

Дифференциация клинически значимых штаммов энтерококков от представителей нормальной микрофлоры животных с использованием математических моделей

М.В. Сычёва, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Одной из важнейших задач клинической микробиологии является дифференциация патогенных вариантов микроорганизмов от представителей нормальной микрофлоры. Сложность указанной проблемы заключается в изучении микроорганизмов, выполняющих, с одной стороны, жизненно важные гомеостатические функции, а с другой — являющихся возбудителями эндогенных инфекций, что в полной мере относится к бактериям рода *Enterococcus*.

Установлено, что некоторые культуры энтерококков, приобретая ряд факторов патогенности, могут вызывать серьёзные инфекционные заболевания [1], тогда как другие штаммы служат необходимым компонентом нормального микробиоценоза и, оказывая положительное влияние на макроорганизм, с успехом применяются в качестве основы биопрепаратов пробиотической направленности [2]. Вышеизложенное предопределило цель настоящего исследования — с помощью современных методов математического анализа разработать алгоритм, позволяющий дифференцировать энтерококков — представителей нормальной микрофлоры от этиологических агентов, способных вызывать развитие патологических процессов.

Материал и методы исследования. Изучено 334 штамма бактерий рода *Enterococcus*. Из них 162 изолята, выделенные из фекалий клинически здоровых сельскохозяйственных животных, сформировали первую группу и 172 штамма *Enterococcus* spp., изолированные от продуктивных животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, составили вторую группу сравнения.

В качестве биологических характеристик энтерококков были использованы данные сравнительного анализа частоты встречаемости факторов вирулентности (протеолитическая, желатиназная, гемолитическая активности), персистенции (антилизоцимная, антикарнозиновая активности, биоплёнкообразование) и полиантибиотикорезистентности энтерококков, изученные нами ранее [3–6].

Регрессионные уравнения были рассчитаны в программе «STATISTICA 10».

Результаты исследования. Данные, характеризующие биологические признаки, отличающие клинические и фекальные изоляты, были обработаны посредством пакета программ «STATISTICA 10». Конечным этапом математической обработки явилось получение регрессионных моделей, позволяющих дифференцировать бактерии рода *Enterococcus*

на представителей нормальной микрофлоры и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний. Биологические свойства исследуемого штамма энтерококков вводили в формулу для расчёта регрессионного уравнения:

$$Y_1 = -1,11911 + 0,20244X_1 + 0,03078X_2 + 1,38136X_3 + 0,00336X_4 - 1,11928X_5 + 0,32994X_6 + 0,28211X_7, \quad (1)$$

где Y_1 — регрессионное уравнение, дифференцирующее энтерококков — представителей нормальной микрофлоры и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний;
 X_1 — антилизоцимная активность (АЛА), мкг/мл;
 X_2 — антикарнозиновая активность (АКрА), мг/мл;
 X_3 — коэффициент биоплёнкообразования (КБ), усл. ед.;
 X_4 — полиантибиотикорезистентность;
 X_5 — протеолитическая активность (ПА), мг/мл · мин;
 X_6 — желатиназная активность (ЖА);
 X_7 — гемолитическая активность (ГА).

При этом биологические свойства энтерококков с учётом их качественной и количественной характеристики дифференцировали в условных и абсолютных единицах. Протеолитическая активность, антилизоцимная, антикарнозиновая активности и биоплёнкообразование — эти количественные признаки были оценены в абсолютных единицах. Желатиназная, гемолитическая активности и полиантибиотикорезистентность определялись как качественные признаки. Их наличие оценивалось в 1 усл. ед., а отсутствие этих свойств обозначалось как 0 усл. ед. Результат оценивали путём сравнения полученной величины регрессионного уравнения с диапазоном величин, характерных для патогенных и апатогенных изолятов энтерококков: если $Y < 0,5$ — штамм *Enterococcus* sp. является представителем нормальной микрофлоры, если $Y > 0,5$ — изолят *Enterococcus* sp. клинически значим.

Иллюстрацию расчётов рассмотрим на следующих примерах.

Пример 1. Исследуемый штамм *E. faecalis* 119, выделенный из фекалий коровы, характеризовался следующими биологическими свойствами: АЛА — 1,515 мкг/мл, АКрА — 2,941 мг/мл, коэффициент биоплёнкообразования — 1,1 усл. ед., полиантибиотикорезистентность отсутствует, ПА — 0,787 мг/мл · мин, желатиназная и гемолитическая активности отсутствуют. Расчёт регрессионного уравнения следующий:

$$Y_1 = -1,11911 + 0,20244x_{1,515} + \\ + 0,03078x_{2,941} + 1,38136x_{1,1} + 0,00336x_0 - \\ - 1,11928x_{0,787} + 0,32994x_0 + 0,28211x_0 = 0,1988.$$

$Y_1 < 0,5$, следовательно, это – штамм энтерококка, являющийся представителем нормальной микрофлоры.

Пример 2. Из секрета вымени коровы, страдающей гнойным маститом, выделена культура энтерококка, которая была идентифицирована до вида (*E. faecalis*). Поскольку, с одной стороны, молочнокислые микроорганизмы, в том числе энтерококки, являются специфической микрофлорой молока, а с другой – энтерококки могут выступать в роли этиологического фактора маститов, у штамма были определены информативные биологические признаки: АЛА – 1,711 мкг/мл, АКрА – 1,001 мг/мл, коэффициент биоплёнкообразования – 1,1 усл. ед., штамм полиантибиотикорезистентный, протеолитическая активность – 0,261 мг/мл · мин, желатиновая и гемолитическая активности отсутствуют. Расчёт регрессионного уравнения следующий:

$$Y_1 = -1,11911 + 0,20244x_{1,711} + \\ + 0,03078x_{1,001} + 1,38136x_{1,1} + 0,00336x_1 - \\ - 1,11928x_{0,261} + 0,32994x_0 + 0,28211x_0 = 0,7709.$$

$Y_1 > 0,5$, следовательно штамм относится к патогенной микрофлоре.

Доказано, что биологические свойства микроорганизмов, в частности их персистентный потенциал, имеют высокую диагностическую ценность, поэтому мы предприняли попытку рассчитать регрессионное уравнение, включающее в качестве информативных признаков факторы персистенции энтерококков (АЛА, АКрА и биоплёнкообразование), а также видовую принадлежность штамма. Указанные биологические свойства исследуемых культур энтерококков вводили в формулу (2) для расчёта регрессионного уравнения в абсолютных (АЛА, АКрА, БПО) и условных единицах (*E. faecalis* – 1, *non-faecalis* виды – 0):

$$Y_2 = -1,88332 + 0,46732X_1 + 0,39772X_2 - \\ - 0,01994X_3 + 1,36163X_4, \quad (2)$$

где Y_2 – регрессионное уравнение, дифференцирующее энтерококков – представителей нормальной микрофлоры и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний;

X_1 – видовая принадлежность;

X_2 – антилизоцимная активность, мкг/мл;

X_3 – антикарнозиновая активность, мг/мл;

X_4 – коэффициент биоплёнкообразования, усл. ед.

Оценка результата проводилась путем сравнения полученной величины регрессионного уравнения с диапазоном величин, характерных для патогенных и апатогенных изолятов энтерококков: если $Y < 0,5$ – штамм *Enterococcus* sp. является представителем нормальной микрофлоры, если $Y > 0,5$ – изолят *Enterococcus* sp. клинически значим.

Для иллюстрации расчётов приводим следующие примеры.

Пример 1. Из фекалий быка-производителя был выделен штамм, идентифицированный как *E. durans*. Параллельно культуру протестировали на наличие информативных признаков, которые имели следующие значения: АЛА – 1,603, АКрА – 2,387, коэффициент биоплёнкообразования – 1,10. Расчёт регрессионного уравнения имел следующий вид:

$$Y_2 = -1,88332 + 0,46732x_0 + 0,39772x_{1,603} - \\ - 0,01994x_{2,387} + 1,36163x_{1,1} = 0,2044.$$

$Y_1 < 0,5$, следовательно, штамм относится к нормальной микрофлоре.

Пример 2. У кота с мочекаменной болезнью было проведено количественное микробиологическое исследование мочи, из которой были выделены энтерококки с пограничным значением показателя микробной обсеменённости мочи. В связи с этим этиологическая значимость урокультуры энтерококка была оценена с помощью дифференциальной математической модели. Для этого изолят идентифицировали до вида (*E. flavescens*) и определили у него необходимые диагностические биологические свойства. Уроштамм обладал антилизоцимной (1,315 мкг/мл), антикарнозиновой (3,100 мг/мл) активностями и формировал биоплёнки (1,5 усл. ед.). Расчёт регрессионного уравнения приведён ниже:

$$Y_2 = -1,88332 + 0,46732x_0 + 0,39772x_{1,315} - \\ - 0,01994x_{3,100} + 1,36163x_{1,5} = 0,6203.$$

$Y_2 > 0,5$, что соответствует значению клинически значимого штамма.

Для упрощения регрессионного уравнения с целью использования в практике производственных ветеринарных лабораторий мы ограничились определением четырёх биологических характеристик: биоплёнкообразование, протеолитическая, желатиновая и гемолитическая активности, на основании которых было рассчитано регрессионное уравнение для дифференциации культур *Enterococcus* spp. на патогенные и апатогенные варианты. Указанные биологические свойства исследуемых штаммов энтерококков вводили в формулу (3) для расчёта регрессионного уравнения в абсолютных (КБ, ПА) и условных (ЖА, ГА) единицах.

$$Y_3 = -0,87947 + 1,49972X_1 - 1,09873X_2 + \\ + 0,33292X_3 + 0,27716X_4, \quad (3)$$

где Y_3 – регрессионное уравнение, дифференцирующее энтерококков – представителей нормальной микрофлоры и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний;

X_1 – коэффициент биоплёнкообразования, усл. ед.;

X_2 – протеолитическая активность, мг/мл · мин;

X_3 – желатиновая активность;

X_4 – гемолитическая активность.

Если $Y_3 > 0,5$, то штамм является вирулентным; если $Y_3 < 0,5$ – авирулентным.

Приведём следующие примеры.

Пример 1. Исследуемый штамм *E. faecium* 79, выделенный из фекалий свиньи, характеризовался

следующими биологическими свойствами: коэффициент биоплёнокообразования – 1,03 усл. ед., протеолитическая активность – 0,442 мг/мл · мин, желатиназная и гемолитическая активности отсутствовали. Результаты расчёта регрессионного уравнения приведены ниже:

$$Y_3 = -0,87947 + 1,49972x_{1,03} - 1,09873x_{0,442} + 0,33292x_0 + 0,27716x_0 = 0,1799.$$

$Y_3 < 0,5$, следовательно, штамм авирулентный.

Пример 2. У культуры *E. faecalis*, изолированной из экскрета половых органов собаки с эндометритом, определили необходимые диагностические признаки: КБ – 1,3 усл. ед., ПА – 0,254 мг/мл · мин, желатиназная и гемолитическая активности отсутствовали. Расчёт регрессионного уравнения следующий:

$$Y_3 = -0,87947 + 1,49972x_{1,3} - 1,09873x_{0,254} + 0,33292x_0 + 0,27716x_0 = 0,7915.$$

$Y_3 > 0,5$, следовательно, выделенный штамм энтерококка патогенный.

Исследуемые нами выборки штаммов энтерококков, изолированных от здоровых животных и от животных с инфекционно-воспалительными заболеваниями, были рассчитаны с помощью созданных математических моделей на вероятность вхождения каждого из штаммов в определённую выборку. Результатом проведённых расчётов стало 95-процентное подтверждение данных, полученных в ходе бактериологического эксперимента.

Таким образом, охарактеризованные биопробы фекальных и клинических изолятов энтерококков позволили определить ведущие информативные признаки для дифференциации патогенных *Enterococcus* spp. от представителей нормальной микрофлоры и разработать математические модели, позволившие дифференцировать 95% штаммов энтерококков, выделенных от животных.

Вывод. Полезные свойства симбиотических энтерококков определили их частое использование в медицине и ветеринарии в качестве пробиотиков, а также в пищевой промышленности в составе заквасок. Между тем возросшее клиническое значение бактерий рода *Enterococcus* ставит вопрос о безопасности их применения и актуализирует проблему дифференциации этиологически значимых штаммов и представителей нормальной микрофлоры.

В литературе описан способ дифференциации энтерококков, являющихся представителями нормальной микрофлоры человека, от патогенных энтерококков путём разграничения потенциально опасных штаммов по их генетическому профилю с применением полимеразной цепной реакции. При обнаружении генов, кодирующих факторы вирулентности, делают заключение о патогенности штамма энтерококка [7]. Несостоятельность

указанного подхода подтверждается в работе D. Johansson, M. Rasmussen (2013), которые, проанализировав биопробы 42 энтерококков, выделенных из кишечника здоровых людей и пациентов с инфекционным эндокардитом энтерококковой этиологии, не обнаружили существенных различий в частоте встречаемости генетических детерминант вирулентности [8]. Генетическая детерминация факторов патогенности ещё не доказывает фенотипическую реализацию данного свойства в конкретных условиях *in situ*. Более того, обнаружение признака недостаточно для чёткой дифференциации культур микроорганизмов; необходимы определение уровня экспрессии, а также выявление совокупности наиболее информативных параметров, что в настоящее время позволяют делать современные методы математического анализа [9].

В нашей работе впервые с применением математического анализа были определены ведущие информативные признаки для дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов энтерококков, выделенных от животных (видовая принадлежность, антилизоцимная, антикарнозиновая активности, коэффициент биоплёнокообразования, полиантибиотикорезистентность, протеолитическая, желатиназная и гемолитическая активности). На основе полученных данных рассчитаны три регрессионных уравнения, которые легли в основу программ для ЭВМ и используются в работе ГБУ «Оренбургская областная ветеринарная лаборатория» для дифференциации бактерии рода *Enterococcus*.

Литература

1. Бухарин О.В., Вальшешва И.В., Карташова О.Л. и др. Характеристика вирулентного потенциала клинических изолятов энтерококков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 3. С. 13–18.
2. Сычёва М.В., Вальшешва И.В. Скрининг антагонистической активности и детерминант вирулентности у фекальных штаммов энтерококков // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2012. № 4 (36). С. 236–239.
3. Пошвина Д.В., Щепитова Н.Е., Сычёва М.В. и др. Видовая характеристика и факторы персистенции энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии // Ветеринария. 2015. № 6. С. 26–30.
4. Пошвина Д.В., Сычёва М.В. Антибиотикорезистентность клинических изолятов бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН [электронный журнал]. 2014. № 3. URL: <http://www.elmag.uran.ru>.
5. Пошвина Д.В., Сычёва М.В. Видовая характеристика и протеолитическая активность энтерококков // Вестник ветеринарии. 2014. № 2 (69). С. 40–43.
6. Щепитова Н.Е., Пошвина Д.В., Сорокин В.И., Сычёва М.В. Биологическое разнообразие энтерококков, выделенных от животных, в норме и при патологии // Труды Кубанского ГАУ. 2013. № 4 (43). С. 243–245.
7. Вершинин А.Е., Колоджиева В.В., Ермоленко Е.И. и др. Генетическая идентификация как способ выявления патогенных и симбиотических штаммов энтерококков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2008. № 5. С. 83–87.
8. Johansson D., Rasmussen M. Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora // Microb. Pathog. 2013. Vol. 55. P. 28–31.
9. Бухарин О.В., Вальшев А.В. Биология и экология энтерококков. Екатеринбург: УрО РАН, 2012. 227 с.