

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН



2015 * № 4

Электронный журнал
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2015

УДК 579.25

О.А. Пашина¹, М.В. Сычева^{1,2}, О.Л. Карташова^{1,2}, Л.П. Попова¹,
Т.М. Пашкова¹

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУЛЕНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ БИОТОПОВ ТЕЛА ЧЕЛОВЕКА, И МОДИФИКАЦИЯ ФАКТОРОВ ПЕРСИСТЕНЦИИ *CANDIDA ALBICANS* ПОД ИХ ВЛИЯНИЕМ

¹ Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

² Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

Цель. Изучение особенностей влияния энтерококков, выделенных из разных биотопов тела человека при патологии и отличающихся по наличию генетических детерминант вирулентности, на персистентные свойства *Candida albicans*.

Материалы и методы. В исследовании использовали 64 штамма *C. albicans* и 17 штаммов энтерококков, выделенных из кишечника людей при обследовании на дисбиоз, и репродуктивного тракта женщин при гинекологической патологии. Идентификацию грибов рода *Candida* осуществляли общепринятыми методами, бактерий рода *Enterococcus* – с помощью мультиплексной ПЦР. Антилизозимную активность *C. albicans* определяли по О.В. Бухарину с соавт. (1999), образование биопленок – по G.A. O’Toole et al. (2000). Гены, кодирующие синтез факторов вирулентности бактерий рода *Enterococcus* (*gelE*, *cytM*, *cytB*, *cytA*, *esp*, *hyl*, *asa*), выявляли с помощью ПЦР. Взаимодействие *C. albicans* и бактериями рода *Enterococcus* исследовали при совместном культивировании в бульоне. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты. Генетические детерминанты вирулентности выявлены только у представителей вида *Enterococcus faecalis*. Установлены особенности межмикробного взаимодействия вирулентных и авирулентных штаммов *Enterococcus spp.* с грибами *C. albicans*: выявлено преимущественное подавление персистентных характеристик *Candida spp.* под воздействием *E. faecium* и повышение – при сокультивировании с *E. faecalis*.

Заключение. Полученные данные о подавлении факторов персистенции *C. albicans* авирулентными штаммами *E. faecium* открывают перспективу для их дальнейшего изучения в качестве основы антимикотического биопрепарата.

Ключевые слова: *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, факторы персистенции, ПЦР, гены вирулентности, межмикробные взаимодействия.

О.А. Pashinina¹, М.В. Sycheva^{1,2}, О.Л. Kartashova^{1,2}, Л.П. Popova¹,
Т.М. Pashkova¹

THE GENETIC CHARACTERISTIC OF VIRULENCE POTENTIAL OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM DIFFERENT MICROBIOTAS WITHIN HUMAN BODY AND THE MODIFICATION OF PERSISTENCE FACTORS OF *CANDIDA ALBICANS* UNDER THEIR EFFECT

¹ Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UrB RAS, Orenburg, Russia

² Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

Objective. The objective was to study the effect of *Enterococci*, which were isolated from human microbiotas at different body sites in pathological conditions and were featured with genetic virulence determinants, on the persistent properties of *Candida albicans*.

Materials and Methods. In carrying out the research, 64 strains of *C. albicans* and 17 strains of *Enterococcus* genus were isolated from human gastrointestinal (GI) tract examined for dysbiosis and from reproductive tracts of women experiencing pathological conditions. Identification of *Candida albicans* was carried out using standard methods; and bacteria of *Enterococcus* genus were detected by multiplex-PCR analysis. Anti-lysozyme activity of *C. albicans* was assessed using the method by O.V. Bukharin et al (1999), and biofilm formation was assayed following the method by G.A. O'Toole et al. (2000). Genes encoding the synthesis of virulence factors of *Enterococcus* bacteria (*gelE*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *esp*, *hyl*, *asa*) were revealed using PCR detection. Bacterial-fungal interactions between *C. albicans* and *Enterococcus spp.* were studied during co-isolation in common broth. Statistically, the results were treated using t-Student's test.

Results. Virulence determinants have been detected in *Enterococcus faecalis* only. Characteristic features have been established for the intermicrobial interactions of virulent and avirulent isolates of *Enterococcus spp.* with *C. albicans*: it has been established that the persistent characteristics of *Candida spp.* exhibit prevalent inhibition under the effect of *E. faecium* and show an increase when co-isolated with *E. faecalis*.

Conclusion. The data obtained on the inhibition of *C. albicans* persistence factors by avirulent strains of *E. faecium* open up a prospect of further studying the strain as a basis for antimycotic bio-based agents.

Key words: *C. albicans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, persistence factors, PCR, virulence genes, intermicrobial interactions.

Введение

Энтерококки, входящие в состав нормальной микрофлоры тела человека, играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности слизистых оболочек. В то же время они являются представителями условно-патогенных бактерий, способных вызывать аутоинфекцию [1]. В последние годы изучение бактерий рода *Enterococcus* как биологических объектов и оценка их роли в физиологии и патологии человека чаще всего рассматриваются сквозь призму участия энтерококков в возникновении инфекционных заболеваний, количество которых постоянно увеличивается [2, 3]. Охарактеризован вирулентный потенциал энтерококков, выделенных из клинического материала и кишечника, на фено- и генотипическом уровне [4, 5].

Вместе с тем, присутствуя в микробиоценозе, бактерии рода *Enterococcus* взаимодействуют с другими условно-патогенными микроорганизмами, в том числе с грибами рода *Candida*, что может оказать существенное влияние как на колонизацию слизистой, так и на течение инфекционного процесса [6]. Не случайно пристальное внимание исследователей в последнее время направлено на изучение взаимодействия симбионтов в микросимбиоценозе при инфекции [7].

В связи с этим целью работы явилось изучение особенностей влияния энтерококков, выделенных из разных биотопов тела человека при патологии

и отличающихся по наличию генетических детерминант вирулентности, на персистентные свойства *C. albicans*.

Материалы и методы

Материалом для исследования явились культуры *Candida albicans* (n=64), изолированные из фекалий пациентов с дисбиозом кишечника I-III степени и из репродуктивного тракта женщин, страдающих кольпитом и сальпингоофоритом. Выделение и идентификацию грибов рода *Candida* проводили по общепринятым методикам [8]. У выделенных штаммов грибов определяли антилизоцимную активность (АЛА) по методике О.В. Бухарина [9], образование биопленок (ОБ) по методике G. O'Toole et al. [10].

Параллельно, путем посева исследуемого материала на желчно-эскулиновый агар с азидом натрия («Hi Media», Индия) из кишечника и репродуктивного тракта были выделены энтерококки (10 и 7 штаммов, соответственно), которые идентифицировали до вида с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) по наличию видовых генов [11]. Гены, кодирующие факторы вирулентности энтерококков: цитолизины - *cytA*, *cytB*, *cytM*, желатиназу – *gelE*, гиалуронидазу – *hyl*, поверхностные белки, участвующие в адгезии и инвазии – *esp*, *asa*, определяли с помощью ПЦР.

Для постановки ПЦР бактериальные лизаты получали с помощью реагента «ДНК-экспресс» («Литех», Россия). Детерминанты вирулентности энтерококков обнаруживали с помощью известных праймеров, представленных в таблице [12-14]. Синтез праймеров осуществлен компанией «Синтол» (Москва).

Аmplификацию проводили с 1 мкл лизата в термоциклере «Терцик» (ДНК технология, Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 92°C 3 мин; 5 циклов - 92°C по 5 с, 59°C по 5 с, 72°C по 5 с; 25 циклов – 1 мин при 92°C, 1 мин при 59°C, 1 мин при 72°C; последний цикл включал 20 с при 92°C, 1 мин - 59°C и элонгацию в течение 10 мин при 72°C. Для обнаружения генов, кодирующих синтез *hyl*, *asa* и *esp*, проводили мультиплексную ПЦР с 1 мкл лизата в термоциклере «Терцик» по следующему протоколу: 1 цикл – 95°C 15 мин; 30 циклов денатурации при 94°C по 1 мин, отжиг при 56°C по 1 мин и элонгация при 72 °C по 1 мин; последний цикл включал элонгацию в течение 10 мин при 72°C.

Таблица. Праймеры, использованные для обнаружения детерминант вирулентности энтерококков [12-14]

Ген	Праймеры	Последовательность 5'-3'	Размер продукта реакции, п.н.
hyl	hyl1	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276
	hyl2	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	
asa	asa1	GCACGCTATTACGAACTATGA	375
	asa2	TAAGAAAGAACATCACCACGA	
esp	esp1	AGATTTTCATCTTTGATTCTTA-G	510
	esp2	AATTGATTCTTTAGCATCTGG	
gelE	te9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419
	te10	ACGCATTGCTTTTCCATC	
cylM	te13	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT	742
	te14	TGAGTTGGTCTGATTACATTT	
cylB	te15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843
	te16	AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	
cylA	te17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517
	te18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	

Продукты амплификации генов анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1% или 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркеров использовали GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс (рис. 1).

Взаимодействие грибов и бактерий исследовали при совместном культивировании в бульоне Шедлера («Hi Media», Индия) [15]. Для этого по 0,05 мл взвеси суточных агаровых культур *C. albicans* и *Enterococcus sp.* (мутность 2 по шкале Мак Фарланда) вносили в 5,0 мл жидкой культуральной среды, инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов, затем высевали грибы в объеме 0,01 мл на среду Сабуро, вновь инкубировали при 37⁰С 24 ч и определяли у выросших *C. albicans* АЛА и ОБ. Контролем служили чистые культуры *C. albicans*.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием параметрических методов. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента [16].



Рис.1. Результат мультиплексной ПЦР по выявлению генов *hyl*, *esp* и *asa* у вагинальных изолятов *E. faecalis*.

Примечание: дорожка 1 – маркер молекулярного веса (GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва)); дорожка 2 – отрицательный контроль; штаммы 1, 2, 3, 4 – специфический продукт реакции (510 bp), соответствующий гену *esp*; штаммы 1, 2, 3 – специфический продукт реакции (375 bp), соответствующий гену *asa*.

Результаты и обсуждение

Выделенные энтерококки были идентифицированы с помощью мультиплексной ПЦР по наличию видовых генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы: 12 штаммов (70,5%) были отнесены к виду *Enterococcus faecalis*, 5 (29,5%) – к виду *Enterococcus faecium*. Все штаммы *E. faecium* и 5 штаммов *E. faecalis* были выделены из кишечника, 7 штаммов *E. faecalis* – из репродуктивного тракта.

Детерминанты вирулентности с помощью ПЦР были обнаружены только у изолятов вида *E. faecalis* (рис. 2).

Комплекс генов, кодирующих синтез цитолизина (*cylA*, *cylB*, *cylM*), обнаружен у всех штаммов *E. faecalis*, выделенных из кишечника, причем 60% штаммов содержали ген *cylM*, обеспечивающий посттрансляционную модификацию, а гены *cylA* (отвечающий за активацию цитолизина) и *cylB* (необходимый для транспорта цитолизина), выявлены у 80% штаммов. Ни у одного из изученных энтерококков, изолированных из репродуктивного тракта женщин, не обнаружен ген *cylA*, а комплекс остальных генов *cyl*-оперона встречался у 86% штаммов. У всех штаммов, выделенных из обоих биотопов, отсутствовал ген, ответственный за продукцию гиалуронидазы (*hyl*).

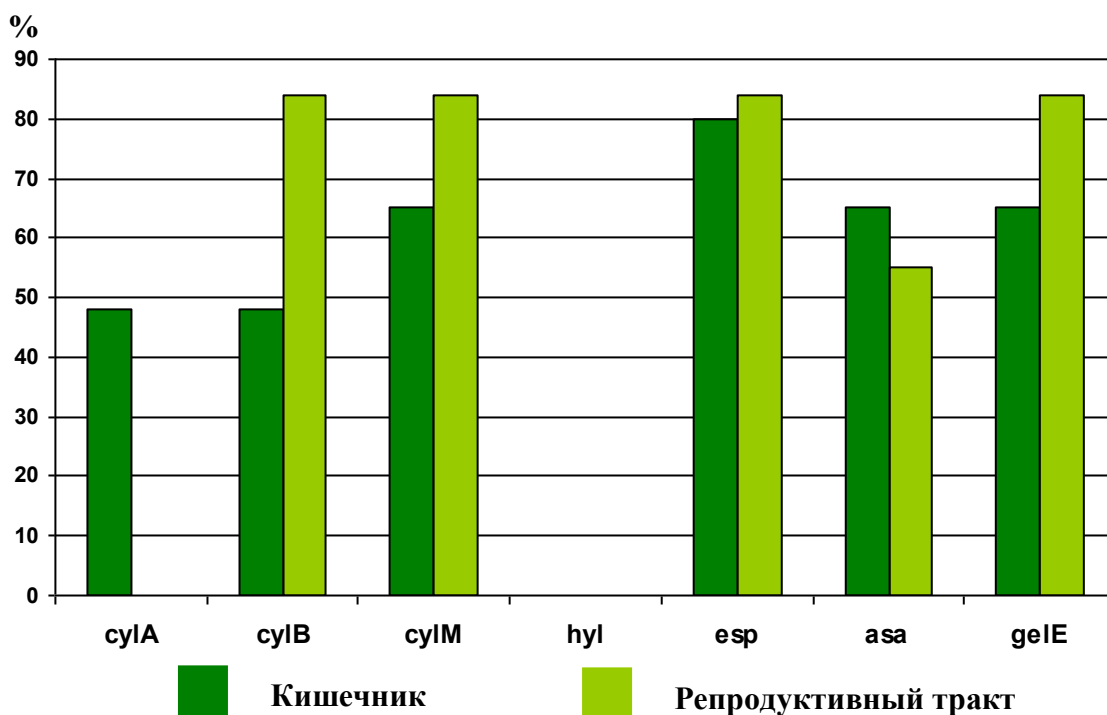


Рис. 2. Распространенность генетических детерминант вирулентности изученных штаммов *Enterococcus faecalis*.

Ген, кодирующий белки клеточной стенки, ответственные за уклонение от иммунных механизмов макроорганизма (*esp*), содержали 80% штаммов, выделенных из кишечника, и 86% культур, изолированных из репродуктивного тракта. Установлено, что ген *asa*, отвечающий за синтез поверхностного белка-адгезина, и ген *gelE*, обуславливающий протеолитическую активность, содержали 60% штаммов *E. faecalis*, выделенных из кишечника, и 57% и 86% изолятов, выделенных из репродуктивного тракта, соответственно.

На следующем этапе работы изучено влияние бактерий рода *Enterococcus* на способность *C. albicans* инактивировать лизоцим. Установлено, что штаммы *E. faecium* снижали антилизоцимную активность у фекальных изолятов *C. albicans* с $0,7 \pm 0,02$ мкг/мл*ОП до $0,5 \pm 0,01$ мкг/мл*ОП, ($p < 0,01$), а штаммы *E. faecalis* стимулировали способность к инактивации лизоцима как у фекальных (с $0,7 \pm 0,02$ мкг/мл*ОП до $0,8 \pm 0,02$ мкг/мл*ОП), так и у вагинальных изолятов *C. albicans* (с $0,5 \pm 0,02$ мкг/мл*ОП до $0,6 \pm 0,03$ мкг/мл*ОП) ($p < 0,01$).

При изучении влияния бактерий рода *Enterococcus* на способность *C. albicans* образовывать биоплёнки установлено, что *E. faecalis* стимулировали способность к ОБ как у фекальных (с $1,5 \pm 0,07$ до $1,7 \pm 0,05$), так и у вагинальных изолятов *C. albicans* (с $1,2 \pm 0,04$ до $1,5 \pm 0,08$), тогда как *E. faecium* – снижали способность к ОБ с $1,5 \pm 0,07$ до $1,1 \pm 0,01$ ($p < 0,01$).

Таким образом, при изучении межмикробных взаимодействий энтерококков и *C. albicans*, выделенных из кишечника и репродуктивного тракта при дисбиозе и инфекционно-воспалительных заболеваниях, установлено преимущественное подавление факторов персистенции *C. albicans* под действием *E. faecium* и повышение персистентного потенциала *C. albicans* под действием *E. faecalis*.

Заключение

Определение генов, контролирующих синтез известных факторов вирулентности, у клинических изолятов *E. faecalis* и *E. faecium* имеет важное значение для дифференциации симбиотических и патогенных штаммов энтерококков [17]. В отличие от *E. faecalis*, среди выделенных нами культур *E. faecium* не обнаружено ни одного штамма, обладающего генами патогенности. Полученные результаты подтверждают существующее мнение о том, что бактерии вида *E. faecalis* характеризуются большей вирулентностью [18, 19].

Генетические детерминанты вирулентности у *E. faecalis*, выделенных как из кишечника, так и репродуктивного тракта, выявляли с различной частотой. В частности, для *E. faecalis*, выделенных из репродуктивного тракта, характерна широкая распространенность генов, кодирующих протеолитические ферменты и белки, способствующие уклонению от иммунной системы, и генов *су1В*, *су1М* в комплексе (выявлены у 86% штаммов). В то же время штаммы, содержащие ген, отвечающий за синтез поверхностного белка-адгезина, с большей частотой выделялись из кишечника, поскольку адгезины им жизненно необходимы для нормальной колонизации желудочно-кишечного тракта [20]. Кроме того штаммы, выделенные из кишечника, характеризовались наличием генов *су1*-оперона, в отличие от культур, выделенных из репродуктивного тракта.

Проведённые исследования по межмикробным взаимодействиям энтерококков, отличающихся по наличию генетических детерминант вирулентности, с *C. albicans* показали, что *E. faecium* способны подавлять биоопленкообразование и антилизоцимную активность грибов *C. albicans*, тогда как *E. faecalis*, выделенные из обоих изученных биотопов, напротив – повышать их персистентные свойства.

Полученные данные подтверждают выявленный ранее феномен оппозитного (усиление/подавление) влияния микроорганизмов на биологические свойства пары микросимбионтов в условиях микросимбиоза [21] и могут

быть важны для понимания патогенетических особенностей формирования эндогенных инфекций и дисбиозов различных биотопов организма человека.

Представленные материалы открывают перспективу для дальнейшего изучения штаммов *E. faecium*, не обладающих детерминантами вирулентности и эффективно подавляющих персистентный потенциал культур *S. albicans*, выделенных при патологии [22, 23], в качестве основы антимикотического биопрепарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 227 с.
2. Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Спирина Т.С. и др. Энтерококки как возбудители послеоперационных инфекционных осложнений. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2007. 4: 50-53.
3. Kow N., Ferzandi T.R. Enterococcus osteomyelitis secondary to pyelonephritis. Int. Urogynecol. J. 2013. 24(4): 691-2.
4. Вальшева И.В. Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков кишечной микробиоты человека. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2012. 4: 44-47.
5. Бухарин О.В., Вальшева И.В., Карташова О.Л. и др. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. 3: 13-18.
6. Cruz M.R., Graham C.E., Gagliano V.C. et al. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. Infect. Immun. 2013. 1 (81): 189-200.
7. Бухарин О.В., Вальшев А.В., Иванова Е.В. и др. Взаимодействие возбудителя с ассоциативными бактериями при сальмонеллезной инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. 3: 3-6.
8. Реброва Р.Н. Грибы рода *Candida* при заболеваниях негрибковой этиологии. М.: Медицина, 1989. 128 с.
9. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 366 с.
10. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000. 54: 49-79.
11. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. J. Clin. Microbiol. 2004. 42 (8): 3558-3565.
12. Semedo T., Santos M.A., Martins P. et al. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. J. Clin. Microbiol. 2003. 6 (41): 2569-2576.
13. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C. et al. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in Enterococci and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. 2004. 10(42): 4473-4479.
14. Reviriego C., Eaton T., Martín R. et al. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. J. Hum. Lact. 2005. 21 (2): 131-137.
15. Ермоленко Е.И., Ждан-Пушкина С.Х., Суворов А.Н. Взаимодействие *S. albicans* и *Lactobacillus plantarum* *in vitro*. Проблемы медицинской микологии. 2004. 6: 49-54.
16. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии. Л.: Гос. изд. мед. лит., 1962. 177 с.
17. Бондаренко В.М., Суворов А.Н. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции. Журнал микробиологии, эпидемиологии и им-

- мунобиологии. 2008. 3: 14-27.
18. Mundy L.M., Sahn D.F., Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000. 13 (4): 513-522.
 19. Eaton T.J., Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Envir. Microbiol.* 2001. 67: 1628–35.
 20. Olmsted S.B., Dunny G.M., Erlansen S.L. et al. 1994. A plasmid encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 170: 1549 –1556.
 21. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Перунова Н.Б. и др. Симбиоз и его роль в инфекции. Екатеринбург: УрО РАН, 2011. 300 с.
 22. Капустина О.А., Карташова О.Л., Потехина Л.П. и др. Биопленкообразование *Candida sp.*, выделенных из разных биотопов тела человека. Проблемы медицинской микологии. 2011. 13(2): 81.
 23. Капустина О.А., Карташова О.Л., Чайникова И.Н. Факторы персистенции грибов рода *Candida*, выделенных из разных биотопов. Проблемы медицинской микологии. 2010. 12(2): 92.

Поступила 1.12.2015

(Контактная информация: **Карташова Ольга Львовна** – доктор биологических наук, зав. лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел./факс (3532)774463; e-mail: labpersist@mail.ru)

LITERATURA

1. Buharin O.V., Valyshev A.V. *Biologija i jekologija jenterokokkov*. Ekaterinburg: UrO RAN, 2012. 227 s.
2. Gabrijeljan N.I., Gorskaja E.M., Spirina T.S. i dr. Jenterokokki kak vozбудiteli posleoperacionnyh infekcionnyh oslozhenij. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 2007. 4: 50-53.
3. Kow N., Ferzandi T.R. Enterococcus osteomyelitis secondary to pyelonephritis. *Int. Urogynecol. J.* 2013. 24(4): 691-2.
4. Valysheva I.V. Geneticheskaja harakteristika virulentnogo potenciala jenterokokkov kischečnoj mikrobioty cheloveka. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 2012. 4: 44-47.
5. Buharin O.V., Valysheva I.V., Kartashova O.L. i dr. Harakteristika virulentnogo potenciala klinicheskikh izoljatov jenterokokkov. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 2013. 3: 13-18.
6. Cruz M.R., Graham C.E., Gagliano B.C. et al. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 2013. 1 (81): 189-200.
7. Buharin O.V., Valyshev A.V., Ivanova E.V. i dr. Vzaimodejstvie vozбудitelja s associativnymi bakterijami pri sal'monelleznoj infekcii. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii*. 2008. 3: 3-6.
8. Rebrova R.N. Griby roda *Candida* pri zabojevanijah negribkovej jetiologii. M.: Medicina, 1989. 128 s.
9. Buharin O.V. *Persistencija patogennyh bakterij*. M.: Medicina, 1999. 366 s.
10. O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000. 54: 49-79.
11. Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2004. 42 (8): 3558–3565.
12. Semedo T., Santos M.A., Martins P. et al. Comparative study using type strains and clinical

- and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in enterococci. J. Clin. Microbiol. 2003. 6 (41): 2569–2576.
13. Vankerckhoven V., Van Autgaerden T., Vael C. et al. Development of a Multiplex PCR for the Detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* Genes in *Enterococci* and Survey for Virulence Determinants among European Hospital Isolates of *Enterococcus faecium*. J. Clin. Microbiol. 2004. 10(42): 4473–4479.
 14. Reviriego C., Eaton T., Martín R. et al. Screening of virulence determinants in *Enterococcus faecium* strains isolated from breast milk. J. Hum. Lact. 2005. 21 (2): 131-137.
 15. Ermolenko E.I., Zhdan-Pushkina S.H., Suvorov A.N. Vzaimodejstvie *C. albicans* i *Lactobacillus plantarum* in vitro. Problemy medicinskoj mikologii. 2004. 6: 49-54.
 16. Ashmarin I.P., Vorob'jov A.A. Statisticheskie metody v mikrobiologii. L.: Gos. izd. med. lit, 1962. 177 s.
 17. Bondarenko V.M., Suvorov A.N. Simbioticheskie jenterokokki i problemy jenterokokkovoj opportunisticheskoj infekcii. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2008. 3: 14-27.
 18. Mundy L.M., Sahn D.F., Gilmore M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev. 2000. 13 (4): 513-522.
 19. Eaton T.J., Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Envir. Microbiol. 2001. 67: 1628–35.
 20. Olmsted S.B., Dunny G.M., Erlansen S.L. et al. 1994. A plasmid encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. J. Infect. Dis. 170: 1549 –1556.
 21. Buharin O.V., Lobakova E.S., Perunova N.B. i dr. Simbioz i ego rol' v infekcii. Ekaterinburg: UrO RAN, 2011. 300 s.
 22. Kapustina O.A., Kartashova O.L., Potehina L.P. i dr. Bioplenkoobrazovanie *Candida* sp., vydelennyh iz raznyh biotopov tela cheloveka. Problemy medicinskoj mikologii. 2011. 13(2): 81.
 23. Kapustina O.A., Kartashova O.L., Chajnikova I.N. Faktory persistencii gribov roda *Candida*, vydelennyh iz raznyh biotopov. Problemy medicinskoj mikologii. 2010. 12(2): 92.

Образец ссылки на статью:

Пашина О.А., Сычева М.В., Карташова О.Л., Попова Л.П., Пашкова Т.М. Генетическая характеристика вирулентного потенциала энтерококков, выделенных из разных биотопов тела человека, и модификация факторов персистенции *Candida albicans* под их влиянием. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2015. 4: 1-10 [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2015-4/Articles/OAP-2015-4.pdf>).