

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИЦИТОКИНОВОЙ АКТИВНОСТИ *Enterococcus* spp., ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ

Энтерококки являются типичными синантропными микроорганизмами, которые в процессе эволюции хорошо приспособились к выживанию в условиях макроорганизма, в том числе благодаря способности инактивировать факторы врожденного иммунитета. Обладая факторами персистенции, бактерии рода *Enterococcus* могут выступать в роли этиологического фактора эндогенных инфекционно-воспалительных заболеваний животных, возникающих на фоне снижения естественной резистентности макроорганизма. Характеристике персистентных свойств энтерококков различного происхождения посвящен ряд работ, однако отдельные свойства энтерококков, в частности, антицитокиновая активность, еще не охарактеризованы.

В связи с этим изучена антицитокиновая активность микроорганизмов рода *Enterococcus*, изолированных от здоровых и больных инфекционно-воспалительными заболеваниями (острый и хронический эндометрит, мастит, абсцессы мягких тканей) сельскохозяйственных животных и показана высокая распространенность признака. Установлен более высокий уровень выраженности антицитокиновой активности в отношении ИЛ-4 и ИЛ-8 у изолятов энтерококков, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях по сравнению со штаммами, выделенными из кишечника здоровых животных. Экспрессия антицитокиновой активности у клинических энтерококков была в 1,5–1,7 раз выше, чем у кишечных изолятов ($p < 0,05$). Данные о высоком уровне выраженности антицитокиновой активности у клинических изолятов энтерококков по сравнению с кишечными, свидетельствуют о возможном влиянии их экзометаболитов на локальный цитокиновый баланс, что поддерживает воспалительный процесс.

Таким образом, полученные результаты о модификации энтерококками различного происхождения динамики цитокинов, могут быть использованы для дифференциации патогенных штаммов *Enterococcus* spp.

Ключевые слова: *Enterococcus* spp., антицитокиновая активность, сельскохозяйственные животные, микрофлора кишечника, инфекционно-воспалительные заболевания.

Энтерококки, являясь условно-патогенными микроорганизмами [14], с одной стороны играют важную роль в обеспечении колонизационной резистентности биотопов [1], а с другой – обладая широким набором факторов вирулентности и персистенции [3], [7], [10], [12] способны вызывать развитие факторных инфекционно-воспалительных заболеваний [4], [9], [13].

Характеристике персистентных свойств энтерококков различного происхождения посвящены работы [6], [8], однако отдельные свойства энтерококков, в частности, антицитокиновая активность (АЦА), еще не охарактеризованы. В связи с вышеизложенным, целью данной работы явилось изучение распространенности и выраженности антицитокиновой активности у энтерококков как представителей симбиотической микрофлоры кишечника и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний у сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

В работе использовано 77 штаммов бактерий рода *Enterococcus*, из них 50 изолятов выделено из кишечника здоровых сельскохозяйственных животных и 27 штаммов – от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями – экскрет половых органов самок (коров, собак, кошек), больных острым и хроническим эндометритом, секрет молочных желез при маститах коров, гнойный экссудат при абсцессах мягких тканей.

Энтерококки выделяли путем посева исследуемого материала на желчно-эскулиновый агар с азидом натрия (HiMedia, Индия). Штаммы идентифицировали при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) по наличию видоспецифических генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы [11, с. 3559–3563]. Антицитокиновую активность (АЦА) определяли по [2, с. 56–57].

Статистическую обработку проводили с помощью параметрических методов [5, с. 37–45].

Результаты и обсуждение

Из 50 штаммов энтерококков, изолированных от здоровых животных 13 (26%) были отнесены к виду *E. hirae*, по 12 (24%) штаммов – к видам *E. faecium* и *E. durans*, 6 (12%) изолятов – к виду *E. faecalis*, 5 (10%) штаммов – к виду *E. flavescens* и 2 (4%) штамма – к виду *E. casseliflavus*.

Из 27 штаммов *Enterococcus spp.*, изолированных от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, 14 (51,8%) изолятов были отнесены к виду *E. faecalis*, по 4 (14,8%) штамма – к видам *E. faecium* и *E. durans*, по 2 (7,4%) культуры – к видам *E. flavescens* и *E. casseliflavus*, 1 (3,8%) штамм – к виду *E. hirae*.

Распространенность антицитокиновой активности в отношении ИЛ-4 у фекальных изолятов энтерококков составила 90%. Выраженность признака в отношении ИЛ-4 у фекальных изолятов колебалась от $3,6 \pm 0,5\%$ до $48,3 \pm 2,9\%$ и в среднем составила $24,01 \pm 12\%$.

Среднее значение АЦА в отношении ИЛ-4 у фекальных изолятов *E. hirae* было равно $27,1 \pm 5\%$, *E. faecium* – $28,5 \pm 4,4\%$, *E. durans* – $22,5 \pm 3,2\%$, *E. faecalis* – $13,8 \pm 2,2\%$, *E. flavescens* – $22,9 \pm 4,6\%$ и *E. casseliflavus* – $19,3 \pm 6\%$.

При изучении способности к инактивации ИЛ-4 у клинических изолятов энтерококков установлено наличие признака у 82,1% исследованных штаммов. Выраженность АЦА у клинических штаммов колебалась от $18,1 \pm 3\%$ до $71,1 \pm 3,2\%$ и в среднем составила $42,3 \pm 19\%$.

Экспрессия признака в среднем у культур *E. faecalis* была равна $40,1 \pm 6\%$, у изолятов *E. faecium* – $42,1 \pm 7,4\%$, у штаммов *E. durans* – $65,6 \pm 5,2\%$, *E. flavescens* – $62 \pm 9\%$, *E. casseliflavus* – $12,1 \pm 4\%$.

Способность деградировать ИЛ-8 была присуща 92% фекальных изолятов *Enterococcus spp.* Диапазон экспрессии признака варьировал в пределах от $11,7 \pm 3,2\%$ до $55,6 \pm 3,7\%$, среднее значение признака по роду составило $38,5 \pm 6\%$.

У фекальных изолятов *E. hirae* выраженность АЦА была равна $38,7 \pm 6\%$, *E. faecium* – $37,2 \pm 3,4\%$, *E. durans* – $40,8 \pm 6,2\%$, *E. faeca-*

lis – $31,6 \pm 4,2\%$, *E. flavescens* – $38,8 \pm 6,6\%$ и *E. casseliflavus* – $22,8 \pm 9\%$.

Способностью к инактивации ИЛ-8 обладали все клинические изоляты *Enterococcus spp.*, за исключением *E. hirae*. Пенетрантность исследуемого свойства составила 85,7%. Экспрессия признака колебалась от $24,3 \pm 3,2\%$ до $85,4 \pm 15\%$. Средние показатели антицитокиновой активности оказались равными $57,3 \pm 9\%$.

Выраженность АЦА в отношении ИЛ-8 у клинических изолятов *E. faecalis* в среднем была равна $66,3 \pm 8\%$, у штаммов *E. faecium* – $44,3 \pm 5,4\%$, *E. durans* – $76,2 \pm 7,2\%$, *E. flavescens* – $32,9 \pm 4,2\%$, *E. casseliflavus* – $30,5 \pm 7\%$.

Клинический штамм *E. hirae* не обладал антицитокиновой активностью в отношении изученных интерлейкинов.

Таким образом, проведенные исследования выявили различия в уровне выраженности антицитокиновой активности в отношении ИЛ-4 и ИЛ-8 у изолятов энтерококков, выделенных у здоровых животных из кишечника и больных ИВЗ. Сравнение изученных свойств показало, что у энтерококков, выделенных из патологического материала, выраженность АЦА в 1,5–1,7 раз выше, чем у энтерококков, выделенных из кишечника ($p < 0,05$).

Заключение

В результате проведенного нами исследования установлена способность энтерококков, выделенных из кишечника здоровых животных и при факторных заболеваниях сельскохозяйственных животных, изменять в условиях *in vitro* концентрацию цитокинов ИЛ-4 и ИЛ-8.

Полученные в настоящей работе данные о высоком уровне выраженности АЦА у изолятов энтерококков, выделенных при инфекционно-воспалительных заболеваниях, по сравнению с кишечными изолятами, свидетельствуют о возможном влиянии их экзометаболитов на локальный цитокиновый баланс [2], что поддерживает воспалительный процесс. Полученные данные о модификации энтерококками различного происхождения динамики цитокинов, могут быть использованы для дифференциации патогенных штаммов.

03.10.2017

Список литературы:

1. Бондаренко, В.М. Симбиотические энтерококки и проблемы энтерококковой оппортунистической инфекции / В.М. Бондаренко, А.Н. Суворов. - М.: Медицина, 2007. - 30 с.
2. Антицитокиновая активность микроорганизмов / О.В. Бухарин, Н.Б. Перунова, И.Н. Чайникова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2011. - № 4. - С. 56-61.
3. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков / О.В. Бухарин, И.В. Вальшева, О.Л. Карташова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2013. - № 3. - С. 13-18.
4. Значимость факторов патогенности условно-патогенных микроорганизмов при оценке их этиологической роли в развитии заболевания / Е.С. Кунилова, Л.А. Краева, Г.Я. Ценева [и др.] // Инфекция и иммунитет. - 2012. - Т. 2. - № 4. - С. 699-704.
5. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высшая школа, 1990. - 352 с.
6. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии / Д.В. Пошвина, Н.Е. Щепитова, М.В. Сычева [и др.] // Ветеринария. - 2015. - № 6. - С. 26-30.
7. Сычева, М.В. Биологические свойства энтерококков различного происхождения / М.В. Сычева, О.Л. Карташова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - № 4. - С. 17-21.
8. Сычева, М.В. Дифференциация клинически значимых штаммов энтерококков от представителей нормальной микрофлоры животных с использованием математических моделей / М.В. Сычева // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. - 2016. - № 1(57). - С. 56-58.
9. Черных, О.Ю. Энтерококковая инфекция нутрий / О.Ю. Черных // Ветеринария. - 2009. - № 1. - С. 22-24.
10. Enterococcus faecalis clones in poultry and in humans with urinary tract infections, Vietnam / L.L. Poulsen, M. Bisgaard, N. Son [et al.] // Emerging Infectious Diseases. - 2012. - Vol. 18. - No. 7. - P. 1096-1100.
11. Jackson, C.R. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci / C.R. Jackson, P.J. Fedorka-Cray, J.B. Barrett // J. Clin. Microbiol. - 2004. - No. 42(8). - P.3558-3565.
12. Kafil, H.S. Spread of Enterococcal Surface Protein in Antibiotic Resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis isolates from Urinary Tract Infections / H.S. Kafil, A.M. Mobarez // Open Microbiol. J. - 2015. - Vol. 26. - No. 9. - P. 14-17.
13. Pomba, C. Treatment of a lower urinary tract infection in a cat caused by a multi-drug methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius and Enterococcus faecalis / C. Pomba, N. Couto, A.J. Moodley // Feline Med. Surg. - 2010. - Vol. 12 - No. 10. - P. 802-806.
14. Yuen, G.J. Enterococcus infection biology: Lessons from invertebrate host models / G.J. Yuen, F.M. Ausubel // J. Microbiol. - 2014. - Vol. 52. - No. 3. - P. 200-210.

Сведения об авторе:

Пашкова Татьяна Михайловна, старший научный сотрудник лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии и заразных болезней Оренбургского государственного аграрного университета 460000 г. Оренбург, ул. Пионерская, д. 11; тел.: 8 (3532)77-44-63, e-mail: pashkova070782@mail.ru