназа), опосредуемая геном *gelE*, ответственна за гидролиз гемоглобина, желатина, коллагена и других белков [1]. Известно, что экспрессия гена *gelE* обуславливает тяжесть системных заболеваний, способствует образованию биопленок и очищает поверхность клеток от мутантных белков [1, 5, 11, 13]. Установлено, что штаммы *E. faecalis*, продуцирующие данный фермент, более вирулентны [5]. В тоже время роль гена *gelE* *E. faecalis* до конца не выяснена.

Цель исследования – оценить фенотипическое и генетическое разнообразие желатиназной активности у клинически значимых *E. faecalis*, выделенных в Дальневосточном регионе России.

Материалы и методы

В работе исследованы *E. faecalis* (n=51), изолированные из клинического материала – мочи (n=40), цервикального канала (n=2), уретры (n=1), секрета простаты (n=2), мокроты (n=2), бронхоальвеолярного лаважа (n=1), хирургической раны (n=3) – пациентов в Приморском и Хабаровском краях. В качестве референс-штамма использовали *E. faecalis* NCTC 12697.

Биологические свойства энтерококков изучали классическим бактериологическим методом. Желатиназную активность определяли с использованием коммерческого набора Микро-ЖЕЛАТИНАЗА-НИЦФ (Санкт-Петербург, Россия), ферментацию молока – на среде Эйкмана.

Бактериальную ДНК энтерококков выделяли кипячением (Т. Маниатис, 1984). Детекцию гена *gelE* у *E. faecalis* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяя систему праймеров – 5'ACCCGATCATTTGGTTT3' и 5'ACGCATTGCTTTTCCATC3' (размер продукта 419 п.н.) (Soares R.O., et al., 2014), синтезированную компанией «Евроген» (Россия). Реакционная смесь

(20 мкл) включала 10x Taq buffer (2 мкл), 25 mM MgCl₂ (1,6 мкл), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты (0,8 мкл), специфические праймеры (по 0,4 мкл), Taq DNA – полимеразу (0,8 мкл) (Евроген, Россия), бактериальный лизат (1 мкл).

ПЦР проводили на амплификаторе TProfessional 96 (Biometra, Германия) по протоколу: 1 цикл – 94 °С, 5 мин.; далее 30 циклов в режимах 94 °С – 45 с; 56°С – 1 мин.; 72 °С – 1 мин.; финальное удлинение 72 °С – 3 мин.

Продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в ультрафиолетовом свете с помощью Bio Doc Analyze (Biometra, Германия).

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 10. Средние значения в группах сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и t-критерия Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

В исследованиях проведенными нами ранее были изучены фенотипические проявления биологических свойств фекальных энтерококков, выделенных из клинического материала, оценены особенности протеолитической активности *E. faecalis* [3]. Установлено, что более половины исследуемых энтерококков (53,5±7,6 %) показали *in vitro* протеолитическую активность. При этом ферментировали и молоко и желатину 30,2±7,1 % исследуемых культур, только молоко – 23,3±6,4 % *E. faecalis*. Энтерококков, обладающих только желатиназной активностью, в исследуемой коллекции не было.

В связи с выявленной фенотипической неоднородностью протеолитической активности *E. faecalis* мы обратились к молекулярно-генетическим методам исследования. С помощью ПЦР был проведен анализ энтерококков на наличие гена *gelE*, кодирующего синтез желатиназы.

Ген *gelE*, детектировался у 74,5±6,1 % *E. faecalis*, выделенных в Приморском и Хабаровском краях (таблица). Однако *in vitro* разжижение желатины наблюдалось только у трети изучаемых культур (рисунок). Такое не соответствие фенотипического проявления желатиназной активности с наличием гена *gelE* у энтерококков также отмечалось в других независимых исследованиях [2, 4, 7, 8, 9, 11]. Например, в работах Saffari F. (2017) и Strzelecki Y. (2011) ген *gelE* выявлялся у 72 % и 91 % энтерококков, тогда как желатиназная активность обнаружена только у 34 % и 53 % культур соответственно [7, 11]. В исследовании Semedo T. (2003) при оценке энтерококков, выделенных из клинического материала и пищевых продуктов, ген *gelE* был «молчащим» у большинства исследованных штаммов, однако желатиназная активность регистрировалась преимущественно у клинических изолятов [8]. Многие ученые связывают такие особенности с отсутствием экспрессии гена и/или мутацией в *gelE* или в регуляторных генах *fsrA*, *fsrB*, *fsrD*, *fsrC*, активирующих синтез желатиназы [7, 11].

Методом корреляционного анализа была выявлена достоверная положительная связь между наличием гена *gelE* и желатиназной активностью у исследован-

ных энтерококков, выделенных в дальневосточном регионе России ($r_p=0,40$; $p=0,01$). В тоже время в литературе есть сведения об отсутствии прямой зависимости между этими признаками [1]. Тем не менее, установленная в данной работе связь показывает необходимость определять желатиназную активность *in vitro* для оценки клинической значимости штаммов энтерококков, и согласуется с исследованиями Мироненко Л.Г. и соавт. (2013) [4]. Полученные нами результаты открывают перспективу дальнейших исследований в этом направлении.

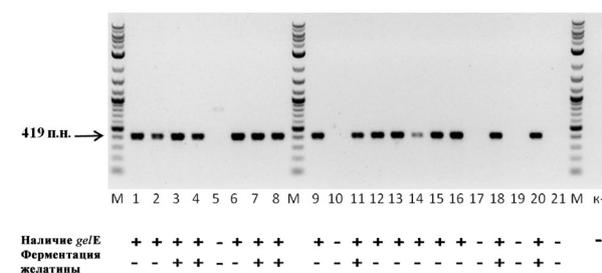


Рис. Наличие гена *gelE* и желатиназной активности у *E. faecalis*

Примечание. М – маркер молекулярного веса (GeneRuler 1kb DNA Ladder, Thermo Scientific, США); 1-21 – клинические штаммы *E. faecalis*, 5 – *E. faecium*, к – отрицательный контроль.

Таблица

Наличие протеолитической активности и гена *gelE* у культур энтерококков, выделенных в Приморском и Хабаровском краях

Место выделенных культур	Кол-во исследованных культур	Ферментация		Кол-во исследованных культур	Наличие гена <i>gelE</i>
		желатины	молока		
		абс. (P±m _p , %)	абс. (P±m _p , %)		
Приморский край	36	9 (25,0±7,2)	19 (52,8±8,3)	44	32 (72,7±6,7)
Хабаровский край	7	4	4	7	6
Всего	43	13 (30,2±7,1)	23 (53,5±7,6)	51	38 (74,5±6,1)

Выводы

1. Более половины (52,8±8,3 %) *E. faecalis*, выделенных из клинического материала на Дальнем Востоке России, обладают протеолитической активностью, при этом *in vitro* разжижение желатины встречалось у 30,2±7,1 % исследованных энтерококков.

2. Отмечена фенотипическая и генетическая вариабельность желатиназной активности среди клинически значимых *E. faecalis*, выделенных в Дальневосточном регионе России.

3. Выявлено большое количество (30,2±7,1 %) *E. faecalis* с «молчащим» геном *gelE*.

Литература

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков: монография // Екатеринбург: УрО РАН, 2012. – 227 с.
2. Вальшева И.В., Потехина Л.П., Пошвина Д.В., Щепитова Н.Е., Сычева М.В. Характеристика желатиназной активности энтерококков на фенотипическом и генетическом уровне // Материалы 2-й научно-практической школы-семинара. Тольяттинский государственный университет. – То-

льятти: Издательство: SIMJET (Ульяновск), 2012. – С. 197-202.
3. Зайцева Е.А., Крукович Е.В., Мельникова Е.А., Лучанинова В.Н., Коменкова Т.С., Вайсеро Н.С. Роль факторов патогенности *Enterococcus faecalis* в развитии пиелонефрита у детей // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2017. – № 2. – С. 58-61.
4. Мироненко Л.Г., Перетягко Е.Г. Изучение желатиназной активности на генетическом и фенотипи-

ческом уровне у *Enterococcus*, выделенных из разных экоотопов // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Т. 1, № 4. – С. 239-242.

5. Gilmore M.S., Clewell D.B., Yasuyoshi I., Shankar N. Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection // Massachusetts eye and ear infirmary Boston. – 2014. – 668 p.

6. Kafil H.S., Mobarez A.M. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles // Journal of King Saud University – Science. – 2015. – 6 p.

7. Saffari F., Dalfardi M.S., Mansouri S., Ahmadrajab R. Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates // Infect Chemother. – 2017. – Vol. 49, № 3. – P. 176-183.

8. Semedo T., Santos M.A., Lopes M.F., Figueiredo M.J., Barreto C.M.T., Tenreiro R. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? // Syst Appl Microbiol. – 2003. – Vol. 26, № 1. – P. 13-22.

9. Simonova P.M., Laukova A. Virulence factors genes possessing *Enterococcus faecalis* strains from

rabbits and their sensitivity to enterocins // World Rabbit Science. – 2017. – № 25. – P. 63-71.

10. Soares R.O., Fedi A.C., Reiter K.C., Caierão J., d'Azevedo P.A. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates // Virulence. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 634-637.

11. Strzelecki Y., Hryniewicz W., Sadowy E. Gelatinase-Associated Phenotypes and Genotypes Among Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland // Polish Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 60, № 4. – P. 287-292.

12. Toru M., Beyene G., Kassa T., Gizachew Z., Howe R., Yeshitila B. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* species isolated from clinical samples of pediatric patients in Jimma University specialized Hospital, south west Ethiopia // BMC Res Notes. – 2018. – Vol. 11, № 281. – 6 p.

13. Upadhyaya G.P.M., Ravikumar K.L., Umaphathy B.L. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen // Indian J Med Microbiol. – 2009. – Vol. 27. – P. 301-305.

Literature

1. Bukharin O.V., Valyshev A.V. Biology and ecology of enterococci: monograph. – Yekaterinburg: UrB RAS, 2012. – 227 p.

2. Valysheva I.V., Potekhina L.P., Poshvina D.V., Shchepitova N.E., Sychova M.V. Characteristics of gelatinase activity of enterococci at the phenotypic and genetic level // Proceedings of the 2-nd scientific and Practical School-Seminar. Togliatti State University. – Togliatti: PH «SIMJET» (Ulyanovsk), 2012. – P. 197-202.

3. Zaytseva E.A., Krukovich E.V., Melnikova E.A., Luchaninova V.N., Komenkova T.S., Vaysero N.S. The role of pathogenicity factors of *Enterococcus faecalis* in the development of pyelonephritis in children // Pacific Medical Journal. – 2017. – № 2. – P. 58-61.

4. Mironenko L.G., Peretyatko E.G. The study of gelatinase activity at the genetic and phenotypic level in *Enterococcus* isolated from different ecotopes // Journal of Medical and Biological Problems. – 2013. – Vol. 1, № 4. – P. 239-242.

5. Gilmore M.S., Clewell D.B., Yasuyoshi I., Shankar N. Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection // Massachusetts eye and ear infirmary Boston. – 2014. – 668 p.

6. Kafil H.S., Mobarez A.M. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles // Journal of King Saud University – Science. – 2015. – 6 p.

7. Saffari F., Dalfardi M.S., Mansouri S., Ahmadrajab R. Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic

and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates // Infect Chemother. – 2017. – Vol. 49, № 3. – P. 176-183.

8. Semedo T., Santos M.A., Lopes M.F., Figueiredo M.J., Barreto C.M.T., Tenreiro R. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? // Syst Appl Microbiol. – 2003. – Vol. 26, № 1. – P. 13-22.

9. Simonova P.M., Laukova A. Virulence factors genes possessing *Enterococcus faecalis* strains from rabbits and their sensitivity to enterocins // World Rabbit Science. – 2017. – № 25. – P. 63-71.

10. Soares R.O., Fedi A.C., Reiter K.C., Caierão J., d'Azevedo P.A. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates // Virulence. – 2014. – Vol. 5, № 5. – P. 634-637.

11. Strzelecki Y., Hryniewicz W., Sadowy E. Gelatinase-Associated Phenotypes and Genotypes Among Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis* in Poland // Polish Journal of Microbiology. – 2011. – Vol. 60, № 4. – P. 287-292.

12. Toru M., Beyene G., Kassa T., Gizachew Z., Howe R., Yeshitila B. Prevalence and phenotypic characterization of *Enterococcus* species isolated from clinical samples of pediatric patients in Jimma University specialized Hospital, south west Ethiopia // BMC Res Notes. – 2018. – Vol. 11, № 281. – 6 p.

13. Upadhyaya G.P.M., Ravikumar K.L., Umaphathy B.L. Review of virulence factors of enterococcus: An emerging nosocomial pathogen // Indian J Med Microbiol. – 2009. – Vol. 27. – P. 301-305.

Координаты для связи с авторами: Коменкова Татьяна Сергеевна – аспирант ФГБОУ ВО «Тихоокеанского государственного медицинского университета» Минздрава России, тел. +7-914-661-98-01, e-mail: atstl@mail.ru; Зайцева Елена Александровна – д-р мед. наук, доцент, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Тихоокеанского государственного медицинского университета» Минздрава России, тел. +7-902-524-57-20, e-mail: elza200707@mail.ru; Стрельникова Наталья Викторовна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Дальневосточный государственный медицинский университет», зав. бактериологической лабораторией КГБУЗ «ККБ № 1», врач высшей квалификационной категории по специальности «Бактериология», тел.+7-924-925-89-85, e-mail: jpdom@mail.ru.