

ОЦЕНКА ЦИТОКИНОПОДОБНОЙ АКТИВНОСТИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ СТАФИЛОКОККОВОГО БЕЛКА А

© 2019 г. А. В. Зурочка^{1,2*}, В. А. Зурочка^{1,2}, Л. О. Фомина¹,
А. И. Файзуллина¹, М. А. Добрынина¹, В. А. Гриценко³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

²ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия;

³ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 17.05.2019. Принята: 27.06.2019

В работе изучена продукция цитокиноподобных веществ у 5 штаммов *Staphylococcus aureus*, имеющих и не имеющих генетические детерминанты стафилококкового белка А (ген *spa*). Ген *spa* у *S. aureus* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Цитокиноподобную активность супернатантов суточных бульонных культур *S. aureus* определяли при помощи иммунофлюоресцентных тест-систем компании Multiplex (Luminex, США) (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-1Ra, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF α , MCP1, MIP1b, TNF- α) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что не зависимо от наличия или отсутствия генетических маркеров белка А стафилококков в супернатантах изученных штаммов *S. aureus* выявлялись цитокино-подобные вещества. Таким образом, цитокиноподобная активность *S. aureus* не зависит от наличия у бактерий гена *spa*, ответственного за продукцию стафилококкового белка А.

Ключевые слова: *S. aureus*, цитокины, цитокиноподобные вещества, ген *spa*

DOI: 10.31857/S102872210007247-6

Адрес: Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Зурочка Александр Владимирович.

Тел.: +79193077598. E-mail: av_zurochka@mail.ru

Авторы:

Зурочка А. В., д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), Челябинск, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Зурочка В. А., д.м.н., профессор кафедры пищевых и биотехнологий, ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет», Челябинск, Россия; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Фомина Л. О., аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Файзуллина А. И., аспирант ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии образования, Екатеринбург, Россия;

Добрынина М. А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия;

Гриценко В. А., д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Ранее в наших исследованиях было показано, что в суспензиях суточных культур бактерий разных видов с помощью тест-систем для мультиплексного анализа разных компаний-производителей (BioRAD и Multiplex) выявляются цитокиноподобные вещества (ЦПВ),

аналогичные цитокинам человека, в широком спектре и различных концентрациях [1, 2]. Среди изученных таксонов микроорганизмов наиболее активными продуцентами ЦПВ являлись бактерии вида *Staphylococcus aureus*, причем часть штаммов выделяли в среду инкубации большое количество ЦПВ (до 21) и в относительно высоких концентрациях, тогда как другие изоляты либо их не секретировали, либо секретировали, но в незначительных количествах.

Учитывая, что многие штаммы *S. aureus* способны синтезировать и секретировать в питательную среду белок А, обладающий способностью неспецифически (через Fc-фрагменты) связываться с иммуноглобулинами G, логично предположить, что такая выраженная цитокиноподобная активность *S. aureus* могла быть связана с его продукцией. В то же время белок А секретруется не всеми штаммами данного вида стафилококков, и его нет у коагулазоотрицательных стафилококков, для которых также была показана цитокиноподобная активность [3].

Этот вопрос становится особенно актуален, если учесть, что недавно в исследованиях зарубежных авторов было установлено, что какие-то продукты отдельных клинических изолятов *S. aureus*, находящиеся в среде культивирования, при постановке ИФА обнаруживают перекрестную реакцию с антителами для мышинных цитокинов IL-1 β и TNF- α [4]. Эта кросс-реакция, которая, по мнению авторов, связана с некоторыми неизвестными продуктами *S. aureus*, взаимодействующими с антителами против мышинных цитокинов, может приводить к получению ложноположительных и завышенных результатов при определении концентрации цитокинов в тестируемых жидкостях. Поэтому важным является вопрос о возможном перекрестном реагировании ЦПВ бактерий с антителами против цитокинов человека, тестируемых иммунофлюоресцентным анализом. Остается не исследованной роль белка А стафилококков в этом процессе.

Указанные обстоятельства определяют повышенный интерес к вопросу, насколько связана цитокиноподобная активность стафилококков с наличием у них генетических детерминант, ответственных за продукции стафилококкового белка А.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение цитокиноподобной активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам

белка А стафилококков, с помощью тест-систем для мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа цитокинов человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Продукция ЦПВ была изучена у 5 штаммов *S. aureus*, в том числе эталонного штамма из АТСС № 6538–209Р, имеющего генетический маркер стафилококкового белка А (*spa*), 2 клинических изолятов, у которых ген *spa* не выявлялся – *S. aureus* Г886 и *S. aureus* К33, а также 2 клинических штаммов, несущих генетический маркер белка А – *S. aureus* К39 и *S. aureus* Г885.

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37°C, после чего культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 30 минут и препаративно отбирали фильтрат надосадочной жидкости (супернатант).

Наличие в супернатантах бактерий цитокиноподобных веществ (ЦПВ) определяли иммунофлюоресцентным методом на приборе MAGPIX-100 (США) с использованием тест-системы фирмы Multiplex (Luminex, США) для определения цитокинов (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-1Ra, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF α , MCP1, MIP1b, TNF- α). Во всех случаях контролем служил МПБ без бактерий.

Наличие гена, ответственного за продукцию стафилококкового протеина А (*spa*), определяли путем постановки ПЦР с использованием многоканального амплификатора и подобранных праймеров [5, 6].

Выделение ДНК осуществляли из бактериальных взвесей (10⁸ КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus*, сорбционным методом с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя.

Обнаружение гена *spa*, ассоциированного с патогенностью *S. aureus* проводили с помощью постановки мультиплексной ПЦР с использованием подобранных праймеров: олигонуклеотидная последовательность (5'→3'), AGCACCAAAAGAGGAAGACAA → GTTTAACGACCGT; размер продукта 200–400 п.н.

Для их подбора, а также оптимальных условий проведения анализа пользовались программой PrimerSelect из пакета программ Lasergene, в том числе – Megaline (Lasergene) (DNASTAR, Inc. США).

Амплификацию проводили с использованием стандартных наборов на многоканаль-

ном амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 1 цикл—94°С, 5 мин; 30 циклов: 94°С, 30 сек; 55°С, 30 сек; 72°С, 30 сек; последний цикл—2 мин при 72°С. Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в горизонтальном 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в ТАЕ буферной системе с использованием стандартных наборов фирмы «ИнтерЛабСервис». В качестве маркеров использовали маркер длин ДНК 100+ bp DNA Ladder (ЕвроГен). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определенной массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследования показали, что 3 штамма *S. aureus* (из 5 изученных) несли генетические детерминанты синтеза стафилококкового белка А, а 2 клинических изолята не имели гена *spa*. В то же время,

данные, суммированные в **Таблице 1**, свидетельствуют о том, что через 24 часа культивирования бактерий в МПБ при 37°С в супернатантах всех изученных штаммах *S. aureus* определялись различные цитокины. Более того концентрация определенных ЦПВ у изолятов, не несущих ген *spa*, была даже несколько выше чем у штаммов, имеющих генетические маркеры стафилококкового белка А.

Учитывая, что ранее были получены данные о том, что различными тест-системами как для мультиплексного, так и для иммуноферментного анализов разных фирм производителей у стафилококков определялись ЦПВ [7], возникает вопрос о необходимости выделения этих веществ в чистом виде и их характеристике. Кроме того полученные нами данные свидетельствуют о том, что указанная активность напрямую не связана с наличием у бактерий генетических детерминант, ответственных за секрецию стафилококками белка А, и, по-видимому, имеет другую природу.

Таблица 1. Цитокинопродукция суточных культур *S. aureus*, оппозитных по наличию генетического маркера стафилококкового белка А, иммунофлюоресцентным методом (пкг/мл)

Цитокины	<i>S. aureus</i> P209 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 886 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 33 (spa-)	<i>S. aureus</i> К 39 (spa+)	<i>S. aureus</i> Г 885 (spa+)
INF γ	518,0	349,0	741,0	523,0	165,5
TGF α	21,1	33,0	41,0	37,0	32,0
IL-1Ra	63,5	Не определяли	49,7	51,9	6,7
IL-1 β	48,0	22,5	29,0	24,0	20,0
IL-2	65,0	38,0	59,0	47,0	29,0
IL-4	46,0	34,0	39,0	34,0	32,0
IL-5	18,0	13,0	15,0	15,0	13,0
IL-6	53,0	33,0	37,0	32,0	26,0
IL-10	31,0	27,0	24,0	25,0	24,5
IL-12	248,0	77,5	112,0	78,0	38,0
IL-13	30,0	20,0	25,0	23,5	19,0
IL-17a	505,0	291,0	509,0	337,5	154,0
TNF- α	0,4	Не определяли	0,5	0,7	0,3
G-CSF	102,0	71,0	109,0	69,5	37,0
GM-CSF	207,5	58,0	82,0	56,5	38,0
MCP1	43,5	42,0	41,0	34	34,0
MIP1b	76,5	50,0	61,0	50	44,0

Примечание: (spa+) — есть ген белка А; (spa-) — ген белка А не выявлен.

ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по наличию генетических маркеров продукции стафилококкового белка А, определяются «сходные» с цитокинами человека ЦПВ в широком спектре и относительно высоких концентрациях. Немаловажным является факт штаммовой вариабельности цитокино-подобной активности бактерий: в изученной выборке изолятов *S. aureus* имелись штаммы бактерий как с относительно высоким уровнем продукции ЦПВ, так и с более низким уровнем секреции ЦПВ. Продукция (секреция) стафилококками ЦПВ не зависела от наличия или отсутствия у них генетических детерминант (*spa*), ответственных за продукцию белка А. Более того, штаммы, не несущие ген *spa*, секретировали в среду более высокие концентрации некоторых цитокинов по сравнению с оппозитными по данному генетическому маркеру штаммами, или секреция отдельных ЦПВ у них практически была идентичной.

В этой связи необходимо учитывать возможное получение ложно-положительных результатов в жидкостях и выделениях человека при определении уровней в них цитокинов в условиях инфицирования биоматериала *S. aureus*. Это, например, относится к определению цитокинов в слюне, назальном секрете, в секретах кишечника, урогенитального тракта, в гнойном содержимом, при сепсисе (при септицемии и определении уровней цитокинов в крови). Следует также учитывать и уровень ЦПВ стафилококков, вызвавших воспалительный процесс.

ВЫВОДЫ

1. В супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам белка А стафилококков (*spa*), определяются цитокиноподобные продукты их секреции в широком спектре и концентрациях.

2. Уровень секреции и спектр определяемых цитокиноподобных веществ не зависит от наличия у *S. aureus* генетических детерминант, ответственных за продукцию стафилококкового белка А.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации АААА-А18-118020690020-1, и теме из Плана НИР ИКВС УрО РАН, № гос. регистрации 116021510075.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Бактерии как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 3, 374–376. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Bacteria as producers of cytokine-like substances. Russian journal of immunology 2017, 11 (20), 3, 374–376.]
2. Зурочка А. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Дукардт В. В., Гриценко В. А. Цитокиновая и антицитокиновая активность стафилококков. Методические особенности. Российский иммунологический журнал 2017, 11 (20), 4, 707–709. [Zurochka A. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Dukardt V. V., Gritsenko V. A. Cytokine and anticytokine activity of staphylococci. Methodical features. Russian journal of immunology. 2017, 11 (20), 4, 707–709.]
3. Зурочка А. В., Дукардт В. В., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Зуева Е. Б., Тяпаева Я. В., Гриценко В. А. Стафилококки как продуценты цитокиноподобных веществ. Российский иммунологический журнал. 2017, 11 (20), 2, 134–136. [Zurochka A. V., Dukardt V. V., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Zuyeva E. B., Tyapayeva Y. V., Gritsenko V. A. Staphylococcus as producers of cytokine-like substances. Russian immunological magazine. 2017, 11 (20), 2, 134–136.]
4. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoeur H., Späth G. F., Meng G. Cross reactivity of *S. aureus* to murine cytokine assays: A source of discrepancy. Cytokine. 2016, 81, 101–108.
5. Гриценко В. А., Мавзютов А. Р., Пашкова Т. М., Карташова О. Л., Тяпаева Я. В., Белозерцева Ю. П. Генетический профиль *Staphylococcus aureus*, выделенных от бактерионосителей и больных с инфекционно-воспалительной патологией. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2018, 4, 56–62. [Gritsenko V. A., Mavzyutov A. R., Pashkova T. M., Kartashova O. L., Tyapayeva Ya. V., Belozertseva Yu. P. Genetics the *Staphylococcus aureus* profile, allocated from bacillicarriers and patients with infectious and inflammatory pathology. J. Microbiol., epidemiol. and immunobiol. 2018, 4, 56–62.]
6. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J., Potempa J. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 2003. 41(4): 1801–1804.
7. Фомина Л. О., Файзуллина А. И., Зурочка В. А., Добрынина М. А., Симбирцев А. С., Гриценко В. А. Сравнительная оценка цитокиноподобной активности *Staphylococcus aureus* мультиплексным и иммуноферментным анализом. Российский иммунологический журнал. 2018, 12 (21), 3, 460–465. [Fomina L. O., Fayzullina A. I., Zurochka V. A., Dobrynina M. A., Simbircev A. S., Gritsenko V. A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. Russian immunological magazine. 2018, 12 (21), 3, 460–465.]

ESTIMATION OF CYTOKIN-LIKE ACTIVITY OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* DEPENDING ON THE AVAILABILITY OF GENETIC DETERMINANT OF STYPHYLOCOCCAL PROTEIN A

© 2019 A. V. Zurochka^{1,2*}, V. A. Zurochka^{1,2}, L. O. Fomina¹,
A. I. Fayzullina¹, M. A. Dobrynina¹, V. A. Gritsenko³

*E-mail: av_zurochka@mail.ru

¹Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

²South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

³Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

Received: 17.05.2019. Accepted: 27.06.2019

In this work, the production of cytokine-like substances was studied in 5 strains of *Staphylococcus aureus*, with and without genetic determinants of staphylococcal protein A (*spa* gene). The *spa* gene in *S. aureus* was determined by the polymerase chain reaction (PCR) method. The cytokine-like activity of the supernatants of *S. aureus* daily broth cultures was determined using Multiplex (Luminex, United States) immunofluorescence test systems (G-CSF, GM-CSF, INF- γ , IL-1Ra, IL-1 β , IL-2, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17a, TGF α , MCP1, MIP1b, TNF- α) on a MAGPIX-100 instrument (USA). It was established that, regardless of the presence or absence of genetic markers of staphylococcal protein A, in the supernatants of the studied strains of *S. aureus*, cytokine-like substances were detected. Thus, the cytokine-like activity of *S. aureus* does not depend on the presence in bacteria of the *spa* gene, which is responsible for the production of staphylococcal protein A.

Key words: *S. aureus*, cytokines, cytokine-like substances, *spa* gene

Authors:

Zurochka A. V., ✉ MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; leader scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia.

Yekaterinburg, Institute of immunology and physiology, Ural branch of the Russian Academy of Sciences. Phone: +79193077598, E-mail: av_zurochka@mail.ru;

Zurochka V. A., MD, professor of the Department of food and biotechnology, senior researcher of the laboratory of molecular immunology of the South Ural state University (national research University), Chelyabinsk, Russia; senior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Fomina L. O., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Fayzullina A. I., post-graduate student of the Institute of immunology and physiology of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Dobrynina M. A., Junior scientific researcher of the laboratory of immunology of inflammation of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russia;

Gritsenko V. A., MD, Professor, Chief Researcher of Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia.