

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ ФОН STAPHYLOCOCCUS AUREUS ПРИ СИМБИОТИЧЕСКОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ПРОТИСТАМИ BLASTOCYSTIS SPP

GENOTYPICAL BACKGROUND OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN SYMBIOTIC INTERACTION WITH BLASTOCYSTIS SPP

**N. Bugero
N. Ilyina**

Summary. In recent years, cases of staphylococcal diseases have become more frequent. First, this is due to the high adaptability of staphylococcus to antibiotics and increasing of antibiotic-resistant strains of bacteria. The presence of a whole spectrum of various pathogenic factors in bacteria belonging to the genus Staphylococcus, including Staphylococcus aureus, allows them to easily cause an infectious process, due to adhesion and immunoresistance. At the same time, in the body, staphylococci interact with the human microbiota. The microbiota of an organism is a community of microorganisms that is constantly changing and is characterized by complex relationships at the level of pro- and eukaryotic cells and does not always fit into the norm of the phenotype's reaction to changes in environmental conditions.

This study shows the possibility of mutual influence between Staphylococcus aureus and Blastocystis spp. in vitro at the molecular level. Analysis of quantitative indicators revealed an increase in the frequency of detection of genes responsible for pathogenicity in staphylococci (spp and spa) after their co-cultivation with protists of the genus Blastocystis. An increase in the frequency of occurrence of the spp and spa genes in Staphylococcus aureus after co-cultivation with the blastocyst culture, depending on the degree of virulence, is noted, which undoubtedly indicates their influence on the ability to realize the pathogenic potential of symbionts and the ability to overcome the innate immunity of the host organism. In general, this can lead to a sharp depletion of compensatory mechanisms in microorganisms and increase the risk of unfavorable outcomes.

Keywords: Staphylococcus aureus, Blastocystis spp., Pathogenicity, cultivation, symbiosis, genetic background, restriction enzymes.

Бугеро Нина Владимировна

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Псковский
государственный университет»
bugero@mail.ru

Ильина Наталья Анатольевна

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Псковский
государственный университет»
ilina@mail.ru

Аннотация. В последние годы участились случаи стафилококковых заболеваний. Прежде всего это объясняется высокой приспособляемостью стафилококка к антибиотикам, увеличением антибиотикоустойчивых штаммов бактерий. Присутствие целого спектра различных факторов патогенности у бактерий, относящихся к роду Staphylococcus, в том числе и Staphylococcus aureus, позволяет им легко вызывать инфекционный процесс, за счет адгезии и иммунорезистентности. Вместе с тем в организме стафилококки взаимодействуют с микробиотой человека. Микробиота организма представляет собой сообщество микроорганизмов, которое постоянно меняется и характеризуется сложными взаимоотношениями на уровне клеток про- и эукариот. Иногда эти изменения могут не соответствовать норме реакции признаков организма, необходимой для данных условий среды.

В данном исследовании показана возможность взаимовлияния между Staphylococcus aureus и Blastocystis spp. в условиях in vitro на молекулярном уровне. Анализ количественных показателей обнаружил рост в показателях встречаемости генетических детерминант, кодирующих факторы патогенности стафилококков (spp и spa) при совместном выращивании их с протистами рода Blastocystis. Отмечено, что этот рост детекции этих генов имеет прямую зависимость со степенью вирулентности простейших. Это может говорить об взаимовлиянии симбионтов в процессе реализации патогенных факторов и возможностей для преодоления врожденного иммунитета организма-хозяина. В целом это может привести к резкому истощению компенсаторных механизмов у макроорганизмов и повысить риск неблагоприятных исходов.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, Blastocystis spp., патогенность, культивирование, симбиоз, генетический фон, рестриктазы.

Введение

В настоящее время становится очевидно, что взаимоотношения между микроорганизмами необходимо учитывать в патогенезе многих заболеваний. Поэтому их исследования приобретают широкий характер, оказывая влияние на развитие большинства областей медицины и биологии. Изучение генетического фона в вопросах симбиотического взаимодействия микроорганизмов способствует выявлению основных взаимоотношений механизмов клеток бактерий как друг с другом, так и с группой эукариот в постоянно меняющихся условиях сложившегося биотопа [1].

В последние десятилетия наблюдается увеличение роли условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в инфекционной заболеваемости населения [2]. Это относится к бактериям рода *Staphylococcus* — грамположительным факультативно-анаэробным малоподвижным бактериям, наиболее патогенными представителями, которых считаются *Staphylococcus aureus*.

За последние годы стафилококковые заболевания встречаются чаще, заболеваемость имеет тенденцию к дальнейшему увеличению. Такой рост стафилококковых инфекций объясняется высокой приспособляемостью этого микроба к антибиотикам, увеличением антибиотикоустойчивых штаммов стафилококков [3]. *S. aureus* является обычным обитателем различных экотопов здорового человека и входит в состав микробных сообществ. Состав микробных сообществ является очень важным, поскольку являясь оппортунистическим патогеном золотистый стафилококк может начать размножаться при нарушении баланса микрофлоры [4].

Стафилококковая инфекция проявляется в виде острого гастроэнтерита. Инфекционный процесс затрагивает клетки крови: эритроциты и лейкоциты, вызывая их гибель. Также начинаются процессы некроза тканей. Этим процессам способствуют факторы патогенности стафилококков: экзотоксин, энтеротоксин и фермент коагулаза [5].

Усиление отрицательного действия условно-патогенных бактерий вызывает большое беспокойство в биологических и медицинских сферах. Известно, что вид *St. aureus* в своём генотипе имеет все 4 фактора патогенности. Однако, недостаточно изученными остаются молекулярно-генетические механизмы участвующие в формировании новых вариантов фенотипов стафилококков [6, 7].

Сейчас становится очевидным, что крайне важно изучать микроорганизмы в микробных сообществах, а не только в чистых культурах. В современной литера-

туре, для изучения этого вопроса употребляется понятие «симбиоз», что подразумевает длительный контакт между симбионтами в пределах изучаемого биотопа и формирование специализированных симбиотических связей между микроорганизмами, направленных на приобретение тех или иных биологических свойств [8].

Простейшие *Blastocystis* spp. паразитируют в толстой кишке, вызывая бластоцитоз. Это заболевание известно относительно немного времени. Тем не менее известен факт того, что возбудитель бластоцистной инвазии может активно размножаться при снижении иммунитета у организма-хозяина или при взаимодействии с другими микроорганизмами [9, 10].

Данные, полученные исследователями, как правило, ограничиваются изучением их симбиотического взаимодействия, основанным только на исследованиях вне организма-хозяина, и не касаются изучения сложившихся симбиотических групп микроорганизмов внутри изучаемого биотопа, что, конечно же, представляет собой научный интерес. Выяснение закономерностей образования, функционирования симбиотических ассоциаций микроорганизмов в экотопах организма человека и модельных системах *in vitro* представляет собой интерес для более точного определения участия условно-патогенной микробиоты при заболеваниях организма хозяина.

Целью настоящей работы является исследование генетического фона встречаемости генов патогенности *Staphylococcus aureus* при симбиотическом взаимодействии с *Blastocystis* spp. *in vitro*.

Материалы и методы исследования

При проведении исследования у больных и лиц контрольной группы отбиралась проба фекалий для выделения штаммов *Staphylococcus aureus* и *Blastocystis* spp. Микрофлора кишечника больных и лиц контрольной группы определялась согласно приказу Минздрава России от 09.06.2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003).

В результате работы была создана коллекция из 199 изолятов *Staphylococcus aureus* от больных добровольцев. Параллельно в пробах фекалий осуществлялся поиск простейших рода *Blastocystis*. Бластоцисты были выявлены только у 132 добровольцев. Наличие бластоцист выявляли при микроскопировании препаратов окрашенных раствором Люголя, полученных из фекалий лиц, принимающих участие в эксперименте. Чистую культуру простейших рода *Blastocystis* получали путем заливания отобранных проб фекалий равным объемом

Таблица 1. Характеристика праймеров для генов *ssp* и *sra* у *Staphylococcus aureus*

Гены	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер амплификата, п.н.
<i>ssp</i>	AGCACCAAAAGAGGAAGACAA GTTTAAACGACATGTACTIONCGT	250–450
<i>sra</i>	ATCMATTTYGCMAAYGATGACCA TTGTCTGAATTATTGTTATCGCC	200–250

(1:1) физиологического раствора, суспензированием и дальнейшим фильтрованием. Полученной жидкостью в объеме 0,5–1,0 мл инокулировали пробирку с питательной средой Павловой (хлорид натрия — 8,5 г, двузамещенный фосфорно-кислый натрий — 0,59 г, однозамещенный фосфорно-кислый калий — 0,45 г, вода — 1000 мл. Стерильная бычья сыворотка в соотношении 1:20). Культивирование простейших рода *Blastocystis* проводили на этой же среде.

Выделение чистых культур стафилококков проводили методом высева патматериала (фекалии) на чашку Петри с мясопептонным молочно-солевым агаром с 7,5% раствором поваренной соли и 10% молочной сыворотки. (Матвеев К.И. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней)

Для идентификации выделенных культур *S. aureus* до вида применяли морфолого-культуральные и физиолого-биохимические методы, в том числе с помощью тест-систем «STAPHYtest» («Erba Lachema s.r.o.», European Union).

Выделение общей ДНК из бактериальных изолятов *S. aureus* проводили с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Для выделения ДНК брались суточные культуры стафилококков с агаризованной питательной среды.

Для исследования молекулярных детерминант патогенности *S. aureus* (гены *ssp* и *sra*) использовали метод ПЦР. Праймеры к данным генам подбирали с использованием программы PrimerSelect (DNASTAR, Inc США). Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в таблице 1.

Амплификацию осуществляли на ПЦР-амплификаторе «Терцик» (НПФ «ДНК-технология», Москва) с «hot start». «Hot start» обеспечивался разделением реакционной смеси в эппендорфе воском на два слоя (верхний и нижний). Реакцию проводили в эппендорфах в объеме 25 мкл. Амплификацию проводили при следующих параметрах: 1 цикл: 95°C, 5 мин; 2 цикл: 95°C, 30 сек; 60°C, 30 сек; 75°C, 30 сек; 20 повторов; последний цикл: 75°C, 2 мин. Результаты амплификации визуализировали с использованием стандартных наборов фирмы «ИнтерЛабСервис» в 1,7% агарозном геле, содержащем бромистый

этидий, с применением буфера ТАЕ. Маркером длин ДНК служила 50+ bp DNA Ladder (ЕвроГен, Россия). При обнаружении в геле светящейся полосы определенной массы делали вывод о наличии искоемых генов.

Вирулентность излятов простейших рода *Blastocystis* определяли при помощи метода рестрикционного анализа. Этот метод основан на анализе полиморфизма длин фрагментов, полученных при рестрикции (ПДФР) ДНК. В исследовании применялись две эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы): *Hind III* и *Pst I* (НПО «СибЭнзим», Россия), с использованием соответствующего буфера. Длины полученных в ходе процесса рестрикции фрагментов определяли при помощи маркеров молекулярной длины ДНК 100bp + 1,5 Kb ДНК маркер (НПО «СибЭнзим», Россия). Определение размера полученных фрагментов осуществляли с использованием программы Gel Pro Analyzer, версия 4.0.00.001 (Media Cybernetics, Inc., США). Идентичность длин фрагментов была рассчитана для каждой пары микроорганизмов, методом сравнения рестрикции отдельно по каждой рестриктазе для микроорганизма. При сравнении длин фрагментов одинаковыми считали фрагменты ДНК, длина которых различалась в пределах 5%.

Высоко вирулентные и слабо вирулентные бластоцисты были обнаружены в результате применения рестриктазы *Hind III* на основе наличия фрагментов ДНК размером 380, 600 п.н. и 700 п.н., соответственно, бластоцисты со слабовыраженными свойствами были обнаружены с применением рестриктазы *Pst I* на основе наличия фрагментов ДНК размером около 1000 п.н.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы «Statistica for Windows» [1].

Результаты исследования и их обсуждения

Всего было отобрано 132 штамма *S. aureus* выделенных у лиц с заболеваниями пищеварительного тракта. Данные о заболеваниях испытуемых и выделенных от них штаммов представлены в таблице 2. В результате проведенной работы были обнаружены различия в частоте встречаемости исследуемых генов (*ssp* и *sra*) у штаммов золотистого стафилококка.

Таблица 2. Количественные показатели генов у штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных у лиц с заболеваниями органов пищеварения

Особенности выделения <i>S. aureus</i>	Число штаммов (n)	Генная характеристика <i>S. aureus</i> (абс./%)	
		ssp	sra
Язв. болезнь желудка	63	43/67,2	39/61
Язв. болезнь 12-перстной кишки	28	21/75,0	18/64,3
Язв. колит	13	5/38,5	1/7,7
Холецистит	17	6/35,3	4/23,5
Панкреатит	11	3/27,3	-

Таблица 3. Изменение частоты гена spp у культур *S. aureus* в зависимости от присутствия в среде *Blastocystis spp.*

<i>S. aureus</i> в симбиозе с <i>Blastocystis spp.</i>	До / после совместного культивирования	Частота встречаемости гена spp (%)
Слабовирулентные штаммы бластоцист (n=24)	до	5,82 ± 0,7
	на 7-е сутки после	9,67 ± 1,5
Умеренновирулентные штаммы бластоцист (n=71)	до	25,25 ± 1,8
	на 7-е сутки после	36,40 ± 1,8*
Высоковирулентные бластоцист (n=37)	до	82,56 ± 5,8
	на 7-е сутки после	90,61 ± 8,3*
<i>S. aureus</i> (монокультуры) (n = 67)	до	4,26 ± 0,7
	на 7-е сутки после	7,24 ± 1,6

* — показатель достоверности различия между частотой встречаемости фрагмента гена spp у культур *S. aureus* (p < 0,05).

Анализ данных таблицы продемонстрировал, что золотистый стафилококк чаще обладал геном ssp. Данный ген с большей частотой регистрировался у штаммов *S. aureus*, выделенных от больных с язвенной болезнью 12-перстной кишки и желудка (75,0% и 67,2%, соответственно). Так, из 28 штаммов стафилококков, выделенных из фекалий лиц с заболеваниями язвенной болезни 12-перстной кишки у более половины штаммов (64,3%) обнаруживался ген sra. Наименьшее процентное содержание гена sra, было зарегистрировано у лиц, с заболеванием — язвенный колит (7,7%) штаммов *S. aureus*. Согласно полученным результатам, ген sra не регистрировался у штаммов культуры стафилококков, которые были выделены у лиц, с заболеванием панкреатит.

В дальнейшие планы работы входил анализ изолятов *S. aureus* обладающих симбиозом со слабовирулентными, умеренно- и высоковирулентными простейшими рода *Blastocystis* (n = 132, группа 1) и без него (n = 67, группа 2). Простейшие различались по степени вирулентности.

Стафилококки могут связывать Fc защитных иммуноглобулинов и создавать защиту бактерий от гуморальных факторов иммунитета организма-хозяина. Известно, что за этот процесс отвечает протеин А и его ген spp можно использовать для анализа патогенности стафилококков. В таблице 1 дано описание нуклеотидных последовательностей праймеров к участку гена spp и sra *S. aureus*. Мы приняли, что наличие одной единицы идентифицированного гена можно считать равным одной бактерии, поэтому количество определяемых искомым фрагментам ДНК гена spp *S. aureus* соответствовало количеству бактерий.

Результаты проведенного анализа показали (таблица 3), что у изолятов *S. aureus* различалось число генов патогенности spp, выделенных из симбиотического сообщества в зависимости от степени вирулентности бластоцист.

Ген spp в монокультуре стафилококков выявлялся у 5,82±0,7; 25,25±1,8 и 82,56±5,8% штаммов соответствен-

но, в то время как после культивирования со штаммами бластоцист разной степени вирулентности данные показатели достоверно возросли до $9,67 \pm 1,5\%$ для слабовирулентных форм, $36,40 \pm 1,8\%^*$ для средневирulentных форм и $90,61 \pm 8,3\%^*$ для высоковирулентных форм (* $p < 0,05$).

Таким образом, данный опыт показал, что при выращивании штаммов *S. aureus* с бластоцистами растет доля патогенных штаммов стафилококков, обладающих с геном *spp*. При этом существовала зависимость от вирулентности штамма рода *Blastocystis*. Чем выше была вирулентность простейшего, тем чаще встречались гены *spp*.

Анализируя результаты исследования в отношении гена *sra* у штаммов золотистого стафилококка до и после сокультивирования с протистами *Blastocystis spp.*, показано, что частота встречаемости генетической детерминанты патогенности *sra* была зарегистрирована значительно реже, чем гена *spp*. Так, до сокультивирования стафилококков ген *sra* регистрировался в $2,34 \pm 0,2\%$ случаев, на 7-е сутки после сокультивирования с простейшими этот показатель составил $2,81 \pm 0,5\%$. Необходимо отметить, что сокультивирование штаммов стафилококков с бластоцистами различной степени вирулентности показало неоднозначный результат, выражающийся в увеличении частоты встречаемости фрагмента искомого гена (*sra*) как в группе со слабовирулентными штаммами бластоцист, так и в группе высоковирулентных простейших. Эти показатели составили до сокультивирования стафилококков со слабовирулентными бластоцистами $4,73 \pm 1,2\%$, после $6,27 \pm 1,5\%$, в группе с высоковирулентными штаммами бластоцист до совместного культивирования ген *sra* был обнаружен в $4,25 \pm 1,4\%$ случаев, после в $8,56 \pm 1,9\%$.

Однако у стафилококков с бластоцистами, обладающих умеренновирulentными характеристиками патогенности частота встречаемости искомого гена до и после сокультивирования с простейшими значительно не изменялась и составила до культивирования $3,04 \pm 0,6\%$, после $3,2 \pm 0,8\%$, что по всей вероятности объясняется возможностью нахождением некоего ком-

промисса между штаммами золотистого стафилококка и бластоцистами, обладающих умеренновирulentными свойствами во время их совместного культивирования и дальнейшего сожительства.

Заключение

На основании данных, полученных в данном исследовании показано значительное генетическое разнообразие исследуемых штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных у больных желудочно-кишечного тракта во всех группах исследуемых лиц, что свидетельствует о выраженном патогенном потенциале бактерий. Сравнение генетического разнообразия изолятов золотистого стафилококка показало широкое распространение генетических детерминант, определяющих патогенность этих бактерий, изолированных от лиц, имеющих заболевания язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки. Наиболее часто гены *spp* и *sra* были выделены у лиц с язвенной болезнью 12-перстной кишки (75,0% и 64,3%) соответственно.

Выращивание стафилококков вместе с бластоцистами оказывает влияние на частоту встречаемости детерминант патогенности (гена *spp*) стафилококков.

Среди штаммов стафилококков, исследованных в данной работе, наибольшую вирулентность приобрели штаммы при выращивании с более вирулентными штаммами бластоцист. Таким образом была выявлена прямая зависимость между этими двумя факторами. Вероятно, это говорит о способности взаимовлияния на патогенный потенциал у симбионтов.

Таким образом, на искусственных питательных средах в симбиотических взаимоотношениях стафилококков с различными по вирулентности бластоцистами происходит взаимoadaptация штаммов симбионтов. Вероятно, подобный механизм можно рассматривать и в условиях макроорганизма *in vivo*. Данные гены могут быть рекомендованы к использованию для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний желудочно-кишечной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В. Генетическая и биохимическая характеристика стафилококков, встречающихся в Новосибирске. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017; 21(8):952–958.
2. Бондаренко В.М., Мавзютов А.Р., Golkocheva E. Секретируемые факторы патогенности энтеробактерий // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2002. — № 1. — С. 84–90.
3. Zhang F., Ledue O., Jun M. et al. Protection against *Staphylococcus aureus* colonization and infection by B- and T-Cell-mediated mechanisms. MBio. 2018. 9(5). (doi: 10.1128/mBio.01949–18).
4. Гриценко В.А., Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П., Мавзютов А.Р., Владимиров А.А. Гены *sdr*: распространенность среди изолятов *Staphylococcus aureus*, выделенных из разных биотопов тела человека. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2017. № 1. 15 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-1/Articles/VAG-2017-1.pdf>). (doi:10.24411/2304-9081-2017-00015).

5. Карташова О.Л., Киргизова С.Б., Потехина Л.П., Бухарин О.В. Диагностическое значение персистентных характеристик стафилококков при бактерионосительстве. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007. 5: 13–16.
6. Shettigar K., Jain S., Bhat D.V. et al. Virulence determinants in clinical *Staphylococcus aureus* from monomicrobial and polymicrobial infections of diabetic foot ulcers. J Med Microbiol. 2016. 65(12): 1392–1404. (doi: 10.1099/jmm.0.000370).
7. Карташова О.Л., Пашкова Т.М., Тяпаева Я.В., Белозерцева Ю.П., Курлаев П.П., Мавзютов А.Р., Гриценко В.А. *Staphylococcus aureus*: генетическое разнообразие с учетом источника выделения. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. 3. 10с. [Электр.ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-3/Articles/KOL-2018-3.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2018-13014.
8. Бухарин О.В. Межбактериальные взаимодействия / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвяцов, Л.М. Хуснутдинова // Микробиология. — 2003. — № 4. — С. 3–8.
9. Бугеро Н.В. Современный молекулярно-генетический подход определения вирулентности простейших // Международный журнал экспериментального образования. — 2016. — N5. — С. 305–308.
10. Соломай Т.В. Блостоцистоз человека: от механизмов взаимодействия паразита с организмом хозяина к клиническим проявлениям // Санитарный врач. — 2018. — № 8. — С. 35–42.

© Бугеро Нина Владимировна (bugero@mail.ru), Ильина Наталья Анатольевна (ilina@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Псковский государственный университет