

## ДЕТЕКЦИЯ ЦИТОКИНОПОДОБНЫХ ВЕЩЕСТВ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИТОКИНОВ МЫШЕЙ У *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ОППОЗИТНЫХ ПО ГЕНУ *SPA*

© 2019 г. А. В. Зурочка<sup>1,2\*</sup>, В. А. Зурочка<sup>1,2</sup>, Л. О. Фомина<sup>1</sup>,  
А. И. Файзуллина<sup>1</sup>, М. А. Добрынина<sup>1</sup>, В. А. Гриценко<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

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

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

<sup>3</sup>ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия

Поступила: 18.05.2019. Принята: 29.06.2019

В работе изучена цитокиноподобная активность у 6 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). Продукция цитокино-подобных веществ в супернатантах суточных бульонных культур *S. aureus* определяли при помощи 8-плексной иммунофлуоресцентной тест-системы для определения цитокинов мышей компании БИО-РАД (США) (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ) на приборе MAGPIX-100 (США). Установлено, что не зависимо от наличия или отсутствия генетических маркеров стафилококкового белка А в супернатантах изученных штаммов *S. aureus* выявлялись цитокино-подобные вещества. Таким образом, цитокиноподобная активность *S. aureus*, выявляемая с помощью мультиплексной тест-системы для определения цитокинов мышей, не зависит от наличия у бактерий гена *spa*, ответственного за продукцию стафилококкового белка А.

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

DOI: 10.31857/S102872210007248-7

**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» (национальный исследовательский 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

Исследованиями, проведенными нами ранее, показано, что в супернатантах суточных культур бактерий разных видов с помощью тест-систем для мультиплексного анализа цитокинов человека (компании-производители: BioRAD и Multiplex) выявляются цитокино-подобные вещества (ЦПВ), аналогичные цитоки-

нам человека, в широком спектре и различных концентрациях [1, 2]. Среди изученных видов/родов микроорганизмов (стафилококки, энтерококки, эшерихии и др.) наиболее активными продуцентами ЦПВ являлись бактерии вида *Staphylococcus aureus*, причем часть штаммов (как музейных, так и клинических) 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.

Нельзя исключить, что подобная активность может быть связана с продукцией в среду бактериями веществ, неспецифически взаимодействующих с антителами против цитокинов человека. Так, известно, что многие штаммы *S. aureus* способны секретировать в питательную среду белок А, обладающий способностью через Fc-фрагменты иммуноглобулинов связываться с IgG человека и животных. В этой связи логично предположить, что такая выраженная цитокиноподобная активность *S. aureus* могла быть связана с его продукцией. Однако стафилококковый белок А секретруется не всеми штаммами *S. aureus*, и его нет у коагулазоотрицательных стафилококков, для которых также была показана цитокиноподобная активность [3].

С другой стороны, в исследованиях зарубежных авторов было установлено, что в среде культивирования у отдельных клинических изолятов *S. aureus* обнаруживались какие-то продукты, которые при постановке ИФА давали перекрестную реакцию с антителами для мышинных цитокинов IL-1 $\beta$  и TNF- $\alpha$  [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. Авторами так же предполагается, что такая кросс-реакция может быть связана с продукцией белка А стафилококков.

Указанные обстоятельства определяют повышенный интерес к вопросу, насколько связана цитокиноподобная активность *S. aureus* при взаимодействии их супернатантов с антицитокиновыми антителами в тест-системах для определения цитокинов мышей с наличием у них генетических детерминант (ген *spa*), ответственных за продукцию стафилококкового белка А. Важно

также совпадает ли такая активность с уже известными данными по определению ЦПВ у стафилококков при использовании тест-систем для определения цитокинов человека.

**Целью** настоящего исследования явилось сравнительное изучение цитокиноподобной активности у клинических и музейных штаммов *S. aureus*, оппозитных по генетическим маркерам стафилококкового белка А, с помощью тест-систем для мультиплексного иммунофлюоресцентного анализа цитокинов мыши.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Продукция ЦПВ была изучена у 6 штаммов *S. aureus*, в том числе 2 эталонных штамма из АТСС № 6538–209Р и АТСС № 25923 (ТМ2), имеющих генетические маркеры стафилококкового белка А (*spa*), 2 клинических изолята, у которых ген *spa* не выявлялся – *S. aureus* Г886 и *S. aureus* К33, а также 2 клинических штамма, несущих генетический маркер белка А – *S. aureus* К39 и *S. aureus* Г885.

Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 24 ч при 37°С, 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 8-плексной тест-системы фирмы БИО-РАД (США) для определения цитокинов мышей (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ). 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 (10<sup>8</sup> КОЕ/мл), приготовленных из суточных агаровых культур *S. aureus*, сорбционным методом с использованием набора реактивов «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендации производителя.

Обнаружение ген *spa*, ассоциированного с патогенностью *S. aureus* проводили с помощью постановки мультиплексной ПЦР с использованием подобранных праймеров: олигонуклеотидная последовательность (5'→3'), AGCACAAAAGA

GGAAGACAA → GTTTAACGACATGTACTCC  
GT 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).

Аmplификацию проводили с использованием стандартных наборов на многоканальном амплификаторе «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия) по следующему протоколу: 1 цикл – 94°C, 5 мин; 30 циклов: 94°C, 30 сек; 55°C, 30 сек; 72°C, 30 сек; последний цикл – 2 мин при 72°C. 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 4 штамма *S. aureus* (из 6 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°C в суперна-

тантах всех изученных штаммах *S. aureus* определялись различные цитокины при использовании тест-системы, предназначенной для определения цитокинов мыши. Более того концентрация определенных ЦПВ у изолятов, не несущих ген *spa*, была или идентична, или несколько выше чем у штаммов, имеющих генетические маркеры белка А. При этом надо отметить тот факт, что активность цитокиноподобной продукции всех изученных стафилококков была идентична и сравнима с использованием тест-систем для определения цитокинов человека. Важно так же отметить тот факт, что у стафилококков при использовании мультиплексной тест-системы для определения цитокинов мышей ЦПВ выявлялись не только IL-1β и TNF-α, а практически все изученные цитокины, что с одной стороны подтверждает данные других авторов [4], а с другой стороны возникает сразу несколько вопросов. Во-первых, ЦПВ определяемые в зависимости от антител к цитокинам сильно отличаются, так у всех штаммов INF-γ, IL-1β, IL-4, IL-10, TNF-α выявлялся в очень высоких концентрациях, на порядок превышающих уровень ЦПВ при определении GM-CSF, IL-2, IL-5. Во-вторых, этот процесс не зависел от наличия или отсутствия гена *spa*.

Все это выявляет один интересный факт о том, что детекция продукции ЦПВ стафилококков зависит в большей степени от типа моноклональных антител (к какому цитокину они получены), чем от типа тест-систем, применяемых для анализа (иммуоферментных, иммуофлюоресцентных, для определения цитокинов человека или мышей).

**Таблица 1.** Оценка продукции цитокино-подобных веществ штаммами *S. aureus*, оппозиционными по наличию гена *spa*, иммуофлюоресцентным методом по определению цитокинов мышей (пкг/мл)

Цитокины	<i>S. aureus</i> 209P (spa+)	<i>S. aureus</i> TM2 (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+)
INFγ	590,0	612,0	485,0	722,0	685,0	301,0
IL-1β	503,0	528,0	398,0	756,0	623,0	327,0
IL-2	10,0	9,5	8,0	10,0	10,0	8,0
IL-4	607,0	648,5	567,5	698,0	702,0	482,0
IL-5	24,0	25,5	13,0	27,0	27,0	10,0
IL-10	301,0	332,0	233,0	418,0	424,0	179,5
TNF-α	354,0	382,0	215,0	440,0	434,0	185,5
GM-CSF	12,0	13,0	10,5	13,0	13,0	9,0

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

Учитывая, что ранее были получены данные о том, что различными тест-системами, как для мультиплексного, так и для иммуноферментного анализов разных фирм производителей для определения цитокинов человека у стафилококков определялись ЦПВ [7], и выявление аналогичного эффекта при использовании тест-системы для определения цитокинов мышей, 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.

### 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 мышей ЦПВ в широком спектре и относительно высоких концентрациях. Немаловажным является факт штаммовой вариабельности цитокиноподобной активности бактерий: в изученной выборке изолятов *S. aureus* имелись штаммы бактерий как с относительно высоким уровнем продукции ЦПВ, так и с более низким и не зависела от наличия или отсутствия у них генетических детерминант (*spa*), ответственных за продукцию белка А, а в большей степени зависела от антител к тому или иному виду цитокина. 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 и животных 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*), выявляются цитокиноподобные продукты их секреции в широком спектре и концентрациях при использовании тест-систем для определения цитокинов мышей.

2. Уровень секреции и спектр определяемых цитокиноподобных веществ, тестируемых мультиплексным анализом цитокинов мышей, 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-likesubstances. 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-likesubstances. Russian immunological magazine. 2017, 11 (20), 2, 134–136.]
4. Javed N., Xue G., Lu A., Xing Y., Iwakura Y., Xiao H., Lecoer 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., Symbircev A. S., Gritsenko V. A. Comparative evaluation cytokine-like activity of *Staphylococcus aureus* by methods multiplex and ELISA. Russian journal of immunology. 2018, 12 (21), 3, 460–465.]

## DETECTION OF CYTOKINE-LIKE SUBSTANCES WITH THE HELP OF A TEST SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF CYTOKINES IN A MOUSE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, OPPOSITE FOR *SPA* GENE

© 2019 A. V. Zurochka<sup>1,2\*</sup>, V. A. Zurochka<sup>1,2</sup>, L. O. Fomina<sup>1</sup>,  
A. I. Fayzullina<sup>1</sup>, M. A. Dobrynina<sup>1</sup>, V. A. Gritsenko<sup>3</sup>

\*E-mail: av\_zurochka@mail.ru

<sup>1</sup>Institute of Immunology and Physiology UrB RAS, Ekaterinburg, Russia;

<sup>2</sup>South-Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russia;

<sup>3</sup>Orenburg Federal Research Center UrB RAS, Orenburg, Russia

**Received:** 18.05.2019. **Accepted:** 29.06.2019

In the work, cytokine-like activity was studied in 6 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 production of cytokine-like substances in the supernatants of *S. aureus* daily broth cultures was determined using an 8-plex immunofluorescence test system for the determination of mouse cytokines from BIO-RAD (USA) (GM-CSF, INF- $\gamma$ , IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ ) on the device MAGPIX-100 (USA). It was established that, regardless of the presence or absence of genetic markers of staphylococcal protein A, cytokine-like substances were detected in the supernatants of the studied strains of *S. aureus*. Thus, the cytokine-like activity of *S. aureus*, detected using a multiplex mouse test cytokine test system, does not depend on the presence of the *spa* gene in bacteria, which is responsible for the production of staphylococcal protein A.

*Key words:* *S. aureus*, mouse 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.