ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ И БАКТЕРИОЦИНИ ПРИ КЛИНИЧНОЗНАЧИМИ БАКТЕРИИ ОТ РОД ENTEROCOCCUS

Д. Атанасова, Т. Стратева и И. Митов

Катедра по медицинска микробиология, Медицински факултет, Медицински университет – София

VIRULENCE FACTORS AND BACTERIOCINS AMONG CLINICALLY IMPORTANT BACTERIA BELONGING TO THE GENUS ENTEROCOCCUS

D. Atanasova, T. Strateva and I. Mitov

Department of Medical Microbiology, Medical Faculty, Medical University – Sofia

Резюме:

Ентерококите са широко разпространени в хората, животните, хранителните продукти и околната среда бактерии. Смятани преди за безобидни, днес те се нареждат сред водещите етиологични причинители на широк спектър инфекции, някои от които се характеризират с висока смъртност. Най-често инфектират уринарния тракт, сърдечно-съдовата система, коремната област, билиарния тракт, рани от изгаряне и др. В настоящия обзор са разгледани различните фактори на вирулентност, които притежават бактериите от род *Enterococcus*, и участието им по различни начини в патогенезата на инфекциите – чрез увеличаване на адхезията, колонизацията и инвазията на тъканите; модулиране на имунния отговор и извънклетъчна продукция на ензими и токсини. Представени са и най-често продуцираните бактериоцини, тяхното действие спрямо близкородствени бактерии и ролята им за изява на патогенния потенциал на ентерококите.

Ключови думи: род *Enterococcus*, инфекции, фактори на вирулентност, бактериоцини

Адрес за кореспонденция: *Д-р Даниела Атанасова, Катедра по медицинска микробиология, Медицински университет, ул. "Здраве" № 2, 1431 София, тел. 02 9172740, e-mail: dany.atanasova@abv.bg*

Summary:

Enterococci are widespread bacteria in humans, animals, food products and the environment. Considered to be harmless in the past, nowadays they are one of the leading causative agents associated with a wide range of infections, some of which with high mortality rates. The most common targets of infection are the urinary tract, cardiovascular system, abdomen, biliary tract, burn wounds, etc. This review describes the various virulence factors of *Enterococcus* spp. and the way they contribute to the pathogenesis of infectious diseases – by increased adherence, colonization and invasion of the tissues; by modulation of the immune response and extracellular production of enzymes and toxins. The most frequently produced bacteriocins, their effect on closely related bacterial species and their impact on the pathogenic potential of Enterococci are also presented.

Key words: genus *Enterococcus*, infections, virulence factors, bacteriocins

Address for correspondence: *Daniela Atanasova, M. D., Department of Medical Microbiology, Medical University of Sofia, 2, Zdrave St., Bg – 1431 Sofia, tel. +359 2 9172740, e-mail: dany.atanasova@abv.bg*

Enterococcus spp. са Грам-положителни бактерии, които могат да растат и оцеляват при сурови условия. Те са повсеместно разпространени в природата и са типични коменсали, които нормално се откриват в гастроинтестиналния тракт, урогениталната система и устната кухина на хората, а също така могат да бъдат изолирани и от редица бозайници и птици [45].

Като класически опортюнисти, ентерококите се характеризират с ниско ниво на патогенност

[43]. В тази връзка те не представляват проблем, но могат да се появят усложнения след хирургична интервенция или влошаване на здравното състояние на пациента, при продължителен болничен престой, скрити заболявания, инвазивни процедури, предшестваща антимикробна химиотерапия [50].

Enterococcus faecalis предизвиква 80-90% от ентерококовите инфекции при хората [39], докато само 10-20% се дължат на *Enterococcus faecium*. Другите видове са по-редки причинители на инфекции при хора [66].

През последните две десетилетия бактериите от род *Enterococcus* са измежду най-често откриваните причинители на широк спектър вътреболнични инфекции при хората [58]. Те най-често инфектират уринарния тракт [27], кръвта [10], ендокарда [25], коремната област [5], билиарния тракт [44], рани от изгаряне [41] и поселяват чужди тела като уретрални и интраваскуларни катетри [64]. Ентерококите се нареждат сред водещите причинители на нозокомиални инфекции и животозастрашаващи състояния като сепсис, менингит, бактериемия и други.

За да бъде разбрана разликата между патогенните и непатогенните бактерии, по-рано изследователите са опитвали да идентифицират отличителните белези, които позволяват на патогенните бактерии да предизвикват заболявания. Бактериите притежават специфични микробни детерминанти, които могат да бъдат експресирани във възприемчив гостоприемник [11]. Тези детерминанти представляват фактори на вирулентност, които са молекули, експресиращи се или секретиращи се от бактериалната клетка, за да улеснят колонизацията на гостоприемника, инвазията в клетките, избягването на имунната система на гостоприемника и получаването на хранителни вещества, необходими за растеж и оцеляване [78].

При ентерококите гените, кодиращи фактори на вирулентност, са локализирани в хромозомата или върху извънхромозомни елементи, като плазмиди, както и са част от генома на умерени бактериофаги [76]. Някои от тези гени могат да бъдат локализирани на 150-kb остров на патогенност (PAI), който за първи път е описан от Huyche, Spiegel и Gilmore през 1991 г. [34]. PAIs са тясно свързани с вирулентните клонове и често липсват или са модифицирани в по-малко вирулентните щамове [2]. Промяната на острова на патогенност е важен елемент в еволюцията на бактериите [76].

В табл. 1 са представени най-често срещаните фактори на вирулентност при двата най-разпространени вида ентерококи (*E. faecalis* и *E. faecium*), заедно с кодиращите ги гени и изпълняваната от тях функция.

Таблица 1. Основни фактори на вирулентност при E. faecalis и E. faecium

Фактор на вирулентност	*Функция*	*Кодиращ ген*	*Локализация на гена*	*Видово разпространение*
Ентерококов повърхностен протеин Esp	Избягване на имунната система на макроорганизма; участие в образуването на биофилм; участие в адхезията към клетки на уринарния тракт	*esp*	Голям (150-kb) остров на патогенност в хромозомата	*E. faecalis* *E. faecium*
Агрегираща субстанция	Участие в адхезията към клетките на макроорганизма и конюгацията	*aggA, asa1*	Феромон-реагиращи плазмиди	*E. faecalis* *E. faecium*
Колаген-свързващи протеини Ace и Acm	Адхезини, осигуряващи прикрепване към колаген тип I и IV; вероятна роля на Ace в патогенезата на ендокардита	*ace, acm*	Хромозома	*E. faecalis* *E. faecium*
Протеин EfaA в клетъчната стена	Адхезин, участващ в патогенезата на ендокардита	*efaA*	Хромозома (*efaCBA* оперон)	*E. faecalis*
Желатиназа	Разграждане на тъканите на макроорганизма; формиране на биофилм	*gelE*	Хромозома (*gelE-sprE* оперон)	*E. faecalis* *E. faecium*
Хиалуронидаза	Разграждане на хиалуроновата киселина; инвазия на тъкани; снабдяване на бактериите с хранителни вещества	*hyl*	Плазмиди	*E. faecalis* *E. faecium*
Цитолизин (хемолизин/ бактериоцин)	Лизиране на Грам-положителни бактерии и еукариотни клетки (еритроцити, полиморфонуклеарни левкоцити и макрофаги)	*cylA** *cylB*** *cylM****	Плазмид pAD1 (оперон)	*E. faecalis* *E. faecium*
Мембранен протеин Eep	Усилена експресия на феромони	*eep*	Хромозома	*E. faecalis*

Забележка: **cylA* – ген за активиране на цитолизина, ***cylB* – ген за транспорт на цитолизина, ****cylM* – ген за посттранслационна модификация на цитолизина

Факторите на вирулентност на ентерококите участват по различни начини в патогенезата на инфекциите – чрез увеличаване на адхезията, колонизацията и инвазията на гостоприемниковите тъкани; модулиране на имунитета на макроорганизма и извънклетъчна продукция на ензими и токсини, индуциращи патологични промени в хазяина и увеличаване тежестта на инфекцията [79].

Увеличаване на адхезията, колонизацията и инвазията на гостоприемниковите тъкани

Адхезия към гостоприемниковите тъкани

Бактериалната адхезия към тъканите на хазяина е критична първа стъпка в инфекциозния процес [4]. Адхезините са клетъчни структури и химично различни молекули, включващи протеини, полизахариди и компоненти от клетъчната стена. Микробните повърхностно-компонент-разпознаващи адхезивни матриксни молекули (MSCRAMM) са семейство от различни протеини, които медиират прикрепването към различни повърхности у гостоприемника, характерно за някои бактерии като *Staphylococcus aureus* и *E. faecalis* [11]. За гастроинтестинални комесали, каквито са ентерококите, адхезините, които осигуряват прикрепяне към рецепторите на мукозата, се очаква да имат важна роля в поддръжката на колонизацията [39]. Развитието на повечето ентерококови инфекции се счита, че има ендогенен произход – чрез пренасяне на бактериите през епителните клетки на червата, които в резултат на преодоляване на лимфната бариера могат да се разпространят по кръвен път до различни тъкани и органи в организма [28]. Скорошни клинични проучвания демонстрират възможността за обмен на ентерококи и ентерококови плазмиди между пациентите [53]. Тези екзогенни ентерококови щамове притежават повишена способност за колонизация, бърз растеж, инвазия в тъканите на гостоприемника и персистиране спрямо ендогенната ентерококова флора [39]. Проучените адхезини при *Enterococcus* spp. са дискутирани по-долу.

Агрегираща субстанция

Агрегиращата субстанция (aggregation substance, AS) е феромонзависим, плазмидно кодиран бактериален адхезин, който медиира ефикасния контакт между донорната и реципиентната бактериална клетка, улеснявайки плазмидния обмен чрез конюгация [42]. AS подпомага конюгацията чрез директна бактериална агрегация, резултат от близкия контакт между донора и реципиента [57]. Експресията на AS се индуцира под действието на феромони, секретирани от клетки без желания плазмид [22]. Докато AS се експресира от донорната клетка, процесът на бактериална конюгация изисква „свързваща субстанция" (binding substance, BS), която се експресира на повърхността на реципиентната клетка [42].

AS е вмъкната в бактериалната мембрана чрез С-терминалния си край [39]. Тя съдържа още: N-терминален домейн, вариабилен регион, централен домейн и два Arg-Gly-Asp (RGD) мотива.

Освен участието в бактериалната конюгация AS осигурява прикрепяне към екстрацелуларни матриксни протеини, като фибронектин, тромбоспондин, витронектин и колаген тип I [65]; увеличава адхезията на ентерококите към интестиналните и реналните клетки, а също и към кардиалните вегетации [39]. Направените проучвания върху ендокардити, причинени от ентерококи в заешки модел, установяват по-голям размер на вегетациите в сравнение с вегетациите, причинени от щамове с дефектна AS [71]. Специфичните адхезивни механизми могат да увеличат риска за развитие на ендокардит, но може би не са най-важният белег за експресия на патогенността [17]. *E. faecalis* се свързва към фибронектина по-добре от Грам-отрицателните бактерии, но не толкова добре, колкото *S. aureus* и патогенните *Candida* spp. [39]. Други проучвания в подобни модели изказват предположението, че AS и нейни сходни свързващи субстанции могат да доведат до увреждане на миокарда и белодробната тъкан [71]. AS медиира адхезията на ентерококите и към реналните епителни клетки [39]. Пикочният мехур, простатата и бъбреците се инфектират често от ентерококи, особено при пациенти със структурни аномалии на уринарния тракт или уретрални катетри [27, 39].

Ентерококов повърхностен протеин

Ентерококовият повърхностен протеин (enterococcal surface protein, Esp) представлява голям, хромозомно кодиран протеин [49], изграден от N-терминална сигнална последователност и N-терминален домейн, следван от три повтарящи се домейна, обозначавани като A, B и C [23, 46]. Установено е, че Esp усилва адхезията, колонизацията и отбягването на имунната система на макроорганизма, а също има и известна роля в антибиотичната резистентност [52]. Esp също допринася за формиране на биофилм, предпазващ от влиянията на заобикалящата среда, а също така и за адхезия към еукариотни клетки, като например тези на уринарния тракт [9]. При някои заболявания, като бактериалния ендокардит, някои типове нефролитиази и зъбния кариес, образуването на

биофилм е важен момент в патогенезата. Биофилмът е изграден от бактериални клетки и субстанции на макроорганизма, и предпазва микробния причинител от защитните механизми на хазяина и действието на антимикробните лекарствени средства. Той може да включва един бактериален вид, съответно причинител на инфекцията (при ендокардит), или повече видове (при зъбна плака). Формирането на биофилм върху абиотични повърхности, като протези, катетри и др., води до персистирането на инфекцията [11].

Колаген-свързващ протеин на E. faecalis (Ace)

Ace представлява повърхностен, колаген-свързващ протеин, принадлежащ към семейството на MSCRAMM [28]. Той е структурно и функционално подобен на колаген-свързващия протеин Can на *S. aureus* [63]. Експресията на Ace по време на инфекция нараства и антителата срещу него могат да блокират свързването към екстрацелуларните матриксни протеини *in vitro* [55]. Установено е, че Ace осъществява прикрепяне към колаген тип I и IV, ламинин и дентин [55, 63]. Допуска се и участието на Ace в патогенезата на ендокардита [74].

Ендокардит-специфичен антиген А на E. faecalis

Ендокардит-специфичният антиген А (EfaA) е бил открит при изследване на различни повърхностни протеини от серуми на болни с ендокардит [79]. Аминокиселинната последователност на протеина EfaA показва 55 до 60% хомоложност с група стрептококови протеини, познати като адхезини. Била е изказана хипотезата, че EfaA може би играе ролята на адхезин при ендокардити [42].

Въглехидратни адхезини в клетъчната стена

Данни, показващи съществуването на въглехидратни адхезини при ентерококите, за първи път са докладвани от Guzman и сътрудници [32]. Този изследователски екип установява, че въглехидрат-медиираната адхезия на *E. faecalis* към различни субстрати е сложен процес, изискващ няколко различни адхезини. Някои от тях били открити във всички изследвани щамове и при различни условия на средата, докато други адхезини били експресирани само след растеж в човешки серум [32].

Няколко други проучвания демонстрират присъствието на ентерококов полизахариден антиген в клетъчната стена на *E. faecalis*, обозначен като Epa [77]. *Epa* локусът се състои от гени, участващи в полизахаридния биосинтез. Широкото разпространение на Epa измежду *E. faecalis* щамовете показва повишената им устойчивост спрямо "професионалните фагоцити" – неутрофилите [79].

Пили

Пилите на Грам-положителните бактерии участват в адхезията към различни типове човешки клетки и във формирането на биофилм. Това са два процеса, критични в патогенезата на много бактериални заболявания [54], като например инфекциите на устната кухина, инфекциите на уринарния тракт, ендокардитите [28]. Образуването на пили от ентерококите е необходимо за формиране на биофилм, като генният клъстър, кодиращ тези пили, е ebp (ендокардит и биофилм свързани пили) [62]. Оперонът ebp е изграден от ebpA, ebpB, ebpC и свързания srtC (кодиращ сортиращ ензим С) ген [73]. Пилите, изградени чрез комбиниране на много класове прекурсорни протеини, се свързват към пептидогликановия слой посредством С-терминален пилин-свързващ мотив [54]. *E. faecalis* съдържа два класа сортиращи ензими – клас А, който свързва повечето протеини с С-терминален мотив към пептидогликана, и клас С, обозначен като Bps (биофилм и пили-свързващ ензим), свързващ пилин субединиците [28].

Инвазия на гостоприемниковите тъкани

Проучвания, направени при мишки с антибиотично предизвикан свърхрастеж на *E. faecalis,* показват, че тези организми могат да се прикрепят към епителната повърхност на илеума, цекума и колона. Освен това тези щамове притежават способността да преминат от интестиналния лумен към мезентериалните лимфни възли, черния дроб и слезката [50]. Ентерококите, преминали чревната стена, могат да причинят системни инфекции. Известно е, че някои антибиотици с липсваща активност срещу ентерококи, като например цефалоспорини, могат да доведат до ентерококова суперинфекция и следователно са свързани с развитието на ентерококова бактериемия [40].

МОДУЛИРАНЕ НА ГОСТОПРЕМНИКОВИЯ ИМУНИТЕТ И ВЪЗПАЛЕНИЕТО

Патогенните бактерии, прикрепили се към гостоприемниковите тъкани и клетки, преодолели мукозната и кожна бариера, могат да доведат до развитие на инфекция след преодоляване на защитните механизми на гостоприемниковия организъм (активиране на системата на комплемента, опсонизация, мигриране на неутрофили, макрофаги и моноцити).

Липотейхоеви киселини

Липотейхоевите киселини (LTA) са група тясно свързани амфипатични молекули, изградени от полиглицеролфосфатен скелет, свързан ковалентно с гликолипидна част [42]. Те често се намират на клетъчната повърхност на много Грам-положителни бактерии [80].

LTA на ентерококите чрез липидната си част могат да се свързват с различни еукариотни клетки, в това число тромбоцити, еритроцити, лимфоцити и епителни клетки [39]. Така придобили антигенна специфичност, свързаните клетки на макроорганизма могат да активират системата на комплемента.

Освен това LTA, изолирани от щамове *E. faecalis* или други Грам-положителни бактерии, са докладвани, че могат да стимулират левкоцитите да отделят медиатори, които играят роля в различни фази на възпалението [42]. Това включва освобождаването на TNF-α, интерлевкин-1-бета (IL-1β), интерлевкин-6 (IL-6) [7] и интерлевкин-8 (IL-8) [66].

LTA се разглежда и като съставна част на свързващата субстанция на *E. faecalis*, която играе роля на рецептор за агрегиращата субстанция, продуцирана от донорната клетка. LTA също може да бъде считана за молекулярен посредник на факторите на вирулентност на *E. faecalis*, чрез които се улеснява и плазмидният трансфер [42].

Извънклетъчно производство на супероксидни радикали

Продукцията на супероксидни радикали от неутрофилни левкоцити и други фагоцитиращи клетки е необходима за убиването на микроорганизмите, но от друга страна, тя води до увреждане на тъканите по време на възпалението [18, 42]. Установено е, че при инвазивни ентерококови инфекции, като сепсис и ендокардит, се продуцират значително по-голямо количество супероксидни радикали [35]. Доказано е, че супероксидната продукция повишава *in vivo* оцеляването на *E. faecalis* при смесена инфекция с *Bacteroides fragilis* [36].

Полови феромони

Половите феромони са хромозомно кодирани, малки хидрофобни пептиди с дължина 7 или 8 аминокиселини, с функция на сигнални пептиди при ентерококите [15]. Те играят роля при разпространението на конюгативните плазмиди, носещи гени за антибиотична резистентност, за различни фактори на вирулентност (например цитолизин) [49]. Половите феромони са хемоатрактанти за човешките макрофаги и неутрофилни левкоцити, индуциращи продукция на супероксидни радикали и секреция на лизозомални ензими [21]. Това показва участието им в патологичните промени, настъпващи при острото възпаление [69].

ПРОДУКЦИЯ НА ИЗВЪНКЛЕТЪЧНИ ЕНЗИМИ И ТОКСИНИ

Желатиназа и серин протеаза

Желатиназата представлява извъклетъчна, цинк-съдържаща металопротеиназа, която за първи път е била пречистена и описана от Bleiweis и Zimmerman [8]. Тя може да хидролизира желатин, колаген, фибриноген, казеин, хемоглобин, инсулин, както и някои други биоактивни пептиди [42]. Получените хидролизни продукти могат да бъдат използвани от бактериалната клетка като нутриенти [28].

Генът, кодиращ производството на желатиназата (*gelE*), е разположен на оперон заедно с гена *sprE*, кодиращ серин протеаза [61]. Секрецията на протеазите се регулира от fsr системата [49]. Двукомпонентната fsr система се състои от четири гена – *fsrA*, *fsrB*, *fsrC*, *fsrD*. Тя е отговорна за извънклетъчното натрупване на пептиден лактон и формиране на биофилм чрез продукция на желатиназа от *E. faecalis* [70].

Желатиназата освен това притежава способност да разцепва C3 протеините, което показва ролята и при избягване на имунния отговор на гостоприемниковия организъм чрез инактивиране на системата на комплемента [59]. Има известна роля и в патогенезата на периапикалното възпаление чрез деградиране на дентина и костната резорбция [49].

Хиалуронидаза

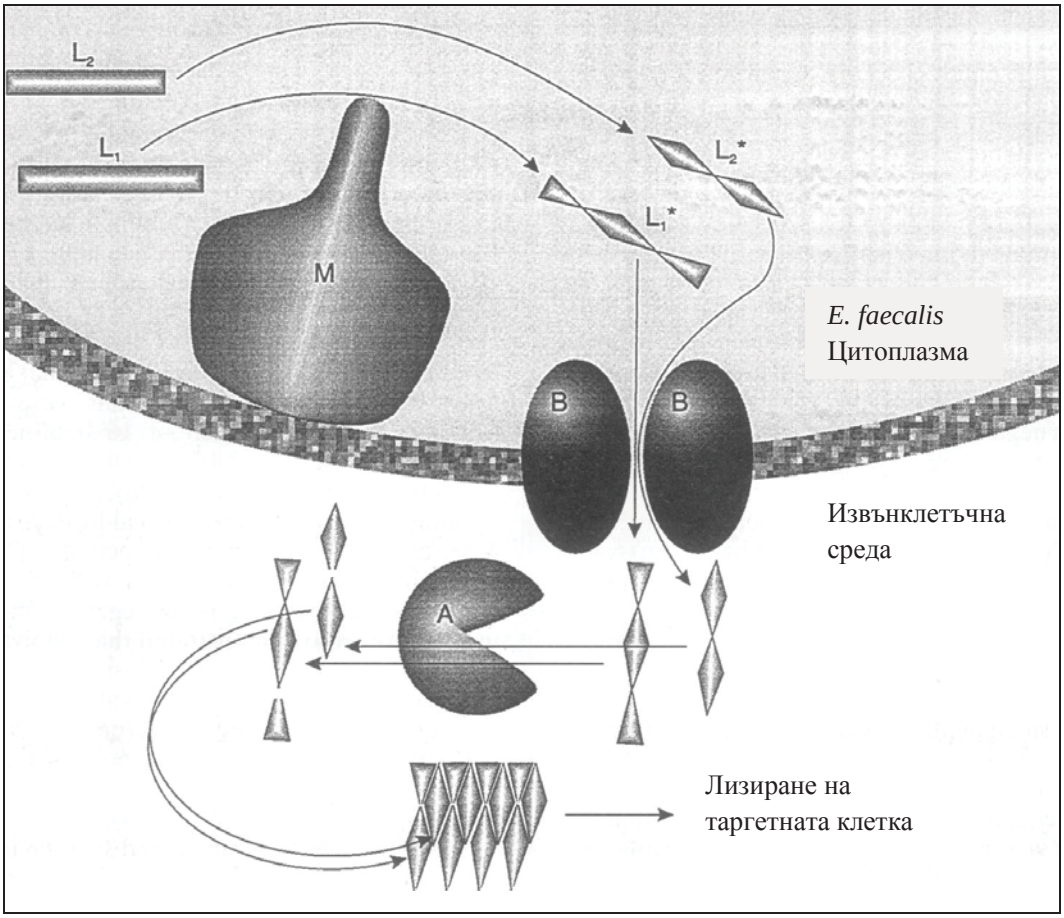
Хиалуронидазата представлява хидролитичен ензим, действащ на хиалуроновата киселина. Продуцира се в голямо количество от стрептококи, както и от други бактерии, в това число *E. faecalis* и *E. faecium* [37]. Ензимът деполимеризира хиалуроновата киселина, която е важен компонент на съединителната тъкан при хората и по този начин се осигурява разпространението на бактериите в тъканите на гостоприемника [34]. Действието на ензима по отношение на разпространението може да бъде сравнено с ефекта на бактериалните токсини [42]. Друга роля, която може да бъде посочена за хиалуронидазата, е снабдяването на бактериите с хранителни вещества, понеже продуктите, подложени на деградация, са дизахариди, които могат да бъдат транспортирани и метаболизирани вътреклетъчно от бактерия [37].

Цитолизин

Цитолизинът, също наричан бета-хемолизин или бактериоцин, представлява цитотоксин [28], чиито гени за синтез се носят от плазмиди, най-често от плазмид pAD1 [38, 39]. Цитолизинът притежава способността да лизира човешки, заешки или конски еритроцити [79], полиморфонуклеарни неутрофили и макрофаги [49]. Причисляван е към първи клас бактериоцини, известни като лантибиотици, което показва способността му да лизира широк спектър от Грам-положителни бактерии [79].

Синтезът и активацията на цитолизина представляват сложен и многостъпален процес. Цитолизиновият оперон съдържа пет гена – *cylL1*, *cylL2*, *cylM*, *cylB* и *cylA* [39]. Гените *cylL1*, *cylL2*, *cylM* и *cylB* са отговорни за синтеза на компонента L [16], докато *cylA* отговаря само за експресията на компонент A [72]. Чрез нуклеотиден анализ са открити рибозомно синтезирани прекурсори на цитолизина – CylL1 и CylL2. Те представляват малки, цистин-съдържащи полипептиди [39]. Посттранслационно те се модифицират от вътреклетъчния протеин CylM [12, 30]. Непосредствено след *cylM* гена в структурата на оперона се намира генът *cylB* [39]. Той кодира синтеза на АТФ-зависими транспортни системи, отговарящи за пренасянето на молекули с високо ниво на специфичност [26]. CylB участва в транспортирането на посттранслационно модифицираните CylL1 и CylL2 прекурсори [39]. Последният етап в синтеза на цитолизина е неговото активиране. CylA е серин протеаза, отговорна за протеолитичното разцепване на CylL1 и CylL2 близо до таргетната клетка [72]. Взаимодействието на двата компонента има за резултат лизиране на таргетната клетка.

На фиг. 1 са показани отделните етапи при синтеза на цитолизина.



Фиг. 1. Модел на експресия, зреене, секреция и активация на цитолизина [39]. Компонентите CylL1 (L1) и CylL2 (L2) се модифицират вътреклетъчно от генния продукт CylM (M). Посттранслационно модифицираните продукти се транспортират извън клетката от CylB (B). След като попаднат извън клетката, прекурсорните компоненти се активират от CylA (A) и лизирането на таргетната клетка се осъществява чрез взаимодействие на CylL1 и CylL2

Продукция на бактериоцини

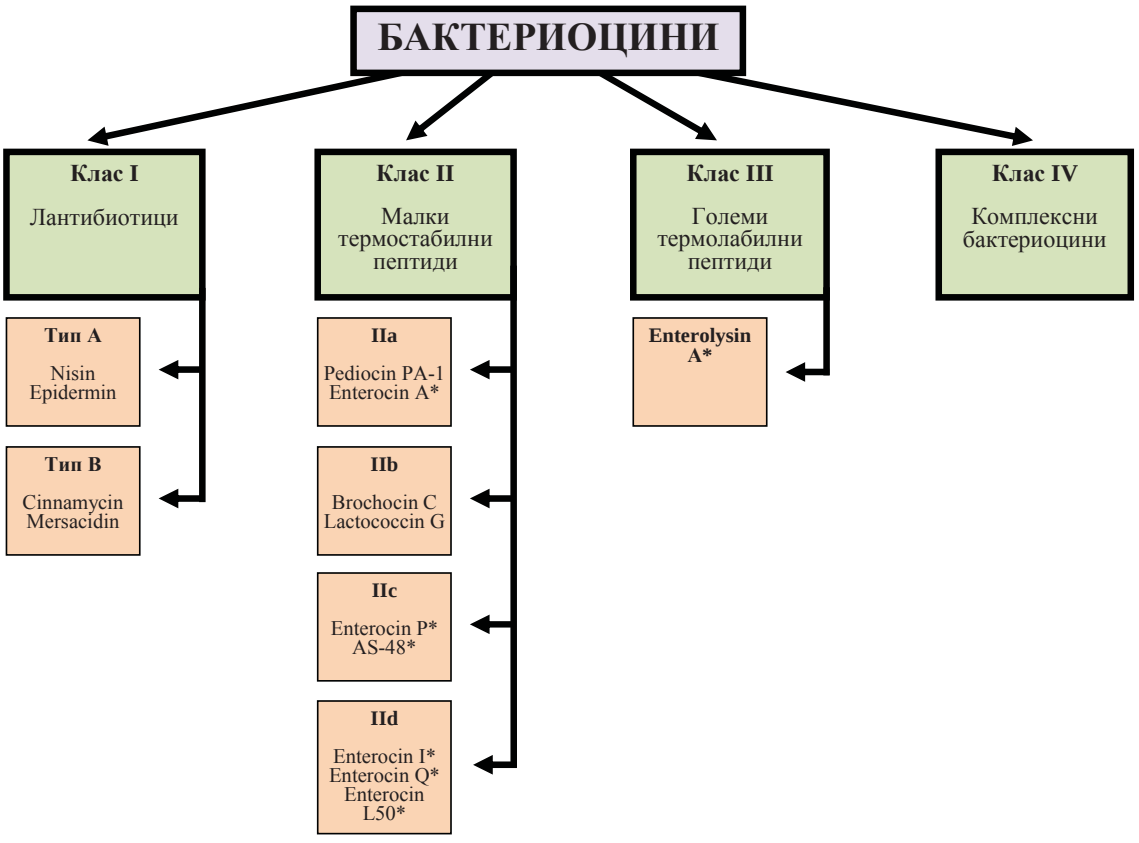
От много години човечеството използва млечнокиселата ферментация като ефективен метод за продължително съхранение на хранителни продукти. Консервиращият ефект се дължи на големи количества млечна киселина, получени при ферментационния процес. През миналия век постепенно било изяснено, че този ефект е резултат от производството на антимикробни пептиди от млечнокиселите бактерии, наречени бактериоцини [24].

Бактериоцините са хетерогенна група от антибактериални пептиди, които инхибират щамове и видове, обикновено, но не винаги, близки до продуциращите ги бактерии [75]. Те инхибират растежа или унищожават съответния бактерий, въздействат на мембранната пропускливост или дори се намесват в есенциални за клетката процеси, като ДНК репликация и транслация [6].

Млечнокиселите бактерии (LAB) са важни организми заради фементативните им способности и тяхното положително влияние върху здравето [31]. Към LAB спадат: лактобацили, лактококи, педиококи, леуконосток, карнобактерии, стрептококи, както и обсъжданите в настоящия обзор ентерококи [56]. Те се употребяват като нетоксични биоконсервиращи агенти при индустриалното производство на храна за хора и животни поради факта, че потискат растежа на патогенни и разграждащи бактерии [13] чрез производство на бактериоцини или бактериални продукти, получени при ферментацията на лактоза [47]. Тъй като са част от нормалната микробна флора на храната, те се използват не само при производството на храни, но са и значителна част от интестиналната флора на птиците и бозайниците, включително и при хората [20].

В зависимост от свойствата, посттранслационните модификации, които претърпяват, както и броя на пептидите, изграждащи зрялата молекула, бактериоцините могат да се разделят на четири класа (фиг. 2): клас I – лантибиотици, клас II – малки, термостабилни пептиди, клас III – високомолекулни, термолабилни бактериоцини, и клас IV – комплексни бактериоцини (включващи и небелтъчна – липидна или въглехидратна, съставка) [1].

Бактериоцините, произвеждани от представители на род *Enterococcus,* се наричат ентероцини [81] и се отнасят към първите три класа.



**Забележка*: Бактериоцини, продуцирани от ентерококите

Фиг. 2. Класификация на бактериоцините на базата на тяхната структура и свойства

Клас I

Лантибиотиците представляват група от посттранслационно модифицирани малки катионни, хидрофобни, термостабилни пептиди, които съдържат необичайни аминокиселини, напр. тиоетерни аминокиселини лантион и β-метиллантион [3]. Тези аминокиселини притежават електрофилни центрове, които ги правят способни да реагират с намиращи се в съседство цистеинови остатъци. Действието на бактериоцините от клас I е насочено преди всичко към Грам-положителни бактерии. Повечето лантибиотици не проявяват бактерицидно действие спрямо Грам-отрицателни видове [1]. Разделят се на два типа:

- Тип А – дълги линейни пептиди [24]. Бактерицидното им действие се дължи на формиране на пори в бактериалната цитоплазмена мембрана [68].
- Тип В – циклични пептиди. Те блокират изграждането на клетъчната стена, като инхибират определени ензими, формирайки здрави комплекси с някои мембранносвързани техни субстрати [33].

Клас II

Това са малки катионни, хидрофобни, термостабилни пептиди, които не са посттранслационно модифицирани. Те се разделят на четири подкласа:

- Подклас IIa – педиоцин-подобни бактериоцини със силен антилистериозен ефект, притежаващи последователността YGNGV в N-терминалния край [3], порообразуващи агенти.
- Подклас IIb – двупептидни бактериоцини, чиято бактерицидност се дължи на синергичното действие на два различни пептида, кодирани от два различни гена. По правило двата пептида поотделно не показват или показват съвсем слаба цитотоксична активност [1].
- Подклас IIc или sec-зависими – използват общия секреторен път, но с различен механизъм на експорт и процесинг [1]. Един от най-добре характеризираните sec-зависими бактериоцини е ентероцин P [14]. Той се произвежда от някои щамове *E. faecium* и инхибира множество патогенни Грам-положителни бактерии, развалящи редица хранителни продукти, *като Listeria monocytogenes, S. aureus, Clostridium botulinum* и *Clostridium perfringens* [1].
- Подклас IId – къси, немодифицирани, термостабилни бактериоцини, които показват необичайни характеристики. При тях не се открива никакъв сигнален или друг тип лидерен пептид, който би подсказал механизма на секретиране извън клетката [1]. Първият описан представител на този подклас е ентероцин I [29]. Той показва широк инхибиторен спектър, включващ повечето Грам-положителни бактерии. Ентероцин I силно инхибира развитието на *L. monocytogenes* и много щамове *Lactococcus* [1].

Клас III

Включва големи, хидрофилни, термолабилни протеини [3]. Установено е, че при значителна част от тях бактерицидното действие не се дължи на порообразуване, а на инхибиране на някои биосинтетични процеси в клетката, най-често на нуклеиновите киселини [1].

Обикновено LAB продуцират само по един бактериоцин. Съществуват множество доклади за щамове, които произвеждат повече от един. Като примери за производство на два бактериоцина могат да бъдат посочени ентероцин А и ентероцин В от щамове *E. faecium* [1]. Те притежават широк и сходен инхибиторен спектър. Проучвания показват, че ефективността на бактериоцините поотделно може да бъде ограничена от факта, че резистентни таргетни бактерии се появяват значително често, но комбинацията на ентероцин А и В е ефективен способ за справяне с проблема на резистентността [24].

Друг добре проучен бактериоцин при ентерококите е ентеролизин А. Той принадлежи към клас III бактериоцини. Секвенционен анализ показва, че ентеролизин А се състои от два отделни домейна: N-терминален каталитичен домейн и от С-терминален, субстрат-разпознаващ домейн. Ентеролизин А показва идентичност с ензимите, разрушаващи клетъчната стена, продуцирани от различни Грам-положителни бактерии. В направените проучвания всички чувствителни бактерии притежават пептидната последователност L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala в техния пептидогликан. Хидролизирането на пептидната връзка в тази последователност от ентеролизин А предполага неговия механизъм на действие [56].

ЕКСПРЕСИЯ НА ФАКТОРИ НА ВИРУЛЕНТНОСТ И БАКТЕРИОЦИНИ ПРИ КЛИНИЧНОЗНАЧИМИ ЕНТЕРОКОКИ

Както личи от направения преглед, ентерококите разполагат с многобройни фактори на вирулентността и бактериоцини. В литературата съществуват данни за експресията им предимно при бозайниците и птиците. Оскъдни са данните за синтеза на бактериоцини в щамове с човешки произход. Представляват значителен интерес експресията и разпределението на факторите на вирулентност и на бактериоцини при ентерококи, изолирани като нормална флора и при щамове, причиняващи локални и системни инфекции при човека.

Проучвания върху ентерококи, изолирани от чревно съдържимо на гълъби, показват, че *E. faecium* е видът с най-висока продукция на цитокини и най-висока антибактериална активност, следван от *E. faecalis* и *Enterococcus columbae.* При *E. faecalis* са установени по-голям брой фактори на вирулентност, докато при *E. faecium* се доказва само efaA фимбриен адхезин, а при *E. columbae* нито един [48]. Други подобни изследвания на фецес от домашни птици, направени при *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* и *E. hirae* показват присъствието на най-малко два гена за вирулентност при всички изолати *E. faecalis*, като *cpd* (секс феромон) и *gel*E (желатиназа) гените се срещат с най-голяма честота, следвани от по-редките *ace, agg, fsr* и *esp*. При другите видове не са открити гени за вирулентност. За разлика от откритото голямо разнообразие от гени за фактори на вирулентност при изолатите *E. faecalis* от домашни птици, гените за бактериоцини били асоциирани повече с вида *E. faecium* [60].

Направените проучвания върху ентерококови изолати, получени от храни от животински произход – предимно мляко и сирене, демонстрират противоречиви данни. От една страна, ентерококите могат да бъдат използвани като консерванти заради продуцираните от тях бактериоцини, но от друга, те притежават множество фактори на вирулентност [51]. *E. faecalis* и *E. faecium* могат да бъдат изолирани и от други храни като риба, наденици, говеждо и свинско месо, като продуктите от животински произход са често контаминирани с ентерококи, които могат да оцелеят при термична обработка [28].

Продуциращи бактериоцини *E. faecalis* са изолирани от различни възпалителни процеси в устната кухина. Над 90% от щамовете експресират *efa*A и *esp* гени за вирулентност и само някои са имали желатиназна (10%) и хемолитична (16,7%) активност. Интерес представлява фактът, че тези бактериоцини са насочени повече срещу други щамове ентерококи, отколкото срещу оралните видове като алфа-хемолитични стрептококи и лактобацили [19].

Широкото разпространение на гените, кодиращи разнообразни фактори на вирулентност и продукция на бактериоцини, изисква мониторинг на клиничнозначимите ентерококи, с цел оценяване на техните патогенни свойства [67].

Заключение

Смятани преди за безобидни бактерии, естествено представени в организма на човека и бозайниците, ентерококите много бързо се превръщат в нозокомиални патогени с множествена резистентност и способност да причиняват животозастрашаващи инфекции [33]. Поради голямата си устойчивост в околната среда, вродената си лекарствена резистентност и богатия набор от фактори на вирулентност, те се нареждат сред водещите причинители на заболявания с различна тежест и патогенеза.

Последните две десетилетия показват нарастващата икономическа важност на нозокомиалните инфекции. Продължителните и скъпоструващи медицински грижи налагат познаване факторите на патогенност, бактериоцините и тяхното разпределение в патогенните за човека и животните ентерококи. Необходимо е преосмисляне на стратегията за контрол на разпространението на тези бактерии, което се налага и от нарастване на тяхната антибиотична резистентност. Добрата колаборация между микробиолози и фармацевти, наличието на информационни системи и програми за ограничаване на инфекциите са стъпки към постигането на желаната цел.

Библиография

1. Димов, С. Бактериоцини. Част 2. Бактериоцини: Общ преглед и класификация. С., Ергон, 2009, 18-42.
2. Средкова, М. Терапевтично проблемни ентерококи. Глава 3. Клонална структура на ентерококите. Плевен, Изд. център МУ – Плевен, 2012, 50-60.
3. Annamalai, N.et al. Enterocin from Enterococcus faecium isolated from mangrove environment. – Afr. J. Biotechnol., 8, 2009, № 22, 6311-6316.
4. Baddour, L. M. et al. Microbial adherence. – In: Principles and practice of infectious diseases. G. L. Mandell, R. G. Douglas Jr. and J. E. Bennett. (Eds.). New York, Churchill Livingstone, 1990, 9-25.
5. Barrall, D. T. et al. Enterococcal bacteremia in surgical patients. – Arch. Surg., 120, 1985, № 1, 57-63.
6. Bennick, M. H. J. et al. A novel bacteriocin with a YGNGV motif from vegetable-associated Enterococus mundtii: full characterization and interaction with target organisms. – Biochim. Biophys. Acta, 1373, 1998, № 1, 47-58.
7. Bhakdi, S. P et al. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. – Infect. Immun., 59, 1991, № 12, 4614-4620.
8. Bleiweis, A. S. et L. N. Zimmerman. Properties of proteinase from Streptococcus faecalis var. liquefaciens. – J. Bacteriol., 88, 1964, 653-659.
9. Borgmann, S. et al. Two episodes of vancomycin-resistant Enterococcus faecium outbreaks caused by two genetically different clones in a newborn intensive care unit. – Int. J. Hyg. Environ Health, 207, 2004, № 4, 386-389.
10. Boulanger, J. M., E. L. Ford-Jones et A. G. Matlow. Enterococcal bacteremia in a pediatric institution: a four-year review. – Rev. Infect. Dis., 13, 1991, № 5, 847-856.
11. Casadevall, A. et L. Pirofski. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. – J. Water Health, 2009, 07.S1.
12. Chung, Y. J. et J. N. Hansen. Determination of the sequence of spaE and identification of a promotor in the subtilisin (spa) operon in Bacillus subtilis. – J. Bacteriol., 174, 1992, № 20, 6699-6702.

13. C i n t a s , L. M. et al. Biochemical and genetic evidence that Enterococcus faecium L.50 products enterocins P, and a novel bacteriocin secreated without an N-terminal extention termed enterocin, Q-- J. Bacteriol., 182, 2000, № 23, 6806-6814.
14. C i n t a s , L. M. et al. Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from Enterococcus faecium P13 with a broad antimicrobial spectrum. – Appl. Envinron Microbiol., 63, 1997, № 11, 4321-4330.
15. C l e w e l l , D. B. et K. E. Weaver. Sex pheromones and plasmid transfer in Enterococcus faecalis. – Plasmid, 21, 1989, № 3, 175-184.
16. C l e w e l l , Y. D. B., R. A. Segarra et M. S. Gilmore. Genetic analysis of the pADl hemolysin/bacteriocin determinant in Enterococcus faecalis: Tn917 insertional mutagenesis and cloning. – J. Bacteriol., 172, 1990, № 1, 155-163.
17. C r a w f o r d , I. et C. Russell. Comparative adhesion of seven species of streptococci isolated from the blood of patients with sub-acute bacterial endocarditis to fibrin-platelet clots in vitro. – J. Appl. Bacteriol., 60, 1986, № 2, 127-133.
18. C r o s s , C. E. et al. Oxygen radicals and human disease. – Ann. Intern. Med., 107, 1987, № 4, 526-545.
19. D a h l é n , G. et al. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. – J. Oral Microbiol., 2012, № 4.
20. D i m o v , S. G., S. Peykov, D. Raykova et al. A newly discovered bacteriocin produced by Enterococcus faecalis 3915. – Benefic. Microb., 1, 2010, № 1, 43-51.
21. D o m i g , K. J., H. K. Mayer et W. Kneifel. Methods used for isolation, enumeration, characterization and identification of Enterococcus spp.: 1. Media for isolation and enumeration. – Int. J. Food Microbiol., 88, 2003, № 2-3, 147-164.
22. D u n n y , G. M., B. A. Leonard et P. J. Hedberg. Pheromone-inducible conjugation in Enterococcus faecalis: Interbacterial and host-parasite chemical communication. – J. Bacteriol., 177, 1995, № 4, 871-876.
23. E a t o n , T. J. et M. J. Gasson. A variant enterococcal surface protein Esp(fm) in Enterococcus faecium; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. – FEMS Microbiol. Lett., 216, 2002, № 2, 269-275.
24. E i j s i n k , V. G. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication. – Antonie van Leeuwenhoek, 81, 2002, № 1-4, 639-654.
25. E l i o p o u l o s , G. M. Enterococcal endocarditis. – In: Infective endocarditis. D. Kaye (Ed.). New York, Raven Press, 1992, 209-223.
26. F a t h , M. J. et R. Kolter. ABC transporters: bacterial exporters. – Microbiol. Rev., 57, 1993, № 4, 995-1017.
27. F e l m i n g h a m , D. et al. Enterococcus species in urinary tract infection. – Clin. Infect. Dis., 15, 1992, № 2, 295-301.
28. F i s h e r , K. et C. Phillips. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. – Microbiology, 155, 2009, № 6, 1749-1757.
29. F l o r i a n o , B., J. L. Ruiz-Barba et R. Jimenez-Diaz. Purification and genetic characterization of Enterocin I from Enterococcus faecium 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. – Appl. Environ Microbiol., 64, 1998, № 12, 4883-4890.
30. F o x , J. et H. D. Isenberg. Antibiotic resistance of microorganisms isolated from root canals. – Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 23, 1967, № 2, 230-235.
31. G i l l i l a n d , S. E. Health and Nutritional benefits from lactic acid bacteria. – FEMS Microbiol. Rev., 87, 1990, № 1-2, 175-178.
32. G u z m a n , C. A. et al. Serum-dependent expression of Enterococcus faecalis adhesins involved in the colonization of heart cells. – Microb. Pathol., 11, 1991, № 6, 399-409.
33. H o s o d a , K. et al. Structure determination of an immunopotentiator peptide, cinnamycin, complexed with lysophosphatidylethanolamine by 1H-NMR1. – J. Biochem., 119, 1996, № 2, 226-230.
34. http://www.ukessays.com/essays/biology/enterococci.php
35. H u y c k e , M. M., W. Joyce et M. F. Wack. Augmented production of extracellular superoxide by blood isolates of Enterococcus faecalis. – J. Infect. Dis., 173, 1996, № 3, 743-746.
36. H u y c k e , M. M. et M. Gilmore. In vivo survival of Enterococcus faecalis is enhanced by extracellular superoxide production. – Adv. Exp. Med. Biol., 418, 1997, 781-784.
37. H y n e s , W. L. et S. L. Walton. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. – FEMS Microbiol. Lett., 183, 2000, № 2, 201-207.
38. I k e , Y. et D. Clewell. Evidence that the hemolysin/bacteriocin phenotype of Enterococcus faecalis subsp. zymogenes can be determined by plasmids in different incompatibility groups as well as by the chromosome. – J. Bacteriol., 174, 1992, № 24, 8172-8177.
39. J e t t , B. D., M. M. Huycke et M. S. Gilmore. Virulence of enterococci. – Clin. Microbiol. Rev., 7, 1994, № 4, 462-478.
40. J o n e s , R. N. Gram-positive superinfections following beta-lactam chemotherapy: the significance of the enterococcus. – Infection, 13, 1985, Suppl. 1, S81-S88.
41. J o n e s , W. G. et al. Enterococcal burn sepsis: a highly lethal complication in severely burned patients. – Arch. Surg., 121, 1986, № 6, 649-652.
42. K a y a o g l u , G. et D. Ørstavik. Virulence factors of Enterococcus faecalis: Relationship to endodontic disease. – Crit. Rev. Oral Biol. Med., 15, 2004, № 5, 308-320.
43. K a y s e r , F. H. et al. Bacteria as human pathogens. – In: Medical Microbiology Flexibook. Thieme, 2005, 234-244.
44. K h a r d o r i , N. et al. Infections associated with biliary drainage procedures in patients with cancer. – Rev. Infect. Dis., 13, 1991, № 4, 587-591.
45. K o c h , S. et al. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. – Vaccine, 22, 2004, № 7, 822-830.
46. L e a v i s , H. et al. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the esp virulence gene of Enterococcus faecium and associated with epidemicity. – J. Bacteriol., 186, 2004, № 3, 672-682.
47. L i n d g r e n , S. W. et W. J. Dobrogosz. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. – FEMS Microbiol. Rev., 87, 1990, № 1-2, 149-164.
48. M a r t í n , M. et al. Genes encoding bacteriocins and their expression and potential virulence factors of Enterococci isolated from wood pigeons (Columba palumbus). – J. Food Prot., 69, 2006, № 3, 520-531.
49. M a t h e w , S. et T. Boopathy. Enterococcus faecalis – an endodontic challenge. – J. Ind. Acad. Dent. Spec., 1, 2010, № 4, 46-48.
50. M i c r o b i o l o g y Updates. http://microbiologyupdates.blogspot.com/2012/01/nosocomial-transmission-and-risk.html.
51. M o r a e s , P. M., L. M. Perin, S. D. Todorov et al. Bacteriocinogenic and virulence potential of Enterococcus isolates obtained from raw milk and cheese. – J. Appl. Microbiol., 113, 2012, № 2, 318-328.
52. M o r e n o , F. et al. The role and application of enterococci in food and health. – Int. J. Food Microbiol., 106, 2006, № 1, 1-24.
53. M u r r a y , B. E. et al. Intrahospital spread of a single gentamicinresistant, B-lactamase-producing strain of Enterococcus faecalis in Argentina. – Antimicrob. Agents Chemother., 36, 1992, № 1, 230-232.

54. N a l l a p a r e d d y , S. R. et al. Endocarditis and biofilm associated pili of Enterococcus faecalis. – J. Clin. Invest., 116, 2006, № 10, 2799-2807.
55. N a l l a p a r e d d y , S. R. et al. Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. – Infect. Immun., 68, 2000, № 9, 5218-5224.
56. N i l s e n , T., I. F. Nes et H. Holo. Enterolysin A: a cell wall-degrading bacteriocin from Enterococcus faecalis LMG 2333. – Appl. Environ Microbiol., 69, 2003, № 5, 2975-2984.
57. O l m s t e d , S. B. et al. Role of the pheromone-inducible surface protein Asc10 in mating aggregate formation and conjugal transfer of the Enterococcus faecalis plasmid pcf10. – J. Bacteriol., 173, 1991, № 23, 7665-7672.
58. P a r k , S. Y. et al. Extracellular gelatinase of Enterococcus faecalis destroys a defense system in insect hemolymph and human serum. – Infect. Immun., 75, 2007, № 4, 1861-1869.
59. P a r k , S. et al. Immune evasion of Enterococcus faecalis by an extracellular gelatinase that cleaves C3 and iC3b. – J. Immunol., 181, 2008, № 9, 6328-6336.
60. P o e t a , P. et al. Detection of genes encoding virulence factors and bacteriocins in fecal enterococci of poultry in Portugal. – Avian Dis., 50, 2006, № 1, 64-68.
61. Q i n , X., K. V. Weinstock et B. E. Murray. Effects of Enterococcus faecalis fsr genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. – Infect. Immun., 68, 2000, № 5, 2579-2586.
62. R a t h n a y a k e , I. U. Molecular characterisation of environmental enterococci derived from water samples and assesment of associated public health hazards. A thesis submitted in partial fulfillment for the requirements for the degree of Doctor of Philosophy, Queensland University of Technology, 2011.
63. R i c h , R. L. et al. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from Enterococcus faecalis. – J. Biol. Chem., 274, 1999, № 38, 26939-26945.
64. R i c h e t , H. et al. Prospective multicenter study of vascular-catheter-related complications and risk factors for positive central-catheter cultures in intensive care unit patients. – J. Clin. Microbiol., 28, 1990, № 11, 2520-2525.
65. R o z d z i n s k i , E. et al. Aggregation substance-mediated adherence of Enterococcus faecalis to immobilized extracellular matrix proteins. – Microb. Path., 30, 2001, № 4, 211-220.
66. R u o f f , K. L. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. – J. Clin. Microbiol., 28, 1990, № 3, 435-437.
67. S a b i a , C. et al. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. – J. Appl. Microbiol., 104, 2008, № 4, 970-979.
68. S a h l , H. G. Nisin. – In: Nisin and Novel Lantibiotics. G. Jung et H. G. Sahl. (Eds.). Leiden, Escom, 1991, 347-358.
69. S a l m i n e n , S., A. V. Wright et A. Ouwehand. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects (Third ed.). New York, Mercel Dekker, 2004.
70. S a v a , I. G., E. Heikens et J. Huebner. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. Review. – Clin. Microbiol. Infect., 16, 2010, № 6, 533-540.
71. S c h l i e v e r t , P. et al. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in a rabbit model of Enterococcus faecalis endocarditis. – Adv. Exp. Med. Biol., 418, 1997, 789-791.
72. S e g a r r a , R. A. et al. Molecular characterization of the Enterococcus faecalis cytolysin activator. – Infect. Immun., 59, 1991, № 4, 1239-1246.
73. S i n g h , K. V., S. R. Nallapareddy et B. A. Murrat. Importance of the ebp (endocarditis-and biofilm-associated pilus) lucus in the pathogenesis of Enterococcus faecalis ascending urinary tract infection. – J. Infect. Dis., 195, 2007, № 11, 1671-1677.
74. S i n g h , K. V. et al. Importance of the collagen adhesin Ace in pathogenesis and protection against Enterococcus faecalis experimental endocarditis. – PLoS Pathog., 6, 2010, № 1, e1000716.
75. T a g g , J. R., A. S. Dajani et L. W. Wannamaker. Bacteriocins of gram-positive bacteria. – Bacteriol. Rev., 40, 1976, № 3, 722-756.
76. T e n d o l k a r , P. M., A. S. Baghdayan et N. Shankar. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. – Cell. Mol. Life Sci., 60, 2003, № 12, 2622-2636.
77. T e n g , F. et al. Further characterization of the epa gene cluster and Epa polysaccharides of Enterococcus faecalis. – Infect. Immun., 77, 2009, № 9, 3759-3767.
78. U p a d h y a y a , G., K. Ravikumar et B. Umapathy. Review of virulence factors of Enterococcus: an emerging nosocomial pathogen. – Ind. J. Med. Microbiol., 27, 2009, № 4, 301-305.
79. W a a r , K. et al. Pathogenesis of Enterococcus faecalis infections. PhD Thesis, University of Groningen, Printed by Ponsen & Looijen BV Wageningen, 2004.
80. W i c k e n , A. J. et K. W. Knox. Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. – Science, 187, 1975, № 4182, 1161-1167.
81. W i l a i p u n , P. et al. The Two-synergistic peptide bacteriocins produced by Enterococcus faecium NKR-5-3 isolated from Thai Fermented Fish (Pla-ra). – Sci. Asia, 30, 2004, 115-122.

Постъпила за печат на 25 януари 2013 г.