

Кочкина Елена Евгеньевна

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ
ЭНТЕРОКОККОВ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТОВ
С ПРОБИОТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ**

06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Оренбургский государственный аграрный университет» (ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ).

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент
Сычева Мария Викторовна.

Официальные оппоненты: **Плешакова Валентина Ивановна** – доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБОУ ВО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», кафедра ветеринарной микробиологии, инфекционных и инвазионных болезней, заведующий;

Лебедева Ирина Анатольевна – доктор биологических наук, доцент, ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения РАН», Уральский научно-исследовательский ветеринарный институт, ведущий научный сотрудник.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий Российской академии наук».

Защита диссертации состоится 26 февраля 2021 года в 12.00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.003.03 при ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ по адресу: 450001, Республика Башкортостан, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, 2 корпус, ауд. 325.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ www.bsau.ru.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Отзывы на автореферат направлять по адресу: 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34, ученому секретарю диссертационного совета Д 220.003.03.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Николаева
Оксана Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В последние годы всё больше внимания уделяется изучению биологических свойств микроорганизмов, входящих в состав нормальной микрофлоры (Karimi S. et al., 2018; Wang J. et al., 2019; Jin M. et al., 2020). В плане практического использования одними из перспективных представителей симбиотической микробиоты организма человека и животных являются энтерококки.

На протяжении десятилетий бактерии рода *Enterococcus* применяются в производстве традиционных ферментированных продуктов питания (El-Samragy Y.A. et al., 1988; Centeno J.A. et al., 1996; Du L. et al., 2017; Sheoran P., Tiwari S.K., 2019; Graham K. et al., 2020). Кроме того, обладая рядом полезных функций (иммуномодулирующая (Gupta V., Garg R., 2009; Kim B. et al., 2019), противоопухолевая (Gu Y.H. et al., 2017), витаминообразующая (Divya J.V. et al., 2012; Li P. et al., 2017), детоксицирующая (Torcu A. et al., 2010)), бактериоцинопродуцирующие представители этого рода с успехом используются в качестве основы импортных пробиотических препаратов (Линекс, ЛЕК Д.Д. (Словения); Бифиформ® АО «Ферросан» (Дания); Biothree® ТоА (Япония); Symbioflor® 1 SymbioPharm (Германия); Bioflorin® Sanofi-aventis (Франция)) (Neuhaus K. et al., 2017; Tsukahara T. et al., 2018).

Принимая во внимание тот факт, что *Enterococcus* spp. являются потенциально-патогенными микроорганизмами, играющими важную роль в этиологии и патогенезе ряда заболеваний (Ike Y., 2017), вопрос разработки подходов к дифференциации авирулентных микроорганизмов этого рода и возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний следует считать актуальным.

Степень разработанности темы. Несмотря на то, что в настоящее время подробно охарактеризован вирулентный потенциал энтерококков, выделенных от животных (Пошвина Д.В. и др., 2014; Oliveira M. et al., 2016; Ben Said L. et al., 2017), дифференциация микроорганизмов по факторам патогенности не представляется возможной, поскольку, по мнению ряда исследователей, вирулентность не является результатом наличия только конкретных детерминант патогенности, а представляет собой более сложный процесс (Franz C.M. et al., 2011).

Альтернативным подходом к решению вышеобозначенной проблемы может явиться оценка способности микроорганизмов к инактивации компонентов эффекторных механизмов иммунитета, которая, по мнению Ю.А. Брудастова и Д.Г. Дерябина (1994), является комплексом маркеров, информативных при диагностике патогенной микрофлоры. Однако до настоящего времени персистентный потенциал энтерококков, выделенных от животных, изучен недостаточно (Пошвина Д.В. и др., 2015).

В настоящее время пробиотические препараты для животноводства на основе микроорганизмов рода *Enterococcus* в Российской Федерации отсутствуют. Между тем, известно, что зарубежные штаммы энтерококков, входящие в состав пробиотиков, обладают низким уровнем антагонистической активности по отношению к патогенным микроорганизмам, выделенным на территории России (Зианбетова Л.Х., Вальшева И.В., 2009), что актуализирует поиск биотехнологически ценных культур в РФ.

Цель и задачи. Цель исследования – охарактеризовать биологические свойства клинических и фекальных культур *Enterococcus* spp., выделенных от животных; отобрать культуру энтерококков для разработки пробиотического биопрепарата и оценить её биологическую активность *in vivo*.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить пенетрантность и выраженность факторов персистенции (антииммуноглобулиновой активности (АИГА) в отношении sIgA, антицитокиновой активности (АЦА) в отношении ФНО- α , ИЛ-10) у микроорганизмов рода *Enterococcus*, выделенных от животных, с учётом их видовой и клинической значимости.

2. Определить информативные свойства для построения математической модели дифференциации этиологически значимых штаммов *Enterococcus* spp. от представителей мутуалистической микробиоты.

3. Отобрать авирулентный штамм из числа симбиотических бактериоцинопродуцирующих энтерококков, перспективный для создания биопрепарата пробиотической направленности, и охарактеризовать его фенотипические свойства и генетическую структуру.

4. Изучить биологические эффекты перспективной культуры энтерококков *in vivo*.

Научная новизна исследований. Впервые изучена способность энтерококков, выделенных от здоровых животных и с инфекционно-воспалительными заболеваниями, изменять в условиях *in vitro* концентрацию цитокинов (ФНО- α , ИЛ-10) и секреторного IgA. Установлено, что этиологически значимые штаммы *Enterococcus* spp. обладают более высоким потенциалом к инаktivации интерлейкина-10 и секреторного IgA, чем кишечные изоляты. Выявлены значимые персистентные свойства, характеризующие авирулентные культуры энтерококков.

Разработан алгоритм отбора штаммов энтерококков, пригодных для создания безопасных бактериальных препаратов (свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2019664545).

Впервые проведено полногеномное секвенирование и аннотация генома штамма *Enterococcus faecium* ICIS 96, обладающего антагонистической активностью. Отсутствие у культуры генетических детерминант вирулентности делает штамм перспективным для использования в качестве основы биопрепаратов пробиотической направленности (решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2019144113 от 15.10.2020).

Впервые в условиях *in vivo* на модели цыплят-бройлеров продемонстрированы биологические эффекты культуры *E. faecium* ICIS 96. Установлено, что при введении в рацион цыплят-бройлеров штамм энтерококка нормализует микробиоценоз кишечного биотопа, благотворно влияет на физиолого-биохимический и иммунный статусы, существенно повышая сохранность поголовья и продуктивные качества птицы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты расширяют представление о роли факторов персистенции в дифференциации культур на симбиотическую и вирулентную микрофлору и являются основой для

разработки новых практических решений, позволяющих проводить скрининг биотехнологически ценных культур энтерококков.

Научная значимость исследования определяется получением новых знаний о способности энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии, инактивировать цитокины макроорганизма (ФНО- α , ИЛ-10) и секреторный IgA.

Практическое значение работы подтверждено разработкой способа «Скрининг биотехнологически ценных культур энтерококков для создания безопасных бактериальных препаратов» (свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2019664545).

Перспективный для практического использования штамм *E. faecium* ICIS 96 депонирован в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (г. Пушкин, г. Санкт-Петербург); геномная последовательность штамма депонирована в базе данных NCBI BioProject (геномный проект ID:PRJNA224116).

Результаты исследования функциональной активности культуры *E. faecium* ICIS 96 *in vitro* и *in vivo* открывают перспективы для её использования в составе биопрепаратов пробиотической направленности для нужд птицеводства.

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Способность энтерококков изменять в условиях *in vitro* концентрацию цитокинов (ФНО- α , ИЛ-10) и секреторного IgA варьирует в зависимости от их эквариантной принадлежности.

2. Предложен новый методический подход для отбора авирулентных культур энтерококков с целью включения в состав биопрепаратов, основанный на оценке распространённости и выраженности антицитокиновой активности в отношении ФНО- α и ИЛ-10.

3. Штамм *E. faecium* ICIS 96 положительно влияет на физиолого-биохимический и иммунный статусы цыплят-бройлеров, что определяет возможность его использования в качестве компонента пробиотической кормовой добавки для птицеводства.

Степень достоверности и апробация результатов исследований. Достоверность полученных результатов подтверждается значительным объёмом многократных лабораторных экспериментов, выполненных с использованием современных высокоточных приборов, применением методов статистической обработки, а также публикацией полученных результатов в международных и отечественных журналах с рецензированием ведущими учеными в данной области и апробацией основных результатов работы на научных конференциях.

Результаты научных исследований доложены и обсуждены на IX Российской научной конференции с международным участием «Персистенция и симбиоз микроорганизмов» (стендовый доклад) (г. Оренбург, 2018); ежегодной межвузовской научно-практической конференции «Студенты и аспиранты в науке» (г. Оренбург, 2018); международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны» (г. Санкт-Петербург, 2019) и удостоены диплома I степени; национальной научно-практической конференции с международным участием «Достижения и перспективы развития биологической и ветеринарной науки» (г. Оренбург, 2019); выставке научно-технического творчества молодых ученых Оренбургской области в рамках Всероссийской научно-практической конференции «Молодые ученые и специалисты – науке и практике страны» (г. Оренбург, 2019); заочном и очном этапах XVII Всероссийского конкурса молодежных авторских проектов и проектов в сфере образования, направленных на социально-экономическое развитие российских территорий, «Моя страна – моя Россия» (г. Оренбург, 2020); выставке научно-технического творчества «Оренбуржье – ТЕРриторИЯТехНО» (г. Оренбург, 2020).

Личный вклад соискателя. Определение направления научного исследования, формулировка цели и постановка задач осуществлены совместно с научным руководителем. Автором самостоятельно выполнена основная часть экспериментов, проведена их статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов. Обсуждение и подготовка материалов научных публикаций проводились совместно с соавторами. Доля личного участия автора составила не менее 80%.

Связь работы с плановыми исследованиями и научными программами. Представленные данные – составная часть темы открытого плана НИР ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ: «Роль факторов персистенции условно-патогенных микроорганизмов в инфекционном процессе» (№ государственной регистрации АААА-А17-117092740002-9).

Исследования были проведены при поддержке гранта Молодежного форума Приволжского федерального округа «iВолга» (2019); гранта молодежного научно-инновационного конкурса «УМНИК-2019»; гранта Правительства Оренбургской области для финансирования инновационных проектов научных коллективов в 2019 г. (№ 29).

Публикации. Основные научные результаты опубликованы в 8 печатных работах, из них 2 статьи в международных журналах, индексируемых в базах данных Scopus и Web of Science; 2 – в изданиях, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования РФ, получено решение о выдаче патента РФ на изобретение, свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 143 страницах компьютерной верстки, содержит 8 таблиц и 23 рисунка. Диссертация состоит из общей характеристики работы, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, библиографического списка, который включает 213 наименований, в том числе 148 работ иностранных авторов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В литературном обзоре дана общая характеристика бактерий рода *Enterococcus*, представлены сведения о современном систематическом положении микроорганизмов этого рода, их факторах персистенции; рассматривается бактериоциногенный потенциал энтерококков. Отдельный подраздел обзора литературы посвящён использованию пробиотических культур *Enterococcus* spp. в птицеводстве.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Работа проводилась в период с 2018 по 2020 г. на базе лаборатории кафедры микробиологии и заразных болезней, межкафедральной комплексной аналитической лаборатории факультета ветеринарной медицины и вивария ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ, в лаборатории персистенции и симбиоза ОФИЦ УрО РАН. Общая схема исследований представлена на рисунке 1.



Рисунок 1 – Общая схема исследований

Объектом исследования послужили 98 штаммов энтерококков. Из них 44 культуры были выделены из фекалий клинически здоровых продуктивных животных и представлены видами *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. flavescens*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, 12 штаммов (*E. faecalis*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. casseliflavus*) были изолированы из кишечного биотопа птиц. Кроме того, были использованы 42 культуры энтерококков – возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний животных. Из них 16 штаммов из экскрета половых органов самок с эндометритами (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. avium*, *E. durans*); 22 культуры видов *E. flavescens*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* из раневого отделяемого и 4 изолята из секрета молочных желёз при маститах (*E. hirae*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*).

Способность микроорганизмов инактивировать секреторный иммуноглобулин А определяли по методике О.В. Бухарина с соавт. (2004). Антицитокинную активность оценивали фотометрически (Бухарин О.В. и др., 2011).

При помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) у изолятов энтерококков выявляли гены, кодирующие синтез известных бактериоцинов: энтероцин А – *entA*, энтероцин В – *entB*, энтероцин Р – *entP*, энтероцин L50А – *entL50A*, энтероцин L50В – *entL50B*, энтероцин AS-48 – *entAS-48*, цитолизин – *cylLs*. Генетические детерминанты *entA*, *entB* определяли при помощи «гнездовой» ПЦР (Foulquié Moreno M.R. et al., 2003).

Антагонистическую активность *Enterococcus* spp. определяли чашечным методом (принцип отсроченного антагонизма) (Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г., 1966).

Для проведения полногеномного секвенирования из суточной культуры микроорганизма выделяли геномную ДНК с помощью фенол-хлороформного метода. Библиотеки ДНК готовили с использованием набора Nextera XT DNA (Illumina, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование полученных библиотек ДНК проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq® Reagent Kit v3 (Illumina, США) на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Персистенция микроорганизмов» Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН.

С помощью инструментов программного обеспечения Trimmomatic из полученных данных были удалены последовательности адаптеров, нуклеотиды с качеством ниже q30, N-нуклеотиды, прочтения длиной менее 50 нуклеотидов (Bolger A.M. et al., 2014). Сборку генома проводили *de novo* посредством программного обеспечения SPAdes версии 3.7.1 (Bankevich A. et al., 2012).

Исследования по оценке биологической активности *E. faecium* ICIS 96 *in vivo* проводили на цыплятах-бройлерах кросса «Кобб-500». При формировании групп подопытных птиц и проведении научных изысканий руководствовались «Методикой проведения научных и производственных исследований по кормлению сельскохозяйственной птицы» (Имангулов Ш.А. и др., 2004). Кормление птицы осуществляли сухими сбалансированными комбикормами с параметрами питательности, соответствующими рекомендуемым нормам кормления ВНИТИП. Птица имела свободный доступ к корму и воде.

Птицам опытной группы к основному рациону добавляли взвесь культуры *E. faecium* ICIS 96 в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия. Экспериментальный период у цыплят-бройлеров продолжался с суточного до 40-дневного возраста, в течение которого проводилось индивидуальное взвешивание, взятие содержимого толстого отдела кишечника и контрольные убои цыплят в 10-, 20-, 30- и 40-суточном возрасте, по 5 цыплят из каждой группы.

Отработку оптимальной дозы *E. faecium* ICIS 96 проводили на пяти группах цыплят-бройлеров кросса «Кобб-500», сформированных по принципу аналогов, по 30 голов в каждой. Цыплята первой группы получали с водой 0,1 мл взвеси культуры *E. faecium* ICIS 96 в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия на 1 кг живой массы с концентрацией клеток $0,5 \cdot 10^9$; второй группы – $0,75 \cdot 10^9$; третьей – $1 \cdot 10^9$. В рацион птицы четвертой группы вводили штамм энтерококков в дозе 0,2 мл миллиардной взвеси на 1 кг живой массы. Культуру энтерококка применяли с первого дня жизни и по 40-е сутки включительно. Птица пятой группы культуру микроорганизма не получала и являлась контрольной.

За всеми особями устанавливали наблюдение, при этом особое внимание обращали на клиническое состояние, сохранность птицы. В течение всего опыта, раз в декаду проводилось индивидуальное взвешивание и контрольные убои цыплят в 10-, 20-, 30- и 40-суточном возрасте по 5 голов из каждой группы. Живую массу тела цыплят определяли взвешиванием на весах. О скорости роста живой массы цыплят судили по абсолютной и относительной величине прироста.

Бактериологическое исследование содержимого толстой кишки осуществляли по О.Н. Минушкину (1999). Все выделенные микроорганизмы идентифицировали по культуральным, тинкториальным, морфологическим и биохимическим признакам.

Для определения морфологических показателей из подкрыльцовой вены птицы получали пробы крови, стабилизированные гепарином. В крови определяли количество лейкоцитов (Г/л), эритроцитов (Т/л), гематокрит (г/л), содержание гемоглобина (г/л), среднее содержание гемоглобина в эритроците (пг), средний объем эритроцита (фл), среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците (г/л) (Болотников И.А., Соловьев Ю.В., 1980).

Биохимические показатели изучали в сыворотке крови на фотометре STAT FAX 1904 (Awareness Technology, США) с помощью наборов фирмы «Ольвекс диагностика» по прилагаемым к ним инструкциям.

Анатомическое вскрытие тела птицы проводили по методике А.В. Комарова (1984). Для приготовления гистопрепаратов образцы органов иммунной системы, фиксированные в 10-процентном растворе формалина, заливали в парафин. Затем микротомом МПС-2 из каждого образца делали по 15 сегментальных срезов толщиной 4-16 мкм, затем их окрашивали для получения обзорной картины гематоксилин-эозином, по методу Н.А. Акимченкова (1973). На полученных гистосрезах определяли относительную площадь лимфоидных элементов органов с помощью методики точечного счета с использованием окулярной сетки под лупой МБИ-15 (Автандилов Г.Г., 1990). На срезах центральных органов иммунной системы оп-

ределяли относительные площади кортикальной и медуллярной зон, так как именно в них происходит пролиферация, созревание и выход Т- и В-лимфоцитов.

Каждую особь опытной и контрольной групп в возрасте 15 дней иммунизировали вакциной сухой живой АВИВАК-НБ из штамма «Ла-Сота» (ООО «НПП АВИВАК») методом выпаивания с водой по 0,2 мл на голову. Титр антител к возбудителю Ньюкаслской болезни в сыворотке крови цыплят-бройлеров в возрасте 40 суток определяли методом ИФА согласно инструкции к набору ID Screen Newcastle Indirect Conventional Vaccines (IDVet, Франция).

При определении продуктивности учитывали живую массу цыплят контрольной и опытной групп путем взвешивания на весах. Птицу взвешивали утром, до кормления. Для анализа роста молодняка птицы использовали производные величины, такие как абсолютный, относительный и среднесуточный приросты (Куликов Л.В., 2002). Данные величины вычисляли каждые 10 дней эксперимента.

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 (Ашмарин И.П., Воробьев А.А., 1962).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ «Биостатистика» и Microsoft Office Excel 2013. Регрессионная модель была получена с помощью пакета программ «STATISTICA 10».

2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Персистентный потенциал бактерий рода *Enterococcus*

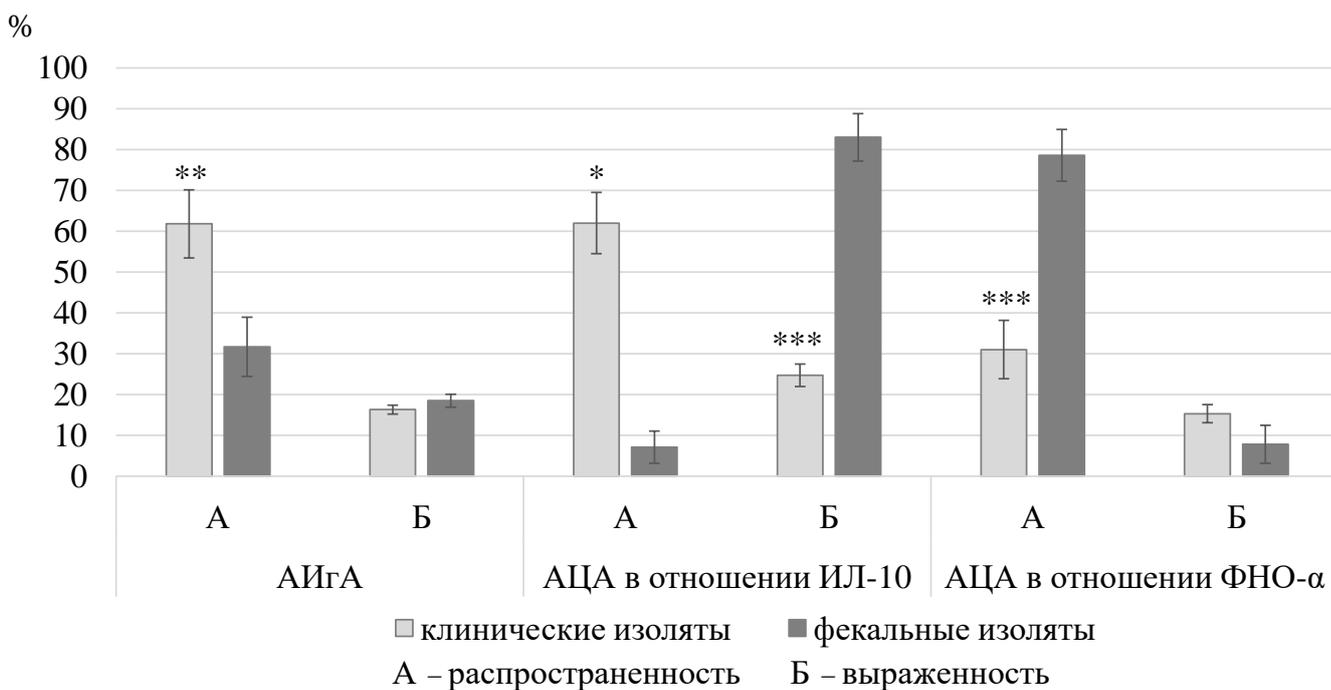
Энтерококки являются естественными обитателями организма животных и в то же время представителями группы условно-патогенных микроорганизмов, которые могут стать причиной инфекционно-воспалительных заболеваний. Комплексом маркеров, информативных при дифференциации вирулентных штаммов могут явиться факторы персистенции. Поэтому на первом этапе работы мы оценили персистентный потенциал энтерококков.

При изучении антииммуноглобулиновой активности энтерококков установлено, что 13 фекальных изолятов ($31,7 \pm 7,27\%$) обладали способностью инактивировать секреторный иммуноглобулин А. Среднее значение изучаемого фактора персистенции было равным $18,5 \pm 1,58\%$. Чаще всего способность деградировать sIgA регистрировали у штаммов вида *E. faecalis* ($30,8 \pm 12,80\%$), реже – у *E. hirae* ($23,1 \pm 11,69\%$), *E. faecium* ($23,1 \pm 11,69\%$), *E. durans*, *E. casseliflavus* и *E. flavescens* ($7,7\%$). Экспрессия антииммуноглобулинового признака среди фекальных культур энтерококков нарастала в ряду *E. hirae* ($15,9 \pm 0,79\%$) – *E. faecium* ($16,7\%$), *E. casseliflavus* ($16,7\%$), *E. flavescens* ($16,7\%$) – *E. faecalis* ($19,1 \pm 3,23\%$) – *E. durans* ($33,3\%$).

Установлено, что способностью к инаktivации секреторного иммуноглобулина А чаще обладали штаммы, выделенные из кишечного биотопа птиц ($50,0 \pm 14,43\%$), в то время как среди бактерий рода *Enterococcus*, изолированных из кишечника млекопитающих, АИГА встречалась лишь у четверти культур ($24,1 \pm 7,94\%$). Степень экспрессии признака так же была выше у энтерококков, вы-

деленных из кишечного биотопа птиц ($21,0 \pm 3,22\%$), по сравнению с фекальными изолятами *Enterococcus* spp. млекопитающих ($16,3 \pm 0,34\%$).

Проведенные исследования по изучению АИГА у этиологически значимых штаммов энтерококков позволили обнаружить данное свойство у 21 испытываемой культуры ($61,8 \pm 8,33\%$). При этом среднее значение изучаемого фактора персистенции было равным $16,3 \pm 1,12\%$ (в соответствии с рисунком 2). Среди клинических изолятов высоким уровнем признака характеризовались штаммы *E. faecalis* – $16,8 \pm 1,36\%$ и *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* – по $14,3\%$. Культуры *E. flavescens* и *E. hirae* не обладали антииммуноглобулиновой активностью в отношении sIgA.



Примечание: * – достоверность различий распространённости и выраженности факторов персистенции фекальных и клинических изолятов энтерококков ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$); *** – ($p < 0,001$).

Рисунок 2 – АИГА и АЦА фекальных и клинических изолятов *Enterococcus* spp.

АИГА клинических изолятов энтерококков зависела от источника выделения: чаще способность к деградации секреторного иммуноглобулина А регистрировали у штаммов энтерококков, выделенных из экскрета половых органов самок при эндометритах ($69,2 \pm 12,80\%$) и секрета молочных желёз при маститах ($66,7 \pm 27,22\%$). Среди культур, изолированных из гнойного экссудата, антииммуноглобулиновый признак в отношении секреторного иммуноглобулина А встречался у $56,0 \pm 12,40\%$ энтерококков. Степень выраженности антииммуноглобулиновой активности изменялась в зависимости от источника выделения, убывая в ряду: гнойный экссудат ($17,2 \pm 1,9\%$) – экскрет половых органов самок ($15,9 \pm 1,59\%$) – секрет молочных желёз ($14,3\%$).

Различия в распространённости АИГА у клинических штаммов энтерококков можно объяснить тем, что содержание секреторного иммуноглобулина А в гнойном экссудате меньше, чем на слизистых половых органов и протоках молочной железы

(Зубарева Н.А. и др., 2010; Николаева Н.И., 2011; Осипова Е.А., Суржикова Г.С., 2012). Уместно предположить, что в условиях биотопов макроорганизма с высокой концентрацией sIgA происходит селекция культур с наибольшей экспрессией антииммуноглобулинового признака.

Сравнительный анализ частоты встречаемости АИГА энтерококков, выделенных от животных в норме и при инфекционно-воспалительных заболеваниях, показал, что пенетрантность исследуемого свойства была значимо выше среди клинических культур энтерококков ($p < 0,01$), что согласуется с результатами, полученными О.В. Бухариным, А.В. Вальшевым (2012), в которых было показано, что клинические изоляты энтерококков, выделенные от человека, характеризуются более высокой частотой встречаемости факторов персистенции по сравнению с культурами, выделенными из кишечника.

Важным фактором персистенции, позволяющим микроорганизмам длительное время выживать в неблагоприятных условиях макроорганизма, является способность деградировать/связывать цитокины. При изучении антицитокиновой активности энтерококков установлено, что только три фекальных изолята ($7,1 \pm 3,96\%$) обладали способностью деградировать ИЛ-10. Экспрессия признака составила для культуры *E. durans* 73,3%, изолята *E. faecalis* – 80,0% и штамма *E. hirae* – 95,6%.

Распространенность АЦА в отношении изучаемого противовоспалительного цитокина среди клинических изолятов была значимо больше, чем среди фекальных культур, и составила $62,0 \pm 7,50\%$ ($p < 0,05$). Диапазон экспрессии признака варьировал от $24,7 \pm 2,74\%$ у этиологически значимых культур до $83,0 \pm 5,80\%$ у изолятов, выделенных из фекалий здоровых продуктивных животных ($p < 0,001$).

Чаще способность к инактивации ИЛ-10 отмечалась у штаммов энтерококков, выделенных из гнойного экссудата ($72,7 \pm 9,49\%$). Среди культур, изолированных из экскрета половых органов самок при эндометритах, АЦА в отношении ИЛ-10 встречалась у $56,0 \pm 12,40\%$ энтерококков. У $25,0 \pm 21,70\%$ изолятов, выделенных из секрета молочных желёз при маститах, обнаружена способность разрушать интерлейкин-10.

Степень выраженности антицитокинового признака изменялась в зависимости от источника выделения, нарастая в ряду: гнойный экссудат ($23,4 \pm 3,12\%$) – экскрет половых органов самок ($24,2 \pm 5,78\%$) – секрет молочных желёз ($35,6\%$).

Установлено, что способностью деградировать ФНО- α обладало $78,6 \pm 6,33\%$ энтерококков, выделенных из кишечного биотопа здоровых животных. Среди энтерококков, выделенных из клинического материала, распространенность АЦА в отношении фактора некроза опухоли была значимо ниже и составила $31,0 \pm 7,14\%$ ($p < 0,001$).

Достоверно чаще ($p < 0,05$) способность к инактивации ФНО- α отмечалась у штаммов, выделенных из секрета молочных желёз при маститах ($75,0 \pm 21,70\%$), в то время как среди энтерококков, изолированных из раневого отделяемого и экскрета половых органов самок при эндометритах, антицитокиновый признак встречался лишь у четверти штаммов ($27,3 \pm 9,49\%$ и $25,0 \pm 10,80\%$ соответственно).

Таким образом, энтерококки, выделенные из клинического материала, обладают значимо более высоким потенциалом к инактивации sIgA и противовоспали-

тельного цитокина интерлейкина-10, чем кишечные изоляты, что влияет на течение и исход инфекционного процесса. Фекальные культуры *Enterococcus* spp. характеризуются достоверно более высокими значениями распространённости АЦА в отношении провоспалительного цитокина ФНО- α , что, вероятно, обуславливает их адаптацию в кишечном биотопе организма хозяина и обеспечивает формирование иммунологической толерантности макроорганизма к симбиотической микробиоте.

2.2.2 Разработка программы для отбора биотехнологически ценных культур энтерококков, выделенных от животных

На следующем этапе работы на основании полученных данных о персистентных свойствах энтерококков с помощью современных методов статистики мы разработали алгоритм дифференциации клинически значимых штаммов *Enterococcus* spp. от представителей мутуалистической микробиоты, лишённых вирулентного потенциала. Для реализации этой задачи мы использовали данные сравнительного анализа частоты встречаемости и уровней выраженности изученных секретлируемых факторов персистенции (АИГА, АЦА) энтерококков, выделенных из клинического материала и кишечного биотопа животных. Оказалось, что наиболее выраженными отличительными особенностями характеризуется антицитокиновая активность *Enterococcus* spp., поэтому данные о распространённости и экспрессии указанного персистентного свойства были обработаны посредством пакета программ «STATISTICA 10». Конечным этапом математической обработки явилось получение формулы для расчёта регрессионного уравнения:

$$Y = 1,398 + 0,052 \cdot X_1 - 1,095 \cdot X_2 - 0,605 \cdot X_3,$$

где Y – регрессионное уравнение, позволяющее отбирать авирулентные, симбиотические культуры *Enterococcus* spp., пригодные для включения в состав биопрепаратов пробиотической направленности;

X_1 – антицитокиновая активность в отношении ФНО- α ;

X_2 – антицитокиновая активность в отношении ИЛ-10;

X_3 – переменная.

Результат оценивали путем сравнения полученной величины с диапазоном величин, характерных для вирулентных и авирулентных штаммов энтерококков: если $Y > 0,5$ – культура *Enterococcus* sp. не может быть включена в состав биопрепаратов, а если $Y < 0,5$ – изолят *Enterococcus* sp. может быть включен в состав биопрепаратов. На основе рассчитанного регрессионного уравнения была разработана программа для ЭВМ.

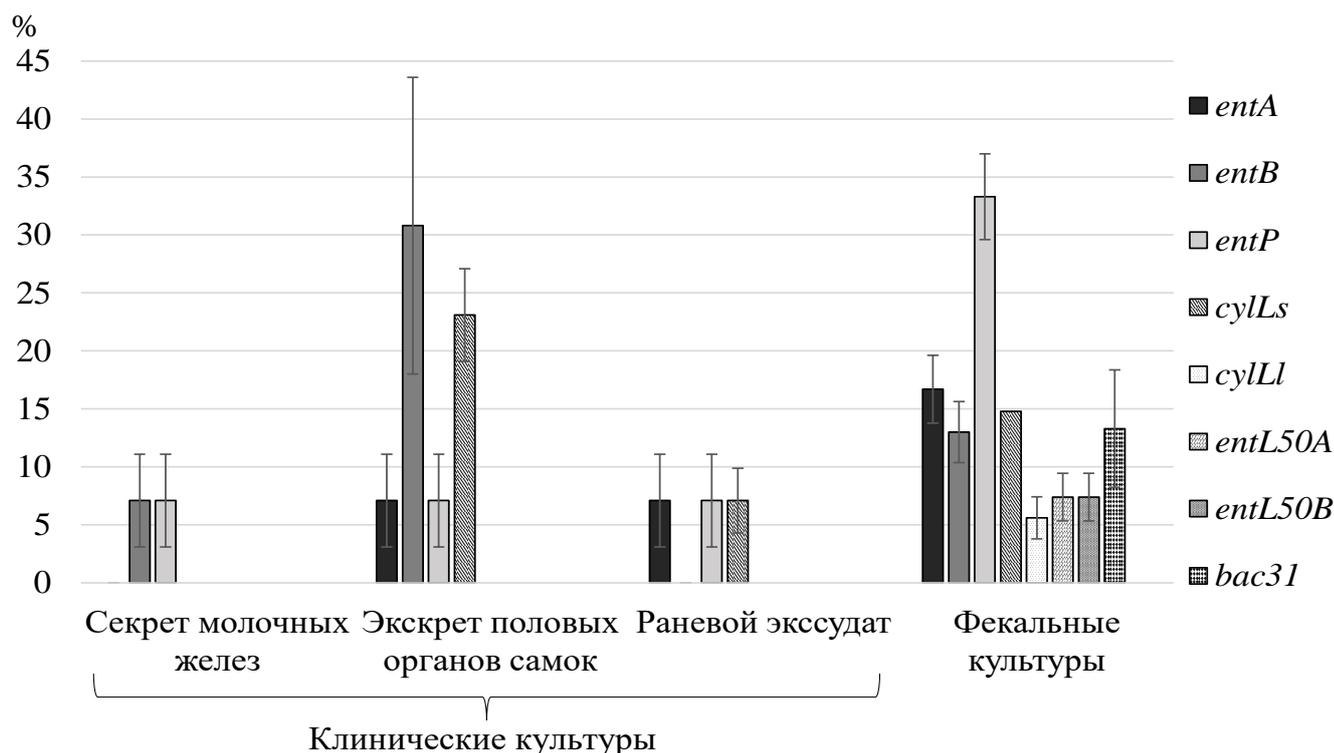
2.2.3 Распространенность генетических детерминант бактериоциногении в популяции фекальных и клинических изолятов энтерококков

Важным критерием при отборе пробиотических штаммов является способность бактерий синтезировать бактериоцины (Ben Braïek O. et al., 2018). Поэтому на следующем этапе работы нами был охарактеризован бактериоциногенный потенциал энтерококков, выделенных от животных.

Установлено, что среди клинических изолятов *Enterococcus* spp. 13 культур ($31,0 \pm 7,14\%$) обладали тем или иным геном, кодирующим синтез энтероцинов. Рас-

пространённость генов, кодирующих синтез бактериоцинов, изменялась в зависимости от локализации возбудителя. Так, наиболее часто генетические детерминанты бактериоциногенности выявлялись у штаммов, выделенных из секрета молочных желёз при маститах (100%) и среди культур *Enterococcus* spp., изолированных из экскрета половых органов самок (53,3±11,76%). У культур, выделенных из раневого экссудата, гены бактериоциногенности встречались значительно реже (12,0±6,50%, $p < 0,001$).

Самым распространённым в популяции этиологически значимых энтерококков оказался ген энтероцина В (38,5±13,50%). Генетическую детерминанту *cylLs* чаще регистрировали у изолятов *E. faecalis* – возбудителей эндометрита, чем у культур из раневого экссудата. Частота её обнаружения составила 23,1±11,69% и 7,7% случаев соответственно (в соответствии с рисунком 3).



Примечание: гены *entA* – энтероцин А, *entB* – энтероцин В, *entP* – энтероцин Р, *cylLs* – структурная субъединица цитолизина, *entL50A* – энтероцин L50А, *entL50B* – энтероцин L50В.

Рисунок 3 – Распространённость генов, кодирующих синтез энтероцинов, в популяции клинических и фекальных изолятов *Enterococcus* spp.

Гены энтероцина А и Р обнаружены соответственно у 15,4±10,01% и 23,1±11,69% *non-faecalis* штаммов энтерококков, изолированных из разных биотопов. Культур, содержащих генетические детерминанты энтероцинов AS-48, L50А и L50В, выявлено не было.

Все культуры этиологически значимых штаммов энтерококков имели в геноме одну генетическую детерминанту бактериоциногенности. Исключением явился изолят *E. durans*, который содержал комплекс из двух генов бактериоциногенности: *entB* и *entP*. Генами, кодирующими синтез энтероцинов, культуры *E. faecalis* обладали в

значимо меньшем проценте случаев ($21,2 \pm 7,11\%$) по сравнению с изолятами *non-faecalis* видов ($77,8 \pm 13,85\%$) ($p < 0,001$).

В популяции фекальных изолятов энтерококков генетические детерминанты бактериоциногении встречались в 2 раза чаще. Так, $61,1 \pm 3,83\%$ штаммов, выделенных из кишечника, обладали тем или иным геном, кодирующим синтез энтероцинов. Самым распространённым в популяции кишечных энтерококков был ген энтероцина P ($33,3 \pm 3,70\%$). Генетические детерминанты *entA* и *entB* зарегистрированы у $16,7 \pm 2,93\%$ и $13,0 \pm 2,64\%$ штаммов соответственно. В $7,4 \pm 2,06\%$ случаев у кишечных энтерококков обнаружены гены энтероцинов L50A и L50B. Генетическая детерминанта бактериоцина 31 (*bac31*) выявлена только среди культур *E. faecium* ($13,3 \pm 5,06\%$). Гены, кодирующие синтез большой (*cytLl*) и малой (*cytLs*) субъединиц цитолизина обнаружены в геноме $5,6 \pm 1,81\%$ и $14,8 \pm 2,79\%$ фекальных изолятов энтерококков, соответственно принадлежащих к видам *E. hirae* и *E. flavescens*. Культур *Enterococcus* spp., содержащих ген энтероцина AS-48, выявлено не было.

Таким образом, полученные нами данные указывают на широкую распространённость генов бактериоциногении среди клинических и фекальных культур энтерококков. Штаммы, имеющие в геноме генетические детерминанты бактериоциногении, перспективны в качестве компонентов антимикробных биопрепаратов пробиотической направленности после подтверждения их авирулентности, чему мы посвятили следующий раздел нашей работы.

2.2.4 Анализ полного генома штамма *E. faecium* ICIS 96

При помощи разработанной нами математической модели, из коллекции микроорганизмов была отобрана антагонистически активная культура *Enterococcus faecium* ICIS 96.

Для расшифровки генетической структуры отобранного штамма энтерококка было проведено полногеномное секвенирование. Установлено, что в структуре генома *E. faecium* ICIS 96 имеется пять генетических детерминант, ответственных за синтез бактериоцинов (*entA*, *entB*, *entL50A/B*, *лактобин A/цереин 7b*), а также гены, кодирующие синтез витаминов (биотин, рибофлавин, пиридоксин). Генетические детерминанты, ответственные за синтез известных факторов вирулентности, в геноме культуры *E. faecium* ICIS 96 не обнаружены.

Геномная последовательность штамма депонирована в базе данных NCBI BioProject (геномный проект ID:PRJNA224116). Культура *E. faecium* ICIS 96 депонирована в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (г. Пушкин, г. Санкт-Петербург) в качестве перспективной для включения в состав кормовых добавок пробиотической направленности, значимость разработки которых существенно возросла в связи с переходом на индустриальные методы выращивания, особенно в птицеводческой отрасли, являющейся одной из наиболее интенсивно и динамично развивающихся отраслей агропромышленного комплекса страны (Новикова М.В., Лебедева И.А., 2017; Плешакова В.И. и др., 2017; Коптев В.Ю. и др., 2017).

2.2.5 Биологическая активность культуры *E. faecium* ICIS 96 *in vivo* на модели цыплят-бройлеров

Полученные данные послужили обоснованием для изучения биологических свойств отобранного штамма энтерококка в условиях живого организма. В результате экспериментов по определению оптимальной дозы введения культуры *E. faecium* ICIS 96 в рацион птицы было установлено, что получение бройлерами культуры энтерококка в дозе 0,1 мл взвеси, содержащей $1 \cdot 10^9$ клеток/мл, на 1 кг живой массы способствует максимальному увеличению живой массы как в сравнении с особями, получавшими другие дозы культуры, так и с цыплятами контрольной группы. На основании изложенного полагаем, что оптимальной для введения в рацион птицы является доза 0,1 мл взвеси *E. faecium* ICIS 96, содержащей $1 \cdot 10^9$ клеток/мл, на 1 кг живой массы в сутки.

Проверить эту рабочую гипотезу мы решили в особой серии экспериментов. В ходе проведенного исследования установлено, что введение в рацион птицы культуры энтерококка способствовало стабилизации количества лейкоцитов в крови, в то время как у интактной птицы на 30-е сутки эксперимента величина рассматриваемого параметра выходила за рамки нормального (физиологического) значения (20,0-40,0 Г/л), составив $19,1 \pm 1,52$ Г/л (таблица 1).

Таблица 1 – Морфологические показатели крови птиц контрольной и опытной групп

| Показатель | Группа | Возраст, сут. | | | |
|--|----------|---------------|--------------|-------------|-------------|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Концентрация лейкоцитов, Г/л | Контроль | 28,4±0,29 | 22,7±0,69 | 19,1±1,52 | 25,7±0,64 |
| | Опыт | 26,0±0,89* | 23,6±0,54 | 23,7±0,54* | 24,0±0,89 |
| Концентрация эритроцитов, Т/л | Контроль | 4,2±0,27 | 2,7±0,24 | 2,4±0,26 | 3,7±0,17 |
| | Опыт | 3,3±0,80 | 2,6±0,13 | 3,3±0,13* | 2,8±0,29* |
| Гематокрит, % | Контроль | 50,4±2,99 | 28,9±2,36 | 24,7±2,81 | 51,1±8,49 |
| | Опыт | 38,9±9,73 | 27,7±1,32 | 28,4±6,38 | 38,2±4,66 |
| Концентрация гемоглобина, г/л | Контроль | 146,3±10,52 | 91,9±8,64 | 91,8±4,12 | 140,5±4,17 |
| | Опыт | 134,4±0,62 | 92,8±4,61 | 110,3±4,53* | 122,9±0,89* |
| Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг | Контроль | 46,5±0,64 | 45,0±0,67 | 48,0±1,55 | 49,3±0,69 |
| | Опыт | 48,9±10,95 | 47,1±0,17* | 44,4±0,90 | 51,4±1,31 |
| Средний объем эритроцита, фл | Контроль | 125,9±1,96 | 111,2±1,21 | 107,8±1,01 | 125,6±3,82 |
| | Опыт | 123,1±27,59 | 110,2±0,38 | 107,9±0,65 | 117,1±2,93 |
| Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/л | Контроль | 370,4±4,59 | 404,8±5,41 | 448,8±12,38 | 403,6±7,53 |
| | Опыт | 395,3±88,56 | 428,8±2,85** | 412,6±9,35* | 344,9±85,61 |

Примечание: * – разница статистически значима между морфологическими показателями крови птиц контрольной и опытной групп ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$).

Динамика содержания эритроцитов в крови птицы опытной группы имела волнообразный характер. В моменты снижения рассматриваемый показатель уступал контрольным значениям от 3,7 до 24,3%. Уместно предположить, что для того, чтобы в условиях эритропении решить проблему обеспечения тканей кислородом, организм должен пойти на увеличение насыщения эритроцитов гемоглобином. Так, на 10-, 20- и 40-е сутки эксперимента птица, получавшая с рационом культуру энтерококка, превосходила сверстников контрольной группы по содержанию гемоглобина в эритроците на 4,9; 4,5 ($p<0,05$) и 4,1% соответственно.

В целом динамика гемоглобина у подопытных бройлеров подчинялась тем же закономерностям, что и изменения количества эритроцитов.

Логично выглядит и динамика гематокрита крови бройлеров при использовании культуры энтерококка. В возрасте 30 суток гематокрит в опытной группе превосходил контрольные значения на 13,0%, в остальных исследованных возрастах – уступал 4,2-25,2%.

Меньший по сравнению с контрольной группой объем эритроцитов в первые 20 суток экспериментального периода при использовании *E. faecium* ICIS 96 сопровождался гиперхромией, на что указывает достоверное увеличение содержания гемоглобина в эритроците на 4,5% ($p<0,05$) и его концентрации в клетке – на 5,6% ($p<0,01$).

На следующем этапе работы был оценен энергетический обмен подопытной птицы. В нашем исследовании было показано, что динамика глюкозы не имела однозначной зависимости при использовании *E. faecium* ICIS 96 в рационе птицы (таблица 2).

Таблица 2 – Показатели энергетического обмена в организме бройлеров контрольной и опытной групп

| Показатель | Группа | Возраст, сут. | | | |
|---------------------|----------|---------------|-----------|-----------|------------|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Глюкоза, ммоль/л | Контроль | 10,5±0,15 | 12,1±1,36 | 9,7±0,22 | 10,8±0,21 |
| | Опыт | 9,7±0,39 | 12,9±0,58 | 8,7±0,28* | 11,4±0,64 |
| ПВК, мкмоль/л | Контроль | 40,0±1,50 | 51,1±0,98 | 49,1±0,76 | 57,6±1,36 |
| | Опыт | 43,8±0,72 | 51,4±1,09 | 53,0±1,76 | 54,6±1,43 |
| Холестерол, ммоль/л | Контроль | 4,0±0,18 | 3,2±0,13 | 3,2±0,15 | 2,4±0,16 |
| | Опыт | 3,4±0,20 | 3,3±0,13 | 2,6±0,18* | 3,6±0,24** |
| ЛПВП, ммоль/л | Контроль | 1,9±0,07 | 1,3±0,26 | 1,6±0,22 | 1,0±0,10 |
| | Опыт | 1,6±0,28 | 2,0±0,13* | 2,0±0,11 | 1,6±0,14* |
| ТАГ, ммоль/л | Контроль | 1,4±0,14 | 0,8±0,07 | 0,3±0,02 | 0,7±0,06 |
| | Опыт | 0,9±0,05* | 0,6±0,15 | 0,3±0,02 | 0,8±0,04 |

Примечание: * – разница статистически значима между биохимическими показателями крови птиц контрольной и опытной групп ($p<0,05$); ** – ($p<0,01$).

Применение *E. faecium* ICIS 96 способствовало увеличению концентрации пировиноградной кислоты в крови цыплят во все учетные отрезки времени. По мнению ряда авторов (Рылова Н.В., Кондратьева О.В., 2011; Рыскина Е.А., 2014), пировиноградная кислота оказывает стимулирующее действие на процессы эритро- и

лейкопоэза, снижает активность каталазы и супероксиддисмутазы, активирует пируватдегидрогеназу, стимулируя тем самым образование холестерина. Поскольку ПКВ является центральным метаболитом и связующим звеном между обменом белков, углеводов и жиров, выполняя параллельно регуляторную функцию (Зобнина Н.Л., Цапок П.И., 2017), регистрируемые изменения, на наш взгляд, следует оценивать как положительные.

Применение *E. faecium* ICIS 96 в составе рациона способствовало снижению количества холестерина до 30-х суток эксперимента. Вероятно, этот эффект может быть обусловлен способностью молочнокислых бактерий включать холестерин в клеточные мембраны во время роста, связывать его в тонком отделе кишечника, а также ингибировать ферменты, ответственные за холестерогенез (Kalavathy R. et al., 2003; Ooi L.G., Liong M.T., 2010; Zhao X. et al., 2013).

В ходе исследования нами зафиксировано увеличение концентрации холестерина липопротеидов высокой плотности (ЛПВП) у цыплят-бройлеров опытной группы по сравнению с птицей контрольной группы начиная с 20-х суток эксперимента. Полученные результаты согласуются с данными V. Tayeri et al. (2018), которые отмечали повышение концентрации холестерина ЛПВП и снижение концентрации холестерина липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови птиц при введении в их рацион многокомпонентного пробиотического препарата, содержащего молочнокислые микроорганизмы.

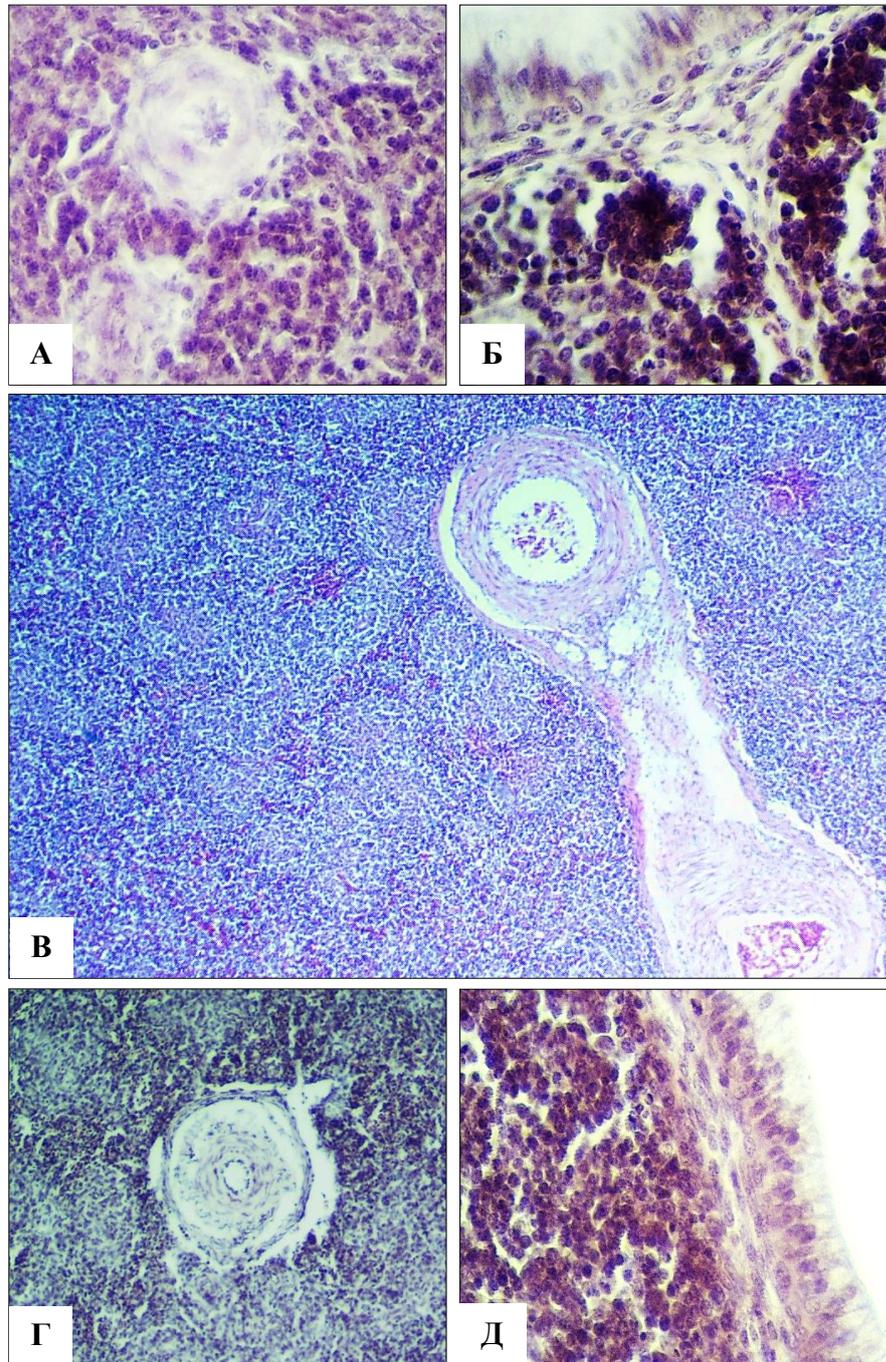
Установлено снижение концентрации триацилглицеролов (ТАГ) в крови бройлеров экспериментальных групп вплоть до 30-суточного возраста на 42,9-62,5% в контроле и на 33,3-50,0% в опыте, с последующим ростом к 40-суточному возрасту на 133,3 и 166,7% соответственно.

Таким образом, применение культуры *E. faecium* ICIS 96 способствует активации энергетического обмена в организме цыплят-бройлеров на ранних этапах онтогенеза по сравнению с птицей контрольной группы, приводит к интенсификации углеводного и липидного обмена.

На следующем этапе работы было оценено влияние культуры *E. faecium* ICIS 96 на состояние адаптивного иммунитета птицы. Гистологические структуры селезенки и фабрициевой сумки птиц контрольной группы за время исследования (10-40-е сутки) характеризовали становление морфологии и функций периферических органов кроветворения, что целесообразно трактовать как физиологическую норму.

Наиболее критическим периодом для формирования морфологических основ резистентности организма птиц являлся интервал 10-20-е сутки, когда в иммунокомпетентных органах формировались очаги дифференцировки Т- и В-клеточного иммунитета (в соответствии с рисунком 4 А, Б). В более поздние периоды (30-40-е сутки) отмечали только количественную динамику, так, в селезенке регистрировали увеличение стромального компонента с $7,3 \pm 0,75\%$ до $8,8 \pm 0,92\%$ и пропорциональный рост белой пульпы с $29,3 \pm 1,96\%$ до $31,0 \pm 2,07\%$, кроме того, количество фолликулов фабрициевой сумки в одном поле зрения возросло с $3,8 \pm 0,08$ шт. до $4,0 \pm 0,11$ шт., что отображало рост органа и птицы в целом.

Микроморфология исследуемых органов птиц опытной группы на фоне применения *E. faecium* ICIS 96 также характеризовалась как органотипическая. Однако в интервале 10-20-е сутки у птиц отмечалась интенсификация образования очагов дифференциации Т-лимфоцитов в селезенке (в соответствии с рисунком 4 А), что выражалось ранним, в сравнении с контрольной группой, увеличением диаметров и численности участков белой пульпы (в соответствии с рисунком 4 В). Также наблюдали активную пролиферацию лимфобластов и дифференцировку В-лимфоцитов фабрициевой сумки (в соответствии с рисунком 4 Д).



Примечание: гематоксилин и эозин. Об.40. Ок.15 (А, Б, Г, Д); Об.9. Ок.15 (В).

Рисунок 4 – Гистоструктура селезенки (А, В, Г) и фабрициевой бурсы (Б, Д) цыплят-бройлеров контрольной и опытной групп

К 30-40-м суткам происходит морфофункциональная переориентация, когда иммунопозитивная роль селезенки доминирует над бурсальной, о чем косвенно свидетельствовали стромально-эпителиальные соотношения исследуемых органов. Так, в сравнении с контрольной группой объем стромы на 30-е сутки стал ниже на 19,2%, а к концу исследования на 26,1%, тогда как относительное содержание белой пульпы достоверно ($p < 0,01$) возрастало на 30-40-е сутки с 35,5% до 40,00% соответственно. Количество фолликулов фабрициевой сумки в поле зрения имело идентичную, достоверную ($p < 0,05$) тенденцию к росту в сравнении с птицей контрольной группы.

Как показали результаты исследования по изучению напряженности иммунитета у птиц после вакцинации против болезни Ньюкасла, несмотря на то, что у цыплят-бройлеров обеих групп иммунный статус был положителен, титр антител у птицы, получавшей культуру энтерококка, был значимо выше, чем у интактных особей ($p < 0,05$).

Описанное нами иммуномодулирующее действие штамма *E. faecium* ICIS 96, очевидно, связано с одним из важнейших механизмов действия молочнокислых микроорганизмов на иммунную систему организма хозяина, который реализуется через стимуляцию или супрессию продукции цитокинов, не только оказывающих влияние на эффекторные клетки (гранулоциты, макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) (Ермоленко Е.И., 2014), но и принимающих участие в закладке и развитии органов иммунной системы (Каштальян О.А., Ушакова Л.Ю., 2017).

Обеспечение высокой продуктивности сельскохозяйственной птицы невозможно без формирования и функционирования устойчивого микробиоценоза кишечника (Кононенко С.И., 2016; Stanley D. et al, 2014), поэтому на следующем этапе работы мы предприняли попытку исследовать микробиоценоз толстого отдела кишечника бройлеров контрольной и опытной групп, получавших культуру *E. faecium* ICIS 96. Отмечено увеличение количества бактерий рода *Lactobacillus* в кишечнике птиц опытной группы во все учетные отрезки времени. К концу наблюдения численность лактобактерий в кишечном биотопе особей обеих групп была одинаковой и составляла $2,5 \cdot 10^7$ КОЕ/г в опыте и $2,6 \cdot 10^7$ КОЕ/г в контроле. Бифидобактерии были выявлены у подопытных цыплят начиная с 30-суточного возраста. Численность представителей этого рода была больше у цыплят, получавших культуру энтерококка. Полученные результаты находят подтверждение в работе W. Han et al. (2013), которые показали, что пробиотический штамм *E. faecalis* CG1.0007 может стимулировать рост лактобацилл и бифидобактерий.

Применение *E. faecium* ICIS 96 способствовало увеличению численности бактерий рода *Enterococcus* в кишечнике цыплят опытной группы, которая во все учетные отрезки была больше по сравнению с бройлерами контрольной группы. Различия в уровне колонизации кишечника птицы энтерококками оказались значимыми на 10-е ($3,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г против $1,4 \cdot 10^6$ КОЕ/г) и 30-е ($1,0 \cdot 10^6$ КОЕ/г против $5,7 \cdot 10^4$ КОЕ/г) сутки эксперимента ($p < 0,05$).

Эшерихии были обнаружены в составе микробиоценоза кишечника 10-суточных цыплят как контрольной, так и опытной группы. Однако у птицы, получавшей культуру энтерококка, их концентрация была в 2 раза меньше. Значитель-

но сниженным по сравнению с контролем оказалось содержание *E. coli* в кишечнике бройлеров опытной группы на 20-е сутки эксперимента.

Увеличение концентрации представителей мутуалистической микробиоты способствовало снижению обсемененности *Salmonella* spp. содержимого кишечника птицы опытной группы по сравнению с контролем. Бактерии рода *Proteus* в кишечнике цыплят обеих групп обнаружены не были.

Полученные результаты позволяют предположить, что введение в рацион штамма *E. faecium* ICIS 96 способствует нормализации кишечного микробиоценоза. Данная гипотеза находит подтверждение в работе Е.С. Красниковой с соавт. (2012), которые установили, что культура энтерококка, попадая в кишечник птицы, обеспечивает коррекцию микрофлоры желудочно-кишечного тракта и положительно влияет как на функционирование кишечника, так и на клинико-физиологический статус птицы, что в конечном итоге создает благоприятные условия для раскрытия биоресурсного потенциала бройлеров.

На следующем этапе работы была оценена продуктивность и сохранность поголовья цыплят-бройлеров. Установлено, что живая масса бройлеров, получавших с кормом культуру энтерококка, была больше аналогичного показателя цыплят контрольной группы во все учетные отрезки времени (таблица 3). Стимулирующее влияние культуры *E. faecium* ICIS 96 на рост и развитие цыплят-бройлеров прослеживается и по показателям среднесуточного прироста живой массы. Бройлеры опытной группы имели более высокие показатели убоя по сравнению с интактными особями. Так, цыплята, получавшие с кормом культуру энтерококка, к концу периода наблюдения превосходили птицу контрольной группы по массе полупотрошенной тушки на 180,4 г, или на 12,1% ($p < 0,001$), а по убойному выходу – на 11,0% ($p < 0,001$).

Таблица 3 – Продуктивность цыплят-бройлеров при введении в рацион культуры энтерококка

| Показатель | Группа | Возраст, сут. | | | |
|---------------------------------------|----------|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 |
| Живая масса, г | Контроль | 147,6±6,61 | 548,4±15,51 | 1324,0±42,7 | 2032,0±43,90 |
| | Опыт | 155,6±8,49 | 621,4±23,08* | 1496,0±50,7* | 2238,0±73,80* |
| Среднесуточный прирост живой массы, г | Контроль | 10,1±0,58 | 40,1±1,76 | 77,6±5,18 | 70,8±1,93 |
| | Опыт | 11,1±0,83 | 46,6±1,88* | 87,5±6,81 | 74,2±9,27 |
| Масса полупотрошенных тушек, г | Контроль | 98,2±4,63 | 348,0±9,80 | 942,0±7,80 | 1312,2±49,08 |
| | Опыт | 103,6±6,14 | 364,0±15,04 | 990,8±24,91 | 1492,6±34,61* |
| Убойный выход, % | Контроль | 66,2±0,37 | 63,6±2,32 | 68,0±2,28 | 64,6±1,36 |
| | Опыт | 66,4±0,41 | 68,8±3,46 | 70,2±2,81 | 72,6±0,75** |

Примечание: * – разница статистически значима между показателями продуктивности птиц контрольной и опытной групп ($p < 0,05$); ** – ($p < 0,01$).

Анализ абсолютного прироста живой массы показал, что включение культуры энтерококка в рацион уже после первой декады положительно отразилось на живой массе птицы (таблица 4).

Таблица 4 – Показатели абсолютного прироста живой массы цыплят-бройлеров, г

| Возрастной период, сут. | Абсолютный прирост, г | |
|-------------------------|-----------------------|--------------|
| | Контрольная | Опытная |
| 1-10 | 100,7±5,84 | 110,5±8,31 |
| 11-20 | 400,8±17,59 | 465,8±18,85* |
| 21-30 | 775,6±51,79 | 874,6±68,14 |
| 31-40 | 708,0±19,34 | 742,0±92,65 |

Примечание: * – достоверность различий абсолютного прироста живой массы птицы контрольной и опытной групп ($p < 0,05$).

Динамика стабильного роста сохранялась на протяжении всего периода выращивания. При этом наивысший прирост был получен у бройлеров опытной группы, который к концу третьей декады выращивания превосходил особей контрольной группы на 11,3%.

Учет сохранности поголовья показывает, что анализируемый показатель был на 6,7% выше в опытной группе цыплят-бройлеров и составлял 100%.

Таким образом, культура *E. faecium* ICIS 96 существенно повышает ростовые характеристики птицы и сохранность поголовья, что позволяет улучшить степень эффективного выращивания мясных цыплят.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Бактерии рода *Enterococcus* способны деградировать цитокины организма хозяина (ФНО- α , ИЛ-10) и секреторный IgA, что способствует их персистенции в макроорганизме.

2. Установлено, что этиологически значимые штаммы энтерококков значимо чаще обладают потенциалом к инактивации интерлейкина-10 и секреторного IgA, чем кишечные изоляты. Фекальные авирулентные культуры *Enterococcus* spp. характеризуются достоверно более высокими значениями распространённости АЦА в отношении цитокина ФНО- α по сравнению с клиническими изолятами *Enterococcus* spp.

3. На основании анализа распространённости и выраженности персистентных свойств энтерококков, выделенных от животных в норме и при патологии, создана математическая модель для скрининга биотехнологически ценных культур рода *Enterococcus*, которую можно использовать для отбора штаммов с целью создания безопасных бактериальных препаратов пробиотической направленности (свидетельство о государственной регистрации программ для ЭВМ № 2019664545).

4. С помощью оригинальной методики научно обоснованно отобрана авирулентная культура *Enterococcus faecium* ICIS 96 с уникальными свойствами, перспективная для включения в состав кормовой добавки пробиотической направленности.

5. Введение в рацион птицы культуры *E. faecium* ICIS 96 в дозе 0,1 мл взвеси, содержащей $1 \cdot 10^9$ клеток/мл, на 1 кг живой массы в сутки нормализует микробиоце-

ноз кишечного биотопа, стимулируя рост численности представителей мутуалистической микробиоты (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.), и является сдерживающим фактором в отношении размножения бактерий родов *Escherichia* и *Salmonella*.

6. Применение штамма *E. faecium* ICIS 96 в рационе цыплят-бройлеров благотворно влияет на постинкубационный морфогенез центральных и периферических органов иммунной системы птицы и значительно повышает титр антител у цыплят опытной группы после вакцинации против болезни Ньюкасла (на 10%) ($p < 0,05$).

7. Включение *E. faecium* ICIS 96 в состав рациона интенсифицирует метаболические процессы в организме цыплят-бройлеров, и в частности углеводного и липидного обменов, что благоприятно влияет на продуктивные качества птицы и обеспечивает высокую скорость роста живой массы.

Практические предложения

Рассчитанное нами регрессионное уравнение может быть использовано для отбора авирулентных, симбиотических культур *Enterococcus* spp., пригодных для включения в состав биопрепаратов пробиотической направленности.

Предложен авирулентный, антагонистически активный штамм *Enterococcus faecium* ICIS 96. Культура депонирована в Ведомственной коллекции полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения ОСХН РАН (г. Пушкин, г. Санкт-Петербург) (справка № 277/09 от 23.09.2019), получено решение о выдаче патента РФ на изобретение по заявке № 2019144113 от 15.10.2020.

Штамм *E. faecium* ICIS 96 рекомендуем использовать при создании препаратов пробиотической направленности для нужд птицеводства.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие исследования будут направлены на поиск и разработку эффективной лекарственной формы биопрепарата, содержащего культуру *E. faecium* ICIS 96, проведение предклинических испытаний, а также на разработку подходов к масштабированию процессов культивирования энтерококка в условиях биотехнологического производства.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в научных изданиях, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования

1. Genome Sequence of *Enterococcus faecium* Strain ICIS 96 Demonstrating Intermicrobial Antagonism Associated with Bacteriocin Production / Т.М. Pashkova, А.С. Vasilchenko, Y.A. Khlopko, **Е.Е. Kochkina** et al. // Genome Announcements. – 2018. – Vol. 6(10). doi: 10.1128/genomeA.00126-18.

2. The Change in the Energy Metabolism of Broiler Chickens Under the Influence of *Enterococcus faecium* ICIS 96 / **Е.Е. Kochkina**, А.А. Torshkov, L.G. Kislinskaya et al. // E3S Web of Conferences. – 2020. – Vol. 210. doi.org/10.1051/e3sconf/202021006008.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК
Министерства науки и высшего образования РФ

3. Распространенность генов бактериоциногении в популяции клинических изолятов *Enterococcus* spp. / **Е.Е. Кочкина**, М.В. Сычева, Т.М. Пашкова и др. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2017. – № 6 (68). – С. 252-254.

4. Антицитокриновая активность бактерий рода *Enterococcus*, выделенных от животных / **Е.Е. Кочкина**, М.В. Сычева, Т.М. Пашкова и др. // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. – 2019. – № 4 (57). – С. 25-31.

Публикации в других изданиях

5. **Кочкина, Е.Е.** Влияние штамма *E. faecium* ICIS 96 на показатели продуктивности и состав микрофлоры кишечника цыплят-бройлеров / Е.Е. Кочкина, М.В. Сычева // Материалы международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины и АПК страны». – СПб: Изд-во ФГБОУ ВО СПбГАВМ, 2019. – С. 141-142.

6. Изменение гематологических показателей цыплят-бройлеров при введении в рацион *Enterococcus faecium* ICIS 96 / **Е.Е. Кочкина**, М.В. Сычева, О.Л. Карташова и др. // Материалы Национальной научно-практической конференции с международным участием «Достижения и перспективы развития биологической и ветеринарной науки». – Оренбург: изд-во ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ, 2019. – С. 140-142.

Патенты и свидетельства о регистрации программ для ЭВМ

7. Скрининг биотехнологически ценных культур энтерококков для создания безопасных бактериальных препаратов / **Е.Е. Кочкина**, М.В. Сычева, О.Л. Карташова и др. // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2019664545 от 08.11.2019.

8. Штамм бактерий *Enterococcus faecium*, обладающий антагонистической активностью в отношении бактерий вида *E. coli*, родов *Enterococcus* и *Listeria* / **Е.Е. Кочкина**, М.В. Сычева, О.Л. Карташова, Т.М. Пашкова // Решение о выдаче патента на изобретение по заявке № 2019144113 от 15.10.2020.

Подписано в печать _____.

Формат 60*84/16. Усл. печ. л. _____. Печать цифровая.

Заказ № _____ Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии «ИНЭЛ Принт»

460000, г. Оренбург, ул. Володарского, 5.

Тел.: 8 (3532) 77-58-71