

На правах рукописи

ЩЕПИТОВА НАТАЛЬЯ ЕВГЕНЬЕВНА

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЕКАЛЬНЫХ ИЗОЛЯТОВ
ЭНТЕРОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа –2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Оренбургский государственный аграрный университет».

Научный руководитель:

Сычёва Мария Викторовна,

кандидат биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Оренбургский государственный аграрный университет», заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней;

Официальные оппоненты:

Золотухин Сергей Николаевич,

доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина», профессор кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы;

Галиуллин Альберт Камилович,

доктор ветеринарных наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный аграрный университет».

Защита диссертации состоится 9 октября 2015 года в 15⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03 при ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» по адресу: 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, ауд. 325/2. Тел./факс: +7 (347) 228-08-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО «Башкирский государственный аграрный университет» <http://www.bsau.ru>, а с авторефератом в сети Интернет на официальном сайте Министерства образования и науки Российской Федерации <http://www.vak.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2015 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор сельскохозяйственных наук,
профессор

М.Г. Гиниятуллин

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Бактерии рода *Enterococcus* широко распространены в природе и занимают разнообразные экологические ниши. Энтерококки различных видов являются представителями нормальной микрофлоры пищеварительного тракта млекопитающих, птиц, рептилий и насекомых (Aarestrup F.M. et al., 2002; Gilmore M.S. et al., 2013). Данные микроорганизмы высоко устойчивы к экологическим стрессам и хорошо адаптируются к различным условиям внешней среды, выживая в таких местообитаниях как почва, донные отложения, вода, растения (Badgley B.D. et al., 2010; Ran Q.H. et al., 2013; Staley C. et al., 2014). Являясь типичными молочнокислыми микроорганизмами, энтерококки применяются в производстве традиционных ферментированных продуктов питания (Giraffa G., 2002; Franz C.M. et al., 2003; Ben Omar N. et al., 2004).

Вследствие широкого распространения в природе и наличия целого ряда полезных свойств для макроорганизма (высокая антагонистическая активность в отношении патогенной микрофлоры, обеспечение формирования и поддержания иммунитета, участие в процессах пищеварения, противовоспалительные свойства, витаминообразование), энтерококки зачастую используются в медицине и ветеринарии в качестве пробиотиков (Бондаренко В.М., Суворов А.Н., 2007; Gaggia F. et al., 2010; Franz C.M. et al., 2011).

Непатогенные варианты энтерококков участвуют в колонизационной резистентности кишечного биотопа, продуцируя ряд биологически активных веществ, в том числе бактериоцины (энтероцины) (Foulquié Moreno M.R. et al., 2006). Возросший интерес к бактериоцинпродуцирующим энтерококкам обуславливается свойствами этой группы соединений: широким спектром антимикробного действия (Svetoch E. et al., 2008); активностью в отношении бактериальных патогенов в наномолярных концентрациях (Sang Y., Blecha F., 2008); медленным развитием резистентности к бактериоцинам у микроорганизмов (Lawton E.M. et al., 2007); индукцией иммунных реакций макроорганизма, повышающих его неспецифическую резистентность к инфекционным агентам (Duc le H. et al., 2004).

В то же время бактерии рода *Enterococcus* являются представителями группы условно-патогенных микроорганизмов и выступают в качестве этиологического фактора многих инфекционно-воспалительных заболеваний человека и животных (Arias C.A., Murray V.E., 2008; Hollis A.R. et al., 2008; Poulsen L.L. et al., 2012). Развитию энтерококковых инфекций способствует наличие у изолятов факторов вирулентности, персистенции и антибиотикорезистентности (Бухарин О.В., Валышев А.В., 2012; Hamilton E. et al., 2013; Di Cesare A. et al., 2014; Liu Y. et al., 2014; Soheili S. et al., 2014). Вместе с тем многие из этих факторов являются необходимым условием обеспечения жизнедеятельности данных бактерий, повышающие их шансы выжить в собственном им экотопе (Бухарин О.В. и др., 2002).

Таким образом, энтерококки кишечной микрофлоры, с одной стороны, могут вызывать развитие инфекций, а с другой стороны, проявлять антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных

микроорганизмов, поэтому комплексное изучение биологических свойств фекальных энтерококков, изолированных от животных, представляется актуальным.

Целью настоящего исследования явилось изучение биологических свойств фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных.

Для реализации этой цели были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Изучить видовой состав энтерококков, выделенных из фекалий здоровых сельскохозяйственных животных.

2. Охарактеризовать факторы патогенности, персистенции и антибиотикорезистентности бактерий рода *Enterococcus* на уровне фено- и генотипа.

3. Определить антагонистическую активность и гены бактериоциногении у штаммов энтерококков, оценить влияние факторов макроорганизма на антагонистическую активность культур *Enterococcus* sp. *in vitro*.

4. Изучить антагонистическую активность культур энтерококков *in vivo*.

Научная новизна исследований. Проведён сравнительный анализ видового разнообразия бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из кишечника здоровых животных разных видов. Установлено, что фекальные изоляты энтерококков характеризуются большим разнообразием видов у моногастричных животных, чем у жвачных. Доминирующим видом у полигастричных животных является *E. durans*, у лошадей и свиней – *E. faecium*.

Впервые дана комплексная характеристика биологических свойств фекальных изолятов энтерококков животных по факторам вирулентности, персистенции и антибиотикорезистентности с использованием методов бактериологии и молекулярной биологии. Установлено, что распространённость и выраженность изученных биологических свойств варьирует в зависимости от видовой принадлежности *Enterococcus* sp.

Установлено, что в популяции фекальных энтерококков широко распространена антагонистическая активность в отношении бактерий родов *Listeria* и *Enterococcus*, напрямую коррелирующая с наличием генов бактериоциногении.

На модели экспериментальной инфекции показана возможность использования антагонистически активных энтерококков фекального происхождения в качестве эффективного средства защиты от листериоза.

Создана коллекция антагонистически активных культур *Enterococcus* sp., представляющих практический интерес в качестве основы биопрепаратов пробиотической направленности.

Практическая значимость работы. Полученные данные расширяют теоретические представления о биологических свойствах бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из кишечника здоровых животных.

На основании комплексной характеристики факторов вирулентности, персистенции и антагонизма *in vitro* и *in vivo* из коллекции культур энтерококков отобран штамм *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, депонированный в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры (ГКНМ)

ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского» Роспотребнадзора в качестве перспективного для производства биопрепаратов (справка № 63 от 14 февраля 2014 г.) В настоящее время культура *Enterococcus faecium* Ef79OSAU проходит процедуру патентования.

Методология и методы исследования. При проведении исследований и изложении материала были применены общенаучные и специальные методы: теоретико-методологический анализ литературных источников, микробиологические, биологические, молекулярно-генетические. Использование перечисленных методов и статистический анализ экспериментальных данных обеспечили объективность и достоверность полученных результатов.

Научные положения, выносимые на защиту:

1. Кишечный биотоп продуктивных животных разных видов характеризуется особенностями видового состава бактерий рода *Enterococcus*.
2. Энтерококки, изолированные из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных разных видов, обладают специфичным биофильем.
3. Авирулентные, антагонистически активные энтерококки, выделенные из кишечника животных, могут быть использованы в качестве биопрепаратов для защиты от листериоза.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Диссертационная работа выполнялась в рамках темы открытого плана НИР ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет»: «Биологические свойства условно-патогенной и нормальной микрофлоры организма животных в норме и при патологии» (№ государственной регистрации 0120.1450283).

Апробация работы. Результаты научных исследований доложены и обсуждены на IV Международной научно-практической конференции «Проблемы устойчивости биоресурсов: теория и практика» (Оренбург, 2013); II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство» (Уфа, 2014); VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014» (Москва, 2014); второй Всероссийской молодежной научной школе-конференции «Микробные симбиозы в природных и экспериментальных экосистемах» (Оренбург, 2014); Международной научно-практической конференции «Современные тенденции в развитии овцеводства и козоводства» (Оренбург, 2014); ежегодной областной научно-практической конференции «Молодые ученые Оренбуржья – науке XXI века» (Оренбург, 2014); расширенном заседании кафедры микробиологии и заразных болезней ФГБОУ ВПО «Оренбургский ГАУ» (протокол № 15 от 21 мая 2015 года).

Фрагменты работы были представлены на открытом конкурсе для субъектов малого предпринимательства по программе «СТАРТ-2013» (Ижевск, 2013), на Молодежном инновационном конкурсе «УМНИК-2014» (Оренбург, 2014), на областном конкурсе научно-исследовательских работ и отмечены премией Губернатора Оренбургской области для талантливой молодежи (2014).

Материалы диссертации были представлены на II и III этапах Всероссийского конкурса на лучшую научную работу среди студентов, аспирантов и молодых ученых высших учебных заведений Министерства сельского хозяйства РФ (Киров, 2015; Оренбург, 2015) и отмечены дипломами I степени.

Публикации. Основные научные результаты по теме диссертации опубликованы в десяти печатных работах, из них шесть – в изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Объём и структура диссертации. Работа изложена на 152 страницах компьютерной вёрстки, содержит 5 таблиц и 21 рисунок. Диссертация состоит из общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, библиографического списка, который включает 308 наименований, в том числе 275 работ иностранных авторов.

2 СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материал и методы исследования

Работа проводилась в период с 2012 по 2015 гг. на базе лаборатории кафедры микробиологии и заразных болезней и вивария ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет», в лаборатории по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН, а также в условиях учебного хозяйства Покровского сельскохозяйственного колледжа – филиала ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный аграрный университет»; СПК колхоз «Россия» Оренбургского района Оренбургской области; СПК колхоз «Урал» Оренбургского района Оренбургской области.

Схема исследования представлена на рисунке 1.

В работе были изучены 162 штамма бактерий рода *Enterococcus*, выделенные из фекалий клинически здоровых сельскохозяйственных животных, в том числе 54 – из фекалий крупного рогатого скота; 21 штамм – из фекалий коз; 51 – из фекалий свиней и 36 культур – из фекалий лошадей.

Отбор фекалий производился в стерильные одноразовые герметичные контейнеры с дальнейшей транспортировкой в условия лаборатории. Микроорганизмы выделяли с использованием классических бактериологических методик. Штаммы энтерококков идентифицировали до вида при помощи мультиплексной (мультилокусной) полимеразной цепной реакции (ПЦР) по наличию видоспецифических генов, кодирующих синтез супероксиддисмутазы (Jackson C.R. et al., 2004).

Гемолитическую и желатиназную активности культур *Enterococcus* sp. определяли по методам М.О. Биргера (1982). Активность протеаз фекальных изолятов энтерококков выявляли по убыли альбумина после инкубации с исследуемыми штаммами биуретовым методом (Нетрусов А.И. и др., 2005). Генетические детерминанты известных факторов вирулентности: цитолизина – *cylA*, *cylB*, *cylM*, желатиназа – *gelE*, сериновая протеаза – *sprE*, гиалуронидаза – *hyl*, поверхностные белки, участвующие в адгезии – *asa*, белки-

иммуносупрессоры – *esp*, определяли с помощью ПЦР (Semedo T. et al., 2003; Vankerckhoven V. et al., 2004; Reviriego C. et al., 2005).



Рисунок 1 – Общая схема исследования

Изучение антилизоцимной (АЛА) и антикарнозиновой (АКрА) активностей энтерококков осуществляли с помощью фотометрических методов О.В. Бухарина с соавторами (1997, 1999). Образование биоплёнок изолятами *Enterococcus* sp. оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных полистироловых планшетах (O'Toole G. et al., 2000).

Чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) определяли диско-диффузионным методом (МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»). С использованием ПЦР-анализа у фекальных изолятов

энтерококков изучали гены, кодирующие резистентность к аминогликозидам (Vakulenko S. et al., 2003), тетрациклам (De Leener E. et al., 2004) и гликопептидам (Dutka-Malen S. et al., 1995).

Наличие антагонистической активности у бактерий рода *Enterococcus* определяли чашечным методом по принципу отсроченного антагонизма (Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г., 1966). В качестве тест-культур использовали патогенные и условно-патогенные бактерии: *Listeria monocytogenes* ($n=8$), *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *Staphylococcus aureus* ($n=5$), *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* ($n=5$), *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxitoca*, *Enterobacter cloacae*, *Moraxella morganii* и грибы рода *Candida* ($n=5$).

Гены, кодирующие синтез известных энтероцинов: энтероцин А – *entA*, энтероцин В – *entB*, энтероцин Р – *entP*, энтероцин AS-48 – *entAS-48*, энтероцин L50A – *entL50A*, энтероцин L50B – *entL50B*, бактериоцин 31 – *bac31*, цитолизины – *cylLs*, *cylLl*, выявляли у энтерококков при помощи гнездовой ПЦР (Foulquié Moreno M.R. et al., 2003). Влияние факторов макроорганизма на антагонистическую активность культур энтерококков в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов оценивали после соинкубирования штаммов *Enterococcus* sp. с хлороводородной кислотой и жёлчью.

Изучение *in vivo* антагонистической активности энтерококков проводили на модели экспериментальной листериозной инфекции. В качестве штамма-антагониста была выбрана культура *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, изолированная из кишечника свиньи, обладающая выраженным антагонистическим эффектом в отношении бактерий рода *Listeria in vitro* и не имеющая факторов патогенности на фено- и генотипическом уровне.

Предварительно при помощи конъюнктивальной пробы на морских свинках была проверена вирулентность трёх штаммов листерий: *L. monocytogenes* EGDe, *L. monocytogenes* P14, *L. monocytogenes* VIMHA 004. Вирулентный штамм *L. monocytogenes* VIMHA 004 на третий день вызывал у морской свинки гнойный кератоконъюнктивит.

Для воспроизведения экспериментального листериоза использовали беспородных морских свинок обоих полов массой 200-250 г. Все эксперименты с животными выполнены в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), и декларацией о гуманном отношении к животным.

Животные были разделены на две равные группы: опытную ($n=9$) и контрольную ($n=9$). Животным опытной группы в течение 7 дней до заражения задавали один раз в сутки *per os* по 1 мл взвеси суточной культуры *Enterococcus faecium* Ef79OSAU в изотоническом растворе NaCl, содержащей $1 \cdot 10^9$ микробных клеток. Для заражения животных обеих групп использовали культуру *Listeria monocytogenes* VIMHA 004. Заражение осуществляли введением *per os* штамма в дозе $1 \cdot 10^{10}$ бактерий на морскую свинку.

Эффективность антагонистической активности оценивали по изменению степени обсеменённости листериями внутренних органов морских свинок. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 24 часа, трое и пять суток инфекции. Для оценки обсеменённости органов

L. monocytogenes в асептических условиях морских свинок вскрывали и стерильно отбирали внутренние органы: печень с жёлчным пузырём и селезёнку целиком, участок тонкого кишечника вместе с его содержимым длиной 20 мм.

Для бактериологического исследования образцы органов взвешивали на весах и гомогенизировали в стерильных фарфоровых ступках со стерильным PBS-буфером (Хеликон, Россия) в соотношении 1:2. Суспензию органов вносили в количестве 1 мл на чашки с агаром для идентификации листерий (PALCAM) (HiMedia, Индия), растирали шпателем Дригальского и инкубировали при 30 °С в течение 48 ч.

Полученные в ходе исследований численные материалы были обработаны статистически с определением средних значений, среднего квадратичного отклонения и средней ошибки средней. Достоверность различий сравниваемых показателей оценивалась по t-критерию Стьюдента. Корреляционный анализ проводили с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена (Лакин Г.Ф., 1990).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью автоматизированных программ «Биостатистика» и Microsoft Office Excel 2007.

2.2 Результаты исследования и их обсуждение

С использованием метода полимеразной цепной реакции были идентифицированы культуры энтерококков, выделенные из фекалий сельскохозяйственных животных. Так, 45 выделенных штаммов (27,8%) были отнесены к виду *Enterococcus faecium*, 39 культур (24,1%) – к виду *Enterococcus hirae*, 36 изолятов (22,2%) – к виду *Enterococcus durans*, 21 штамм (12,9%) – к виду *Enterococcus faecalis*, 15 штаммов (9,3%) – к виду *Enterococcus flavescens*, 6 культур (3,7%) – к виду *Enterococcus casseliflavus* (в соответствии с рисунком 2).

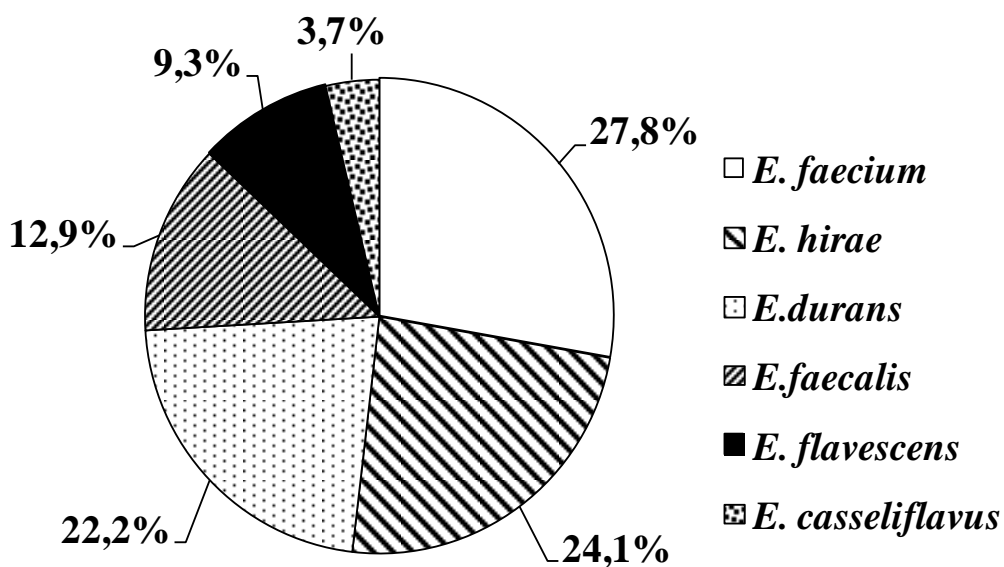


Рисунок 2 – Видовой состав фекальных изолятов энтерококков

Видовой состав энтерококков, выделенных из фекалий свиней, характеризовался большим разнообразием (в соответствии с рисунком 3).

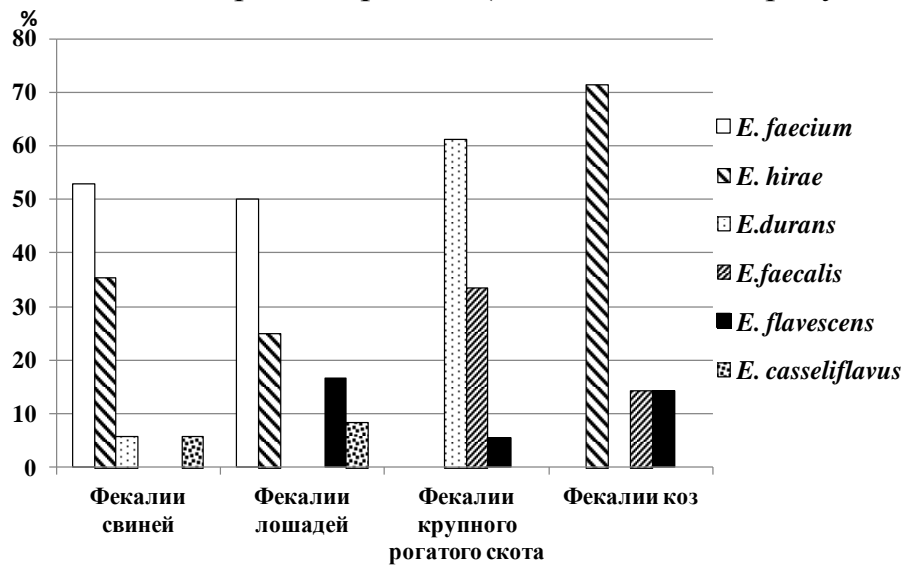


Рисунок 3 – Видовой состав фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных разных видов

В 53,0% случаев выделялись штаммы *E. faecium*, в 35,4% случаев – штаммы *E. hirae*. По три культуры энтерококков было идентифицировано как *E. durans* (5,8%) и *E. casseliflavus* (5,8%). Энтерококки микрофлоры фекалий лошадей были представлены видами *E. faecium* (50,0%), *E. hirae* (25,0%), *E. flavescens* (16,7%) и *E. casseliflavus* (8,3%). Среди культур, изолированных из фекалий крупного рогатого скота, большинство штаммов относились к видам *E. durans* (61,1%) и *E. faecalis* (33,4%). В трёх случаях был выделен штамм *E. flavescens* (5,5%). Изоляты энтерококков из фекалий коз в 71,4% случаев принадлежали к виду *E. hirae*, по три изолята (14,3%) – к видам *E. flavescens* и *E. faecalis*.

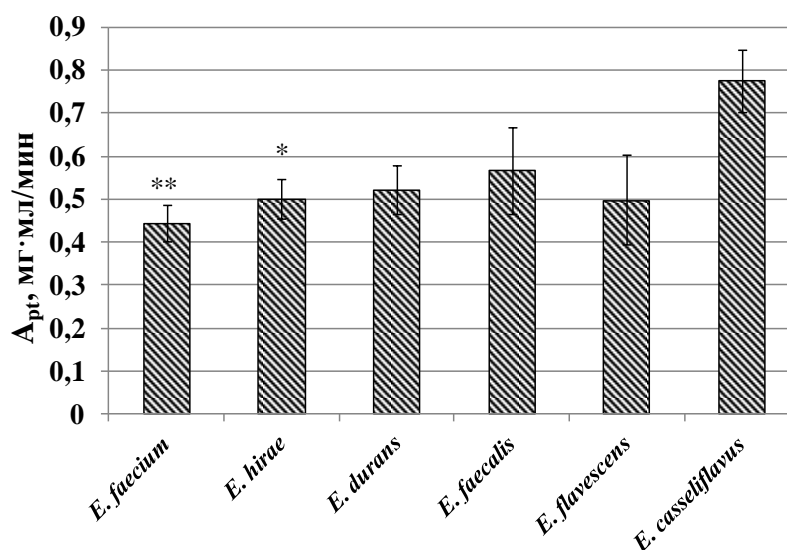
Анализ результатов проведённых исследований позволил выявить различия видового состава энтерококков фекальной микрофлоры продуктивных животных: энтерококки фекалий моногастричных животных характеризовались большим разнообразием видов, чем у жвачных. Доминирующим видом у полигастричных животных являлся *E. durans*, у лошадей и свиней – *E. faecium*. Изоляты вида *E. faecalis* были обнаружены только в кишечном биотопе жвачных животных.

В настоящее время отсутствует единое мнение относительно доминирования определённых видов энтерококков в кишечном биотопе животных. Некоторые авторы указывают, что основными представителями энтерококков в кишечнике крупного рогатого скота, свиней и лошадей являются *E. faecium* (Kagkli D.M. et al., 2007), другие – *E. faecalis* (Vermette C.J. et al., 2010), третьи – *E. hirae* (Guerrero-Olmos K. et al., 2014). Предположительно, данные различия могут быть связаны с особенностями рациона и содержания животных в различных регионах. Кроме того, в более ранних работах идентификация энтерококков проводилась на основании биохимических тестов, которые не всегда дают верный результат при исследовании близкородственных видов *Enterococcus* sp. (Гармашева И.Л., Коваленко Н.К., 2010), в то время как

используемый в нашей работе молекулярно-генетический метод позволяет говорить о более высокой точности результатов идентификации.

Являясь условно-патогенными микроорганизмами, энтерококки могут обладать различными факторами патогенности. Наличие у *Enterococcus* sp. генов, кодирующих синтез факторов вирулентности, обуславливает их способность вызывать инфекционный процесс. В результате проведённых исследований нами было установлено, что на фенотипическом уровне *Enterococcus* sp. не обладали гемолитической и желатиназной активностями.

При количественном определении протеолитической активности выявлено, что все изученные виды энтерококков обладали данным свойством. Наименьший уровень протеолитической активности выявлен у штаммов *E. faecium* – $0,45 \pm 0,042$ мг·мл/мин, тогда как культуры *E. casseliflavus* характеризовались максимальной активностью протеаз – $0,77 \pm 0,072$ мг·мл/мин ($p < 0,01$) (в соответствии с рисунком 4).



Примечание: * – достоверность различий выраженности протеолитической активности штаммов *E. hirae* и *E. casseliflavus* – ($p < 0,05$); ** – достоверность различий выраженности протеолитической активности штаммов *E. faecium* и *E. casseliflavus* – ($p < 0,01$).

Рисунок 4 – Выраженность протеолитической активности *Enterococcus* sp.

У изолятов *E. hirae*, *E. durans* и *E. faecalis* величина изучаемого признака варьировала от $0,50 \pm 0,046$ мг·мл/мин, $0,52 \pm 0,057$ мг·мл/мин и до $0,56 \pm 0,100$ мг·мл/мин, соответственно. Выраженность протеолитической активности у штаммов *E. flavescens* составляла $0,49 \pm 0,103$ мг·мл/мин.

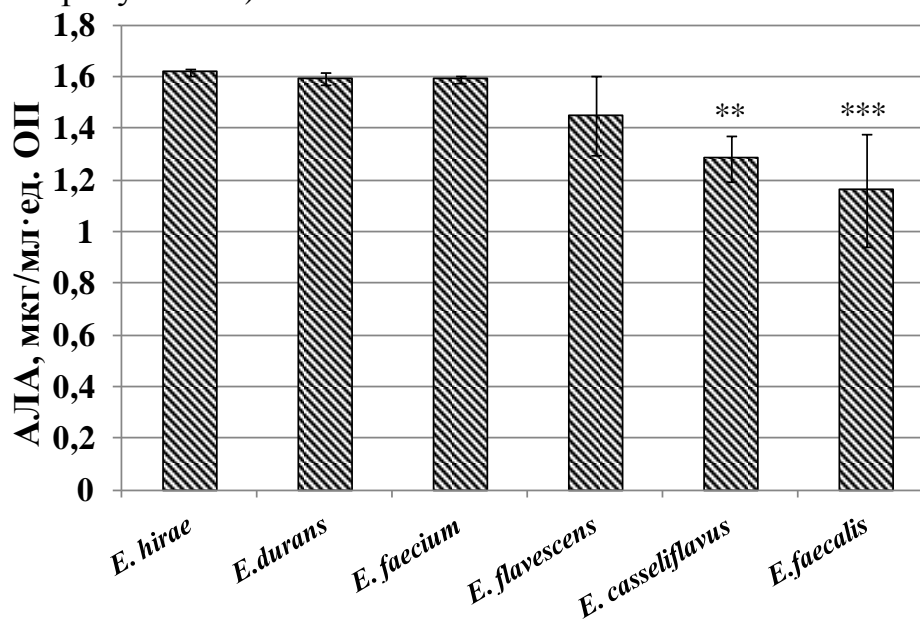
Из литературных данных известно, что к факторам вирулентности прежде всего относятся те микробные протеолитические ферменты, которые действуют на компоненты межклеточного матрикса и факторы иммунной системы, обуславливая патогенез инфекционного заболевания (Петровская В.Г., 1984; Cole M.F. et al., 1994). В этом контексте выявленную нами протеолитическую активность фекальных энтерококков следует рассматривать не как фактор вирулентности, а как одну из важнейших характеристик молочнокислых микроорганизмов, обеспечивающую потребность бактерий в ростовых факторах –

аминокислотах. В работах S. Menéndez et al. (2004) и A. Bhardwaj et al. (2008) показано, что энтерококки обладают более высоким уровнем протеолитической активности, чем другие молочнокислые бактерии. Активность протеолитических ферментов *Enterococcus* sp. обуславливает протеолиз белков молока, необходимый при производстве кисломолочных продуктов (Архипов А.Н. и др., 2012).

Молекулярно-генетический анализ не выявил в популяции фекальных изолятов энтерококков генетических детерминант известных факторов вирулентности: *cylA*, *cylB*, *cylM* – цитолизин, *gelE* – желатиназы, *sprE* – сериновой протеазы, *hyl* – гиалуронидазы, *asa* – поверхностных белков, участвующих в адгезии. Отсутствие факторов вирулентности у изученных фекальных культур энтерококков предполагает безопасность их использования в качестве основы пробиотических препаратов и заквасок прямого внесения.

Длительному переживанию энтерококков в организме хозяина способствуют факторы персистенции, направленные на инактивацию механизмов резистентности макроорганизма (Бухарин О.В., 1999).

Изучение антилизосимной активности *Enterococcus* sp. показало, что данный признак встречался у 100% изолятов. Уровень выраженности антилизосимного признака характеризовался межвидовой вариабельностью (в соответствии с рисунком 5).



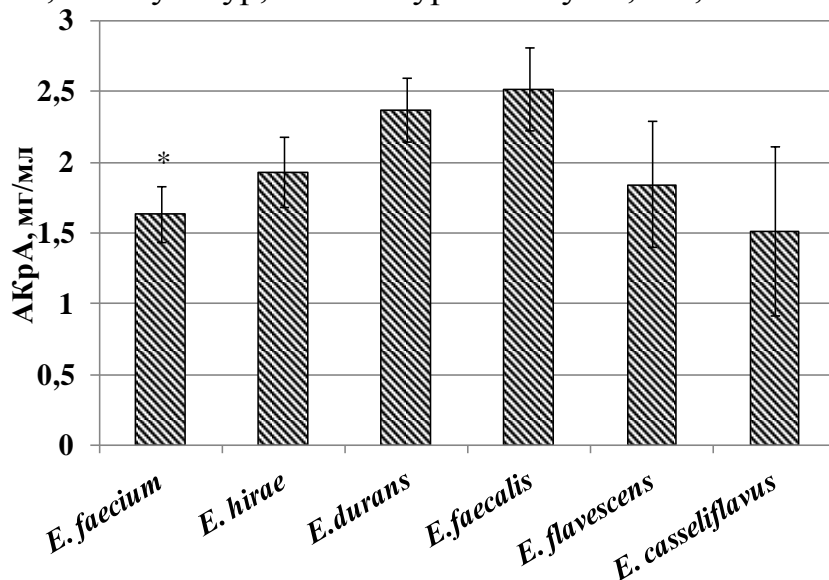
Примечание: ** – достоверность различий уровня антилизосимной активности культур *E. casseliflavus* по сравнению с культурами видов *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecium* – ($p < 0,01$); *** – достоверность различий уровня антилизосимной активности культур *E. faecalis* по сравнению с культурами видов *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecium* – ($p < 0,001$).

Рисунок 5 – Выраженность антилизосимной активности *Enterococcus* sp.

Средние значения АЛА штаммов *E. hirae* составили $1,61 \pm 0,016$ мкг/мл·ед. ОП, культур *E. durans* – $1,59 \pm 0,024$ мкг/мл·ед. ОП, изолятов *E. faecium* – $1,58 \pm 0,014$ мкг/мл·ед. ОП. По сравнению с культурами видов *E. hirae*, *E. durans* и *E. faecium* достоверно меньшим уровнем АЛА обладали штаммы *E. faecalis*

($1,15 \pm 0,217$ мкг/мл·ед. ОП) ($p < 0,001$) и *E. casseliflavus* ($1,28 \pm 0,088$ мкг/мл·ед. ОП) ($p < 0,01$). Экспрессия антилизозимной активности штаммов *E. flavescens* составила в среднем $1,45 \pm 0,153$ мкг/мл·ед. ОП.

Анализ распространённости антикарнозиновой активности среди энтерококков, выделенных из фекалий продуктивных животных, показал, что 100% изолятов обладали данным свойством (в соответствии с рисунком 6). АКрА высокого уровня была выявлена у $58,8 \pm 6,89\%$ кишечных изолятов, среднего уровня – у $23,5 \pm 5,93\%$ культур, низкого уровня – у $17,7 \pm 5,34\%$ штаммов.



Примечание: * – достоверность различий уровня антикарнозиновой активности культур *E. faecium* по сравнению с культурами видов *E. durans* и *E. faecalis* – ($p < 0,05$).

Рисунок 6 – Выраженность антикарнозиновой активности *Enterococcus* sp.

Среднее значение АКрА фекальных штаммов *E. faecium* ($1,63 \pm 0,197$ мг/мл) было в 1,5 раза меньше такового у штаммов *E. durans* ($2,37 \pm 0,224$ мг/мл) и *E. faecalis* ($2,52 \pm 0,292$ мг/мл) ($p < 0,05$). Экспрессия признака у культур *E. hirae* составила $1,93 \pm 0,248$ мг/мл, у изолятов *E. flavescens* – $1,84 \pm 0,447$ мг/мл. Минимальное значение активности было зарегистрировано у культур *E. casseliflavus* ($1,51 \pm 0,595$ мг/мл).

Исследование выраженности АКрА бактерий, учитывающее видовую принадлежность организма-хозяина, выявило достоверно высокий уровень АКрА энтерококков, выделенных из кишечника крупного рогатого скота, по сравнению со штаммами, изолированными из фекалий свиней и лошадей ($p < 0,05$). Так, АКрА у культур, выделенных из фекалий крупного рогатого скота, составляла $2,47 \pm 0,173$ мг/мл, у изолятов из фекалий коз – $2,01 \pm 0,365$ мг/мл, у изолятов из фекалий лошадей и свиней – $1,72 \pm 0,277$ и $1,69 \pm 0,197$ мг/мл, соответственно.

К важнейшим свойствам кишечных энтерококков, позволяющим им закрепиться в естественном экотопе, относится способность образовывать биоплёнки, представляющие собой скопления микроорганизмов, включенных в общий полисахаридный матрикс и ассоциированных с биологической или небиологической поверхностью (Vu B. et al., 2009).

При определении способности энтерококков образовывать биоплёнки установлено, что $20,3 \pm 3,16\%$ штаммов формировали плёнки на абиотической поверхности. Культуры *E. faecium* обладали данной способностью в достоверно большем проценте случаев – $40,0 \pm 7,30\%$, чем штаммы *E. hirae* и *E. durans* ($15,3 \pm 5,76$ и $16,6 \pm 6,20\%$, соответственно) ($p < 0,05$). Количество биоплёнкоформирующих штаммов *E. flavescens* составило $20,0 \pm 10,32\%$.

Коэффициент биоплёнкообразования (КБ) изолятов энтерококков варьировал от 1,2 до 1,4. Для штаммов *E. faecium* средний КБ составил $1,3 \pm 0,05$, а для культур *non-faecium* видов – $1,2 \pm 0,01$ ($p < 0,05$).

Наибольший процент штаммов, формирующих биоплёнки, был выделен от лошадей ($33,3 \pm 7,85\%$) и коз ($28,5 \pm 9,85\%$). Культуры, изолированные от крупного рогатого скота, обладали данным свойством в $11,1 \pm 4,27\%$ случаев, от свиней – в $17,6 \pm 5,33\%$ случаев.

В работах Whitman R.L. et al. (2007) показано, что поверхностный белок энтерококков, кодируемый геном *esp*, участвует в образовании биоплёнок на абиотических поверхностях, однако ни у одного из изученных нами штаммов данный ген не обнаружен. Вероятно, наличие гена *esp* не является необходимым условием для формирования биоплёнок штаммами *E. faecalis* и *E. faecium* (Ramadhan A.A., Hegedus E., 2005).

Уместно предположить, что впервые обнаруженная нами у фекальных изолятов энтерококков антикарнозиновая активность в совокупности с антилизозимным признаком и способностью образовывать биоплёнки способствуют длительному переживанию данных бактерий в организме животных.

Известно, что антимикробные препараты оказывают селективное давление не только на патогенные микроорганизмы, но и на симбиотические бактерии желудочно-кишечного тракта человека и животных. Поэтому на следующем этапе нашей работы были выявлены особенности антибиотикорезистентности энтерококков фекальной микрофлоры животных: резистентность к ампициллину в 3,5 раза чаще распространена среди штаммов *E. faecium*, чем *E. hirae* ($p < 0,05$). Количество цефтриаксонрезистентных культур *E. durans* в три раза превышало число таковых культур *E. faecium* ($p < 0,05$). Все фторхинолоны были менее активны в отношении изолятов *E. faecium* по сравнению с культурами *E. hirae* и *E. durans* ($p < 0,01$). Резистентность к линезолиду в большей степени распространена среди культур *E. hirae*, *E. durans* и *E. flavescens*, чем среди штаммов *E. faecium* и *E. faecalis* ($p < 0,001$).

В популяции фекальных изолятов энтерококков, выделенных от животных, обнаружен низкий процент ванкомицинрезистентных штаммов ($1,9 \pm 1,07\%$). На фенотипическом уровне выявлена широкая распространённость резистентности культур энтерококков к фторхинолонам (к ципрофлоксацину – $50,0 \pm 3,92\%$, к норфлоксацину – $33,3 \pm 3,70\%$, к энрофлоксацину – $64,9 \pm 3,75\%$) и линезолиду ($53,8 \pm 3,91\%$). Максимальную чувствительность изоляты *Enterococcus* sp. проявляли в отношении ампициллина – $87,0 \pm 2,64\%$, стрептомицина – $94,5 \pm 1,79\%$ и гентамицина – $96,3 \pm 1,48\%$.

При исследовании фекальных изолятов энтерококков на наличие генов резистентности к аминогликозидам ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, кодирующий высокий уровень резистентности к гентамицину, был выявлен у культур *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* и *E. faecalis*.

У штаммов *E. durans* ген *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia* регистрировали достоверно чаще (75,0±7,21%), по сравнению с изолятами *E. hirae* (53,8±7,98%) ($p<0,05$), *E. faecalis* (14,3±7,63%) и *E. faecium* (6,6±3,70%) ($p<0,001$).

Геном *aph(3')-IIIa*, обуславливающим резистентность к аминогликозидам (кроме гентамицина), обладали только 20,0±10,32% штаммов *E. flavescens*.

Генетическая детерминанта резистентности к аминогликозидам (кроме гентамицина) *ant(4')-Ia* оказалась менее распространена среди штаммов *E. faecium*, чем среди культур *E. hirae* и *E. faecalis* ($p<0,001$). Частота обнаружения гена *ant(4')-Ia* составила для изолятов *E. faecium* 20,0±5,96%, для *E. hirae* – 69,2±7,39%, для *E. faecalis* – 71,4±9,86%.

Ген *tetM* (резистентность к тетрациклину и миноциклину) зарегистрирован у фекальных изолятов энтерококков всех видов. Данной генетической детерминантой штаммы *E. faecalis*, *E. flavescens* и *E. casseliflavus* обладали в большем проценте случаев – 42,8±10,79, 20,0±10,32 и 50,0±20,41%, соответственно, по сравнению с культурами видов *E. faecium* (6,6±3,70%) ($p<0,001$) и *E. hirae* (15,3±5,76%) ($p<0,05$). Штаммы, содержащие ген *tetL*, не были обнаружены.

Анализ генотипического профиля резистентности *Enterococcus* sp. к гликопептидам выявил наличие гена *vanA*, кодирующего резистентность к ванкомицину и тейкопланину, среди 58,3±8,21% культур *E. durans* и 46,7±7,43% штаммов *E. faecium*. Менее распространенным данный ген оказался среди изолятов *E. faecalis* (14,3±7,63%), чем среди культур *E. durans* и *E. faecium* ($p<0,01$). В то время, только у штаммов *E. faecalis* был зарегистрирован ген *vanB* в 14,3±7,63% случаев.

Среди фекальных изолятов *E. faecalis*, *E. flavescens* и *E. casseliflavus* ген *vanC1*, кодирующий резистентность к низким концентрациям ванкомицина, обнаружен в 57,1±10,80, 60,0±12,64 и 100% случаев, соответственно. Генетическая детерминанта *vanC2/3* выявлена у 100% штаммов *E. flavescens* и *E. casseliflavus*. Достоверно чаще данным геном обладали культуры *E. faecalis* (57,1±10,80%), чем изоляты *E. faecium* (6,6±3,70%) ($p<0,001$).

Корреляционный анализ фено- и генотипических характеристик резистентности бактерий рода *Enterococcus* к аминогликозидам и гликопептидам показал наличие обратной взаимосвязи ($r=-0,625$; $p<0,001$) между присутствием в геноме генетических детерминант резистентности и фенотипическим проявлением признака. У исследуемых культур энтерококков выявлена достоверная положительная связь между наличием генов резистентности к тетрациклинам и их экспрессией ($r=0,685$; $p<0,001$).

Не исключено, что выявленный нами спектр антибиотикорезистентности фекальных культур *Enterococcus* sp. обусловлен природной устойчивостью энтерококков к ряду АБП (цефалоспорины, β -лактамы, фторхинолоны), связанной с наличием генетических детерминант антибиотикорезистентности.

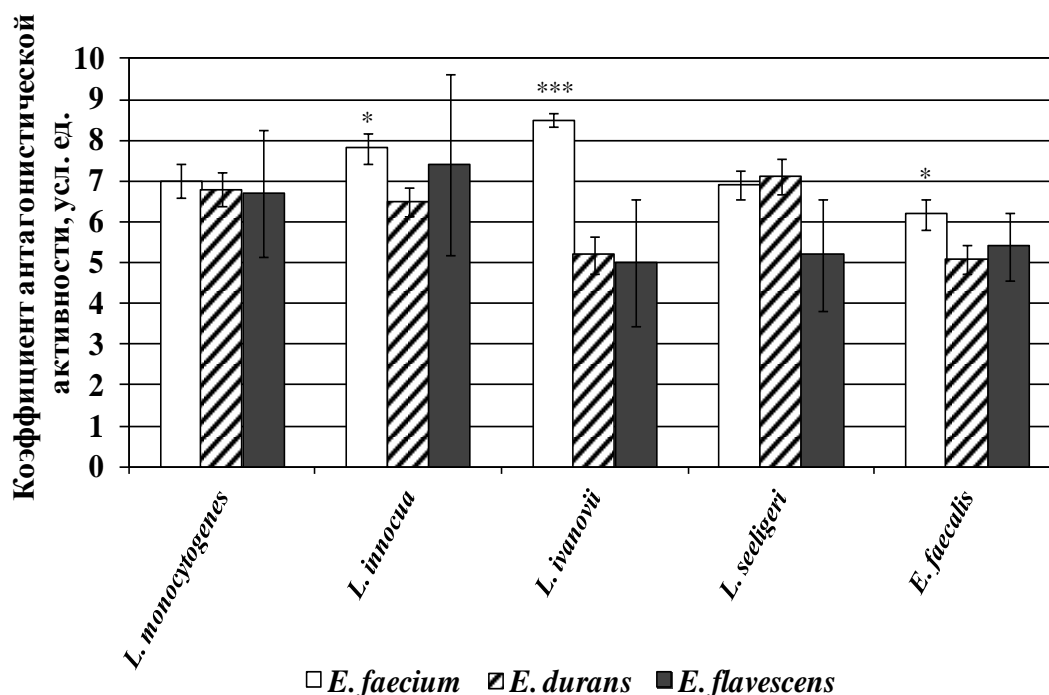
Бактерии рода *Enterococcus* способны продуцировать антимикробные пептиды – бактериоцины, обладающие ингибирующей активностью в отношении близкородственных штаммов. Предполагается, что синтез бактериоцинов даёт конкурентное преимущество штаммам-продуцентам перед другими бактериями, заселяющими один и тот же биотоп (Sánchez J. et al., 2007).

При исследовании антагонистической активности энтерококков установлено, что $37,0 \pm 3,79\%$ выделенных культур подавляли рост вирулентных штаммов *Enterococcus faecalis* и бактерий рода *Listeria*. В отношении остальных культур коллекции микроорганизмов антагонистическая активность бактерий рода *Enterococcus* не выявлена.

Антагонистически активные изоляты энтерококков принадлежали к видам *E. faecium* (30 штаммов), *E. durans* (24 штамма) и *E. flavescens* (6 штаммов). Среди культур вида *E. faecium* доля антагонистически активных штаммов составила $66,6 \pm 7,03\%$, среди *E. durans* – $66,6 \pm 7,86\%$, среди *E. flavescens* – $40,0 \pm 12,64\%$.

Культуры энтерококков-антагонистов были изолированы в одинаковом проценте случаев из фекалий крупного рогатого скота и свиней ($12,9 \pm 2,63\%$), в меньшем проценте случаев ($11,1 \pm 2,46\%$) – из фекалий лошадей, в то время как штаммы *Enterococcus* sp. фекальной микрофлоры коз антагонистической активностью не обладали.

Коэффициент антагонистической активности культур *E. faecium* в отношении бактерий *Listeria monocytogenes* составил $7,0 \pm 0,42$, штаммов *E. durans* – $6,8 \pm 0,41$, изолятов *E. flavescens* – $6,7 \pm 1,55$ (в соответствии с рисунком 7).



Примечание: * – достоверность различий выраженности антагонистической активности культур *E. faecium* по сравнению с культурами *E. durans* – ($p < 0,05$); *** – достоверность различий выраженности антагонистической активности культур *E. faecium* по сравнению с культурами видов *E. durans* и *E. flavescens* ($p < 0,001$).

Рисунок 7 – Выраженность антагонистической активности культур энтерококков в отношении *Listeria* sp. и *Enterococcus faecalis*

Рост *L. innocua* более эффективно подавляли штаммы *E. faecium*, чем культуры *E. durans* ($p < 0,05$). Среднее значение коэффициента антагонистической активности для изолятов вида *E. faecium* равнялось $7,8 \pm 0,36$, для *E. durans* – $6,5 \pm 0,34$, для *E. flavescens* – $7,4 \pm 2,22$.

По отношению к *L. ivanovii* максимальный антимикробный эффект проявляли штаммы *E. faecium* ($p < 0,001$). Коэффициент антагонистической активности энтерококков варьировал от $5,0 \pm 1,57$ у культур *E. flavescens* и $5,2 \pm 0,45$ у штаммов *E. durans* до $8,5 \pm 0,17$ у изолятов *E. faecium*.

Наибольшей антилистериозной активностью по отношению к *L. seeligeri* обладали штаммы *E. durans* (коэффициент активности $7,1 \pm 0,44$), в меньшей степени ингибировали рост листерий изоляты *E. faecium* (коэффициент активности $6,9 \pm 0,35$). Минимальным значением коэффициента антагонистической активности ($5,2 \pm 1,37$) характеризовались штаммы *E. flavescens*.

В отношении вирулентных штаммов *Enterococcus faecalis* энтерококки обладали менее выраженным антагонизмом, чем к листериям, со средним значением коэффициента антагонистической активности: $6,2 \pm 0,37$ для *E. faecium*, $5,1 \pm 0,35$ для *E. durans* и $5,4 \pm 0,82$ для *E. flavescens*. Активность штаммов *E. faecium* была достоверно выше по сравнению с культурами *E. durans* ($p < 0,05$).

При персистенции в желудочно-кишечном тракте макроорганизма энтерококки должны сохранять свою способность подавлять размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов под воздействием хлороводородной кислоты и жёлчи.

Дальнейшие исследования установили разнонаправленное действие факторов макроорганизма (хлороводородная кислота, жёлчь) на антагонистическую активность энтерококков. Так, соинкубирование энтерококков-антагонистов с 0,3% хлороводородной кислоты вызывало преимущественное повышение антагонистической активности *Enterococcus* sp. в отношении тест-культур коллекции, тогда как 0,5% раствор хлороводородной кислоты снижал способность фекальных изолятов энтерококков ингибировать рост тест-штаммов в среднем на 10,2%.

Жёлчь в исследуемых концентрациях (1% и 5%) достоверно подавляла антимикробную активность изолятов *E. faecium* и *E. durans*. У штаммов *E. flavescens* под воздействием жёлчи происходило усиление антагонистической активности, однако описанные изменения у культур данного вида оказались недостоверны, то есть были на уровне тенденций.

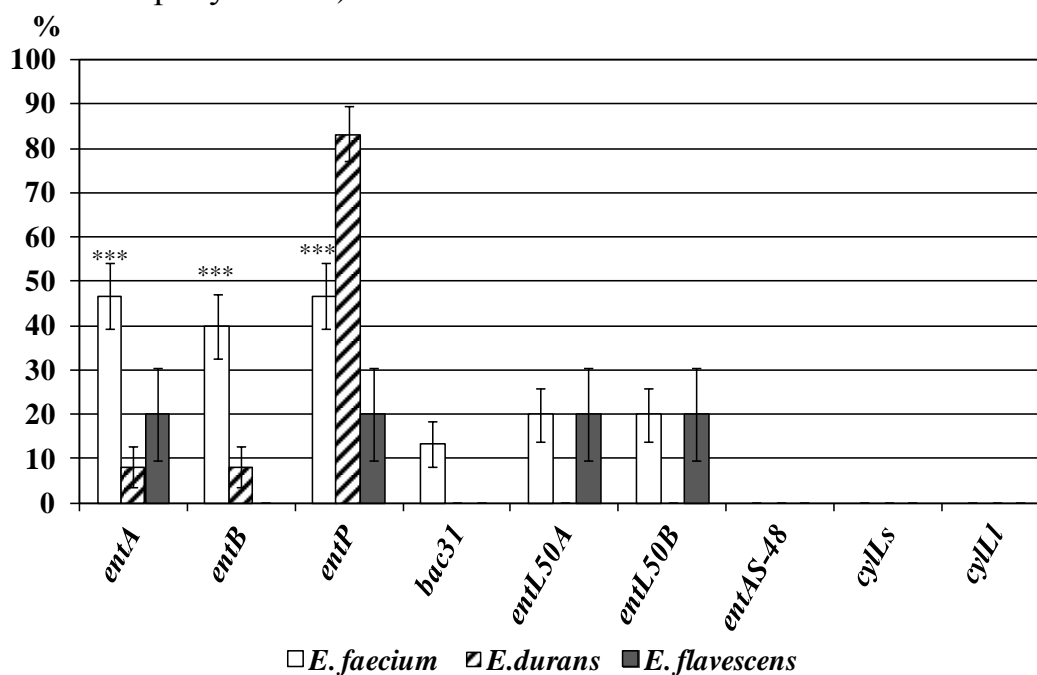
Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что энтерококки не утрачивают антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов после воздействия хлороводородной кислоты и жёлчи.

Имеются данные о том, что бактерии рода *Enterococcus* сохраняют жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт, поскольку устойчивы к действию хлороводородной кислоты и жёлчи (Strompfová V. et al., 2004). Однако изменения кислотности среды влияют на бактериоциногенную активность энтерококков. В работе K. Vanwo et al. (2013) показано выраженное снижение антимикробной активности бактериоцинов при

высоких значениях рН и сохранение их свойств при более низких. Это обуславливается тем, что оптимальный уровень кислотности среды для производства бактериоцинов молочнокислыми бактериями часто находится ниже такового для роста микроорганизмов. Предположительно, снижение активности объясняется адсорбцией молекул бактериоцинов на клеточной поверхности бактерий-продуцентов, что зависит от рН среды клеток и более выражено при высоких значениях водородного показателя (Parente E., Ricciardi A., 1999). Таким образом, эволюционно сложившаяся устойчивость энтерококков к факторам макроорганизма способствует успешной колонизации и функциональной активности бактерий в кишечном биотопе.

Изучение изолятов энтерококков на наличие генетических детерминант бактериоциногенности показало, что 69 культур ($42,5 \pm 3,88\%$) обладали тем или иным геном, кодирующим синтез энтероцинов. При этом наблюдалась прямая корреляция ($r=0,891$) между наличием генов бактериоциногенности и проявлением антагонистической активности ($p < 0,001$).

Генетические детерминанты бактериоциногенности были обнаружены у штаммов энтерококков трёх видов: *E. faecium*, *E. durans* и *E. flavescens* (в соответствии с рисунком 8).



Примечание: гены кодируют: *entA* – энтероцин А, *entB* – энтероцин В, *entP* – энтероцин Р, *bac31* – бактериоцин 31, *entL50A* – энтероцин L50А, *entL50B* – энтероцин L50В, *entAS-48* – энтероцин AS-48, *cyLs* и *cyLI* – литические компоненты цитолизина.

*** – достоверность различий частоты встречаемости генов энтероцинов среди культур *E. faecium*, по сравнению с культурами *E. durans* – ($p < 0,001$).

Рисунок 8 – Распространённость генов бактериоциногенности в популяции фекальных изолятов энтерококков

Культуры *Enterococcus* sp., обладающие генами бактериоциногенности, были изолированы из фекалий крупного рогатого скота ($55,5 \pm 6,76\%$), свиней ($47,0 \pm 6,98\%$) и лошадей ($41,6 \pm 8,21\%$).

Наиболее разнообразный спектр генов бактериоциногении представлен у штаммов *E. faecium*. Энтерококки, содержащие в геноме несколько генов бактериоциногении (три и более), принадлежали к видам *E. faecium* и *E. flavescens*. В геноме двух штаммов *E. faecium* и *E. flavescens* были выявлены комплексы генов продукции энтероцинов (*entA*, *entP*, *entL50A*, *entL50B*). Штамм *E. faecium*, изолированный из фекалий лошади, обладал набором из пяти генов энтероцинов (*entA*, *entP*, *bac31*, *entL50A*, *entL50B*).

Таким образом, в популяции фекальных энтерококков установлена широкая распространённость генов бактериоциногении (что согласуется с данными K. Nigútová et al. (2005), V. Strompfová et al. (2008)), напрямую коррелирующая с наличием антилистериозной активности и активностью в отношении вирулентных изолятов вида *E. faecalis*.

На следующем этапе работы нами была предпринята попытка изучения антагонистической активности энтерококков *in vivo* на модели экспериментальной листериозной инфекции.

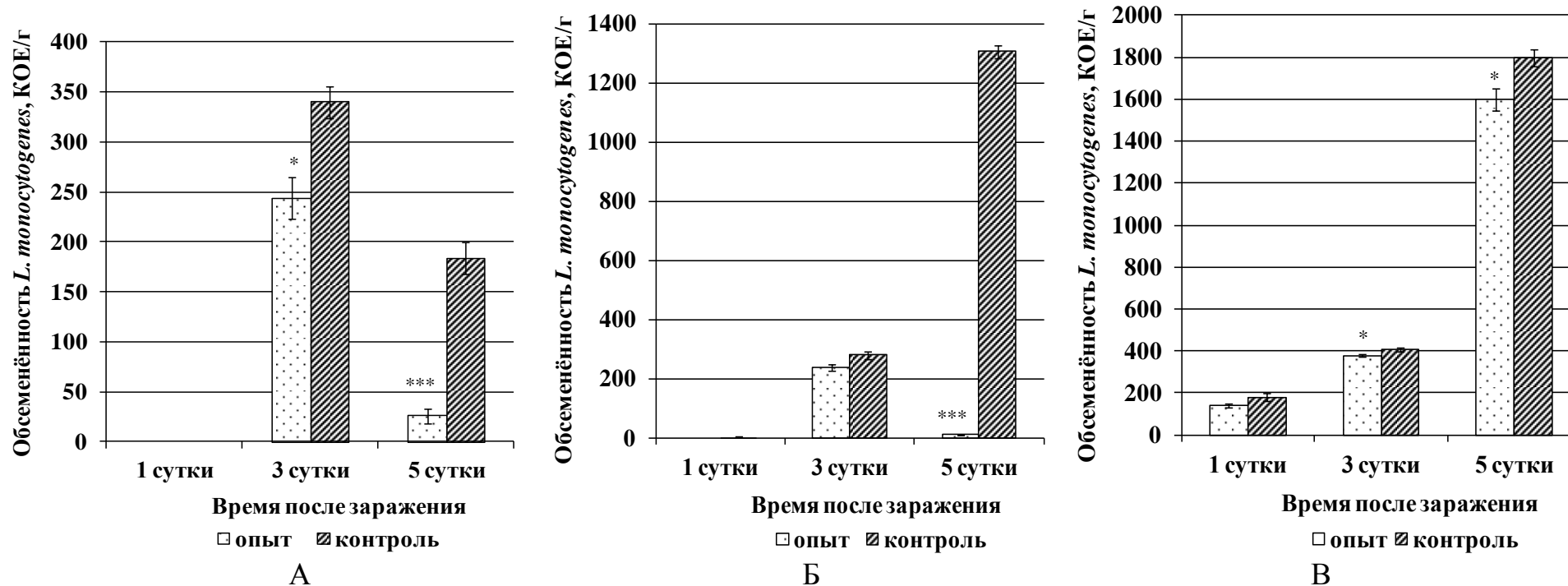
Известно, что листериоз представляет собой сапрозоонозное инфекционное заболевание людей и животных, возбудителями которого являются бактерии рода *Listeria*. Данное заболевание характеризуется множеством источников возбудителя инфекции, разнообразием путей и факторов его передачи, полиморфизмом клинических проявлений, высокой летальностью (Пушкарева В.И. и др., 2012).

В ходе проведённых исследований установлено, что заражение морских свинок культурой *L. monocytogenes* VIMNA 004 вызывает развитие инфекции, сопровождающейся гибелью 33,3% животных контрольной группы. Через сутки после инфицирования погибли две морские свинки, через пять суток пало еще одно животное контрольной группы. В опытной группе гибель животных от листериозной инфекции не наблюдали.

Этим данным соответствовали и результаты определения показателя микробной обсеменённости (КОЕ/г) внутренних органов у животных исследуемых групп. Количество листерий в органах морских свинок, получавших культуру энтерококков, на третьи и пятые сутки инфекции было достоверно меньше, чем в органах животных контрольной группы (в соответствии с рисунком 9).

В обсеменённости листериями селезёнки морских свинок опытной и контрольной групп наблюдалась тенденция к первоначальному увеличению числа бактерий в органе к третьим суткам инфекции с последующим уменьшением количества листерий к последнему дню эксперимента.

Спустя 24 часа, бактерии рода *Listeria* из селезёнки животных обеих групп не выделялись. Через трое суток после инфицирования, концентрация листерий в селезёнке животных опытной группы достигала $244,0 \pm 20,72$ КОЕ/г, что в среднем в 1,3 раза меньше таковой в контрольной группе ($p < 0,05$). В опытной группе морских свинок количество листерий в селезёнке на пятые сутки течения инфекции было достоверно ниже ($26,0 \pm 7,42$ КОЕ/г), чем в контрольной группе ($184,0 \pm 16,04$ КОЕ/г) ($p < 0,001$).



Примечание: * – достоверность различий уровня обсеменённости листериями внутренних органов морских свинок в опытной и контрольной группе животных – ($p < 0,05$); *** – ($p < 0,001$).

Рисунок 9 – Показатели микробной обсеменённости *L. monocytogenes* VIMNA 004 внутренних органов морских свинок опытной и контрольной групп: А – селезёнка, Б – печень, В – кишечник и его содержимое

Аналогичную тенденцию наблюдали при изучении результатов посевов ткани печени: через сутки после инфицирования концентрация листерий в органе животных контрольной группы достигала $2,0 \pm 0,50$ КОЕ/г, обсеменённость *L. monocytogenes* VIMНА 004 печени животных опытной группы к третьим суткам инфекции составила $236,0 \pm 17,45$ КОЕ/г против $279,0 \pm 12,16$ КОЕ/г в контрольной группе.

На пятые сутки от момента заражения в опытной группе животных отмечалось достоверное снижение количества листерий в печени ($9,0 \pm 1,83$ КОЕ/г) по сравнению с контролем ($1305,0 \pm 21,67$ КОЕ/г) ($p < 0,001$).

Концентрация листерий в кишечнике и его содержимом у животных обеих групп возрастала с течением времени. При этом степень обсеменённости листериями кишечника и его содержимого у морских свинок на третьи и пятые сутки инфекции была ниже в опытной группе животных ($p < 0,05$). Количество *L. monocytogenes* VIMНА 004 в кишечнике и его содержимом у животных опытной группы через 24 часа от момента инфицирования достигало $140,0 \pm 11,50$ КОЕ/г (в контрольной группе – $180,0 \pm 20,05$ КОЕ/г). На третьи сутки инфекционного процесса в кишечнике и его содержимом у животных, получавших культуру энтерококков, число листерий составило $377,0 \pm 7,24$ КОЕ/г, в контрольной группе – $407,0 \pm 8,71$ КОЕ/г; на пятые сутки аналогичные показатели для опытной и контрольной групп составили $1600,0 \pm 54,80$ и $1796,0 \pm 39,76$ КОЕ/г, соответственно.

Таким образом, в результате проведённого исследования выявлена способность штамма *Enterococcus faecium* Ef79OSAU снижать летальность и микробную обсеменённость внутренних органов при экспериментальной листериозной инфекции у морских свинок.

Аналогичный протективный эффект культуры *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 обнаружен L.M. dos Santos et al. (2011) при экспериментальной листериозной инфекции гнотобионтных мышей. Результаты исследований доказывают увеличение количества клеток Купфера в печени, сопровождающееся элиминацией листерий из органа. Другим возможным объяснением эффективного устранения возбудителя может являться производство иммунными клетками хемокинов, привлекающих большое число иммунокомпетентных клеток в инфицированный орган. V. Veckman et al. (2003) доказали, что лактобактерии способны индуцировать экспрессию генов хемокинов макрофагами.

Подводя итог проделанной работе, следует заключить, что кишечный биотоп продуктивных животных разных видов характеризуется особенностями видового состава бактерий рода *Enterococcus*. Энтерококки, изолированные из желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных разных видов, обладают специфичным биопротеомом. Авирулентные, антагонистически активные энтерококки, выделенные из кишечника животных, могут быть использованы в качестве биопрепаратов для защиты от листериоза.

3 ВЫВОДЫ

1. Выявлены различия видового состава энтерококков фекальной микрофлоры продуктивных животных разных видов. Установлено, что фекальные изоляты *Enterococcus* sp. характеризуются большим разнообразием видов у моногастричных животных, чем у жвачных. Доминирующим видом у полигастричных животных явился *E. durans*, у лошадей и свиней – *E. faecium*.

2. Выделенные штаммы энтерококков являются апатогенными вследствие отсутствия факторов вирулентности на фенотипическом (гемолитическая, желатиназная активности) и генетическом (*cylA*, *cylB*, *cylM*, *gelE*, *sprE*, *hyl*, *asa*, *esp*) уровнях.

3. Установлено, что все изоляты *Enterococcus* sp. обладают персистентным потенциалом (антилизозимная и антикарнозиновая активности, биоплёнообразование), способствующим длительному переживанию данных бактерий в кишечном биотопе животных.

4. Среди культур энтерококков разных видов на фенотипическом уровне распространена резистентность к фторхинолонам и линезолиду, тогда как наибольшую чувствительность штаммы сохраняли к ванкомицину, ампициллину и аминогликозидам. Для изученных бактерий рода *Enterococcus* характерно наличие генетических детерминант резистентности к аминогликозидам и гликопептидам при отсутствии их экспрессии.

5. В популяции фекальных изолятов энтерококков выявлена широкая распространённость антагонистической активности в отношении бактерий рода *Listeria* и вирулентных штаммов *Enterococcus faecalis*, напрямую коррелирующая с наличием генов бактериоциногении. Показано, что энтерококки не утрачивают антагонистическую активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов после воздействия хлороводородной кислоты и жёлчи.

6. На основании комплексной оценки фенотипических и генетических характеристик энтерококков, выделенных из кишечного биотопа здоровых животных, отобран штамм *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, обладающий выраженным антагонистическим эффектом в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов и не имеющий факторов вирулентности.

7. Профилактическое назначение морским свинкам штамма *Enterococcus faecium* Ef79OSAU снижает летальность и микробную обсеменённость внутренних органов животных при экспериментальной листериозной инфекции.

4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Предложен авирулентный штамм *Enterococcus faecium* Ef79OSAU, обладающий антагонистической активностью в отношении бактерий рода *Listeria* и вида *Enterococcus faecalis*. Культура депонирована в Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры (ГКНМ) ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Габричевского» Роспотребнадзора в качестве перспективной для производства биопрепаратов (справка № 63 от 14 февраля 2014 г.). Штамм *Enterococcus faecium* Ef79OSAU рекомендован в качестве основы для создания новых поликомпонентных биопрепаратов пробиотической направленности.

5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Биологическое разнообразие энтерококков, выделенных от животных, в норме и при патологии / Н.Е. Щепитова, Д.В. Пошвина, В.И. Сорокин, М.В. Сычёва // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – № 4(43). – С. 243-245.
2. Щепитова, Н.Е. Антагонистическая активность энтерококков фекальной микрофлоры животных / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва, О.Л. Карташова // Вестник ветеринарии. – 2014. – № 69. – С. 50-53.
3. Сычёва, М.В. Цитолитическая активность энтерококков, выделенных от животных / М.В. Сычёва, Д.В. Пошвина, Н.Е. Щепитова // Материалы II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство». – Уфа. – 2014. – С. 124-127.
4. Щепитова, Н.Е. Распространение генов бактериоциногении в популяции кишечных энтерококков животных / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2014». – Москва. – 2014. – Т. 2. – С. 453-454.
5. Щепитова, Н.Е. Биологические свойства антагонистически активных энтерококков кишечной микрофлоры животных / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва, О.Л. Карташова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 13. – С. 134-138.
6. Щепитова, Н.Е. Характеристика энтерококков кишечной микрофлоры коз / Н.Е. Щепитова, М.В. Сычёва // Материалы международной научно-практической конференции «Современные тенденции в развитии овцеводства и козоводства». – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2014. – С. 41-43.
7. Щепитова, Н.Е. Биологические свойства антагонистически активных энтерококков, выделенных от животных / Н.Е. Щепитова // Материалы ежегодной областной научно-практической конференции «Молодые ученые Оренбуржья – науке XXI века». – Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2014. – С. 250-252.
8. Щепитова, Н.Е. Биопленкообразование энтерококками кишечной микрофлоры животных / Н.Е. Щепитова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – № 1(51). – С. 77-79.
9. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии / Д.В. Пошвина, Н.Е. Щепитова, Т.М. Уткина [и др.] // Ветеринария. – 2015. – № 6. – С. 26-30.
10. Антилистериозная активность *Enterococcus faecium* Ef790SAU *in vivo* / Н.Е. Щепитова, Т.М. Пашкова, К.А. Собянин, М.В. Сычёва // Российский иммунологический журнал. – 2015. – Т. 9(18). – № 2(1). – С. 714-716.

Автор выражает искреннюю благодарность доктору биологических наук, профессору, заведующей лабораторией по изучению механизмов и регуляции персистенции бактерий ФГБУН «Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза» УрО РАН О.Л. Карташовой, а также доктору биологических наук, профессору, заведующей лабораторией экологии возбудителей инфекций ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ С.А. Ермолаевой за содействие и помощь, оказанную при работе над диссертацией.

Щепитова Наталья Евгеньевна

**Биологические свойства фекальных изолятов энтерококков,
выделенных от животных**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оригинал макет подготовлен в программе Word for Windows 2003

Подписано в печать

Формат 60*84/16. Усл.- печ. л. 1,0. Печать оперативная.

Бумага офсетная. Гарнитура Times.

Тираж 100 экз.