

Научная статья/Research Article

УДК 579.62

DOI: 10.36718/1819-4036-2023-3-140-146

Ольга Львовна Карташова¹, Ольга Александровна Пашина^{2✉}, Мария Викторовна Сычева³, Елена Евгеньевна Кочкина⁴, Татьяна Михайловна Пашкова⁵, Вероника Викторовна Дымова⁶

^{1,3,4,5,6}Оренбургский государственный аграрный университет, Оренбург, Россия

^{1,2,3,5}Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

¹labpersist@mail.ru

²olga25mikro@mail.ru

³sycheva_maria@mail.ru

⁴eekochkina@gmail.com

⁵pashkova070782@mail.ru

⁶nika.kuranova@yandex.ru

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА *E. COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ КОШЕК С ЗАБОЛЕВАНИЯМИ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Цель исследования – фенотипическая и генетическая оценка патогенного потенциала штаммов *E. coli*, изолированных от кошек с заболеваниями мочевыделительной системы. Исследуемый материал – 12 штаммов *E. coli*, выделенных из мочи кошек с заболеваниями мочевыделительной системы общепринятыми методами и идентифицированных методом масс-спектрометрии. Патогенные и персистентные свойства бактерий определяли фотометрическим методом. Резистентность к фторхинолонам устанавливали диско-диффузионным методом. Гены, детерминирующие синтез адгезинов, факторы колонизации и персистенции, а также резистентности к антибиотикам обнаруживали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием подобранных праймеров. *E. coli* характеризовались выраженным патогенным потенциалом. Определены особенности биофильей культур по экспрессии изученных биологических свойств: гемолитическая активность у бактерий, выделенных в ассоциациях, была достоверно выше, чем у штаммов, изолированных в монокультуре и, напротив, у монокультур были достоверно выше значения способности *E. coli* к биопленкообразованию и адгезии. К препаратам из группы фторхинолонов *E. coli* проявляли чувствительность, умеренную резистентность и резистентность. С помощью ПЦР установлено наличие у всех изолятов генетических детерминант вирулентности (*rpaA*, *fimH*, *fyuA*, *kspMTII*, *hlyA*) и резистентности (*gyrA*, *parC*, *gmrB*, *gmrS*), а также у подавляющего большинства – генов *usp* и *gtnA*. Полученные данные о патогенном биофилье *E. coli*, выделенных при патологии мочевыделительной системы у кошек, могут использоваться в качестве критерия для поиска и идентификации возбудителя. Установленная резистентность к фторхинолонам у изолятов *E. coli* свидетельствует о необходимости контроля за их применением. Для успешной терапии крайне необходимо проведение регионального мониторинга резистентности бактерий к антибактериальным препаратам.

Ключевые слова: *E. coli*, заболевания мочевыделительной системы, кошки, биофилье возбудителей, гены, детерминирующие факторы вирулентности и резистентности к фторхинолонам

Для цитирования: Характеристика патогенного потенциала *E. coli*, выделенных от кошек с заболеваниями мочевыделительной системы / О.Л. Карташова [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2023. № 3. С. 140–146. DOI: 10.36718/1819-4036-2023-3-140-146.

Благодарности: работа выполнена в рамках государственного задания Минсельхоза России на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А19-119101890005-1).

Olga Lvovna Kartashova¹, Olga Alexandrovna Pashinina^{2✉}, Maria Viktorovna Sycheva³,
Elena Evgenievna Kochkina⁴, Tatyana Mikhailovna Pashkova⁵, Veronika Viktorovna Dymova⁶

^{1,3,4,5,6}Orenburg State Agrarian University, Orenburg, Russia

^{1,2,3,5}Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Orenburg, Russia

¹labpersist@mail.ru

²olga25mikro@mail.ru

³sycheva_maria@mail.ru

⁴eekochkina@gmail.com

⁵pashkova070782@mail.ru

⁶nika.kuranova@yandex.ru

CHARACTERISTICS OF THE PATHOGENIC POTENTIAL OF *E. COLI* ISOLATED FROM CATS WITH URINARY SYSTEM DISEASES

The purpose of the study is to evaluate the phenotypic and genetic potential of E. coli strains isolated from cats with diseases of the urinary system. The test material was 12 strains of E. coli isolated from the urine of cats with diseases of the urinary system by conventional methods and identified by mass spectrometry. The pathogenic and persistent properties of bacteria were determined by the photometric method. Resistance to fluoroquinolones was determined by the disk diffusion method. Genes that determine the synthesis of adhesins, colonization and persistence factors, and antibiotic resistance were detected using polymerase chain reaction (PCR) using selected primers. E. coli were characterized by a pronounced pathogenic potential. The features of culture bioprofiles were determined by the expression of the studied biological properties: the hemolytic activity in bacteria isolated in associations was significantly higher than in strains isolated in a monoculture and, on the contrary, in monocultures, the values of the ability of E. coli to biofilm formation and adhesion were significantly higher. E. coli showed sensitivity, moderate resistance and resistance to drugs from the group of fluoroquinolones. PCR revealed the presence of genetic determinants of virulence (papA, fimH, fyuA, kspMTII, hlyA) and resistance (gyrA, parC, gnrB, gnrS) in all isolates, as well as the usp and grnA genes in the vast majority. The obtained data on the pathogenic bioprofile of E. coli isolated in the pathology of the urinary system in cats can be used as a criterion for the search and identification of the pathogen. The established resistance to fluoroquinolones in E. coli isolates indicates the need to control their use. Regional monitoring of bacterial resistance to antibacterial drugs is essential for successful therapy.

Keywords: *E. coli*, diseases of the urinary system, cats, bioprofile of pathogens, genes, determining factors of virulence and resistance to fluoroquinolones

For citation: Characteristics of the pathogenic potential of *E. coli* isolated from cats with urinary system diseases / O.L. Kartashova [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2023;(3): 140–146. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2023-3-140-146.

Acknowledgments: the work has been carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Agriculture of Russia for applied scientific research (state registration number NIR AAAA-A19-119101890005-1).

Введение. Патологии почек и мочевыводящих путей играют одну из ведущих ролей в нозологии незаразных заболеваний мелких домашних животных и представляют важную проблему для ветеринарной медицины. В видовом спектре микроорганизмов, выделенных из мочи кошек при циститах и мочекаменной болезни, наряду с бактериями рода *Staphylococcus* выявлено доминирование *E. coli* [1]. Известно, что

кишечная палочка может способствовать развитию инфекционно-воспалительных осложнений, а также рецидиву заболевания, это обусловлено спектром биологических свойств микроорганизмов, инициирующих воспалительный процесс [2]. Однако информации, касающейся био-профиля *E.coli*, выделенных от кошек с заболеваниями мочевыводящей системы, не достаточно.

Цель исследования – фенотипическая и генетическая оценка патогенного потенциала штаммов *E. coli*, изолированных от кошек с заболеваниями мочевыделительной системы.

Условия, материалы и методы. В работе были изучены 12 штаммов *E. coli*, выделенных из мочи 54 кошек с патологией мочевыделительной системы (мочекаменная болезнь и цистит) и находящихся на лечении в ветеринарных клиниках г. Оренбурга. Пробы мочи получали от больных животных методом катетеризации и доставляли на исследование в течение 1–2 ч. Выделение бактерий проводили стандартными методами. Видовую идентификацию осуществляли с помощью масс-спектрометра MALDI TOF MS серии Microflex LT (BrukerDaltonics, Германия) и программного обеспечения MaldiBioType 3.0. Антилизозимную активность (АПА), био-

пленкообразование (БПО), гемолитическую активность (ГА) и показатель адгезии микробных клеток (ПА) определяли стандартными фотометрическими методами. Резистентность к фторхинолонам (энрофлоксацину, ципрофлоксацину, норфлоксацину, офлоксацину, левофлоксацину) определяли диско-диффузионным методом [3]. Бактериальную дезоксирибонуклеиновую кислоту экстрагировали с помощью реактивов «ДНК-экспресс» («Литех», Россия). Циклический синтез фрагментов ДНК осуществляли с использованием амплификатора «Терцик МС-2» («ДНК-технология», Россия). Для определения наличия генов вирулентности и резистентности использовали специфические олигонуклеотидные праймеры, описанные в научных публикациях [4–6] и синтезированные фирмой «Синтол» (Россия) (табл.).

Праймеры, использованные при мультиплексной ПЦР, и размеры ампликонов

Ген	Функция	Праймеры	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.
1	2	3	4	5
Адгезины				
1	Р-пили, ассоциированные с пиелонефритом	<i>pap A For</i>	ATGGCAGGTGGTGTTTTGGTG	720
		<i>pap A Rev</i>	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC	
2	Фимбрии 1-го типа, покрытые белком адгезином	<i>fimH F</i>	TCGAGAACGGATAAGCCGTGG	508
		<i>fimH R</i>	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	
3	Афимбриальный фактор адгезии	<i>afa For</i>	GCTGGGCAGCAAACTGATAACTCTC	750
		<i>afa Rev</i>	CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG	
Система захвата и транспорта железа				
4	Ген, отвечающий за синтез сидерофора йерсинеабактина	<i>fyuA For</i>	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	880
		<i>fyuA Rev</i>	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
Белки синтеза полисахаридов капсулы				
5	Белок II группы, синтезирующий полисахарид капсулы	<i>kpsMTII For</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	270
		<i>kpsMTII Rev</i>	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	
Нуклеазы				
6	Уропатогенный специфический белок	<i>usp For</i>	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	440
		<i>usp Rev</i>	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	
Токсин				
7	Гемолизин	<i>hlyA F</i>	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	1 177
		<i>hlyA R</i>	ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA	
Гены резистентности к фторхинолонам (энрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин)				
8	Ген, кодирующий ДНК-гиразу	<i>gyrA-P1</i> <i>gyrA-P3</i>	TGT CCG AGA TGG CCT GAA GC TGC CGT CAT AGT TAT CAA CGA	374
9	Ген, кодирующий топоизомеразу IV	<i>parC-3</i> <i>parC-4</i>	CCG TGC GTT GCC GTT TAT TG AAGTGCCGTCGAAGTTTGGCA	368

1	2	3	4	5
10	Плазмид-опосредованные гены устойчивости к хинолонам	<i>qnrA-1</i>	ATTTCTCACGCCAGGATTTG	516
		<i>qnrA-2</i>	GATCGGCAAAGGTTAGGTCA	
11		<i>qnrB-1</i>	GATCGTGAAAGCCAGAAAGG	469
	<i>qnrB-2</i>	ACGATGCCTGGTAGTTGTCC		
12		<i>qnrS-1</i>	ACGACATTCGTCAACTGCAA	417
		<i>qnrS-2</i>	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	

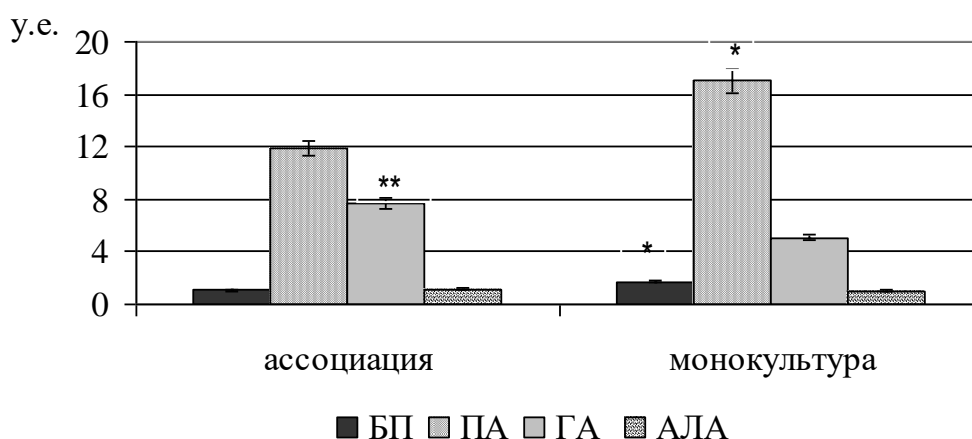
Статистический анализ результатов осуществлен с применением программ MS Excel 2007.

Результаты и обсуждение. При бактериологическом исследовании мочи *E. coli* были выделены в 22,2 % случаев, в 33,3 % микроорганизмы были в виде монокультуры, в 66,7 % – в ассоциациях с другими микроорганизмами (*S. aureus*, *S. intermedius*, *E. faecalis*, *K. pneumonia*). У выделенных *E. coli* определен комплекс биологических свойств (биофиль), включающий их вирулентные и персистентные характеристики, а также антибиотикорезистентность. Частота обнаружения ГА, БПО и АПА составляла 100 %, способностью к адгезии характеризовались 66,7 % *E. coli*. Среднее значение ГА у исследованных штаммов *E. coli* было равно $6,8 \pm 0,85$ %, выраженность АПА составила $1,1 \pm 0,05$ мкг/мл, а способность образовывать биопленки – $1,43 \pm 0,42$ у. е.

Далее была определена чувствительность *E. coli* к фторхинолонам, которые являются оптимальными препаратами для эмпирической терапии неосложненных инфекций как верхних, так и нижних мочевых путей. Выявлено, что по отношению к ципрофлоксацину половина изу-

ченных штаммов проявляла чувствительность, а вторая половина – умеренную резистентность; к энрофлоксацину чувствительных штаммов не было, при этом 16,7 % культур характеризовались резистентностью и 83,3 % – умеренной резистентностью. К норфлоксацину все исследованные *E. coli* проявляли чувствительность, к офлоксацину и левофлоксацину по 16,7 % культур были умеренно резистентными, остальные чувствительными.

Сравнительный анализ распространенности изученных свойств у *E. coli*, выделенных в монокультуре и ассоциациях, выявил их отличие по способности к биопленкообразованию (50 % штаммов, выделенных в ассоциациях и 100 % изолятов в монокультуре) и адгезии (75 и 50 % соответственно). Установлено, что ГА изолятов *E. coli* в ассоциациях составила $7,7 \pm 0,09$ %, тогда как у монокультур – $5,1 \pm 0,36$ % ($p < 0,01$), и, напротив, значения БПО и ПА были выше у монокультур ($1,7 \pm 0,07$ и $1,1 \pm 0,13$ у. е., $p < 0,05$; $17,0 \pm 0,03$ и $11,9 \pm 0,89$ %, $p < 0,05$). По уровню АПА выделенные штаммы не отличались (рис.).



Биофильмы *E. coli*, выделенных в монокультуре и ассоциациях при цистите и МКБ: БП – биопленкообразование, у. е.; АПА – антиколлагенная активность, мкг/(мл·ОП); ГА – гемолитическая активность, %; ПА – показатель адгезии, %; (*) – $p \leq 0,05$; (**) – $p \leq 0,01$

Затем был охарактеризован вирулентный потенциал штаммов *E. coli* на уровне генотипа. Установлено, что у всех выделенных культур регистрировались следующие гены, ответственные за адгезию: *fim H* и *pap A* и отсутствовали гены *afa B* и *afa C*. Это связано с тем, что у грамотрицательных микроорганизмов функцию распознавания и прикрепления осуществляют пили, или фимбрии, а у грамположительных бактерий в адгезии участвуют афимбриальные структуры. Встречаемость данного фактора среди уропатогенных штаммов достаточно сильно варьирует, так, в исследованиях [7] у 45 изолятов эшерихий, выделенных от собак и кошек с инфекциями мочевыводящих путей, не обнаружен ген *afa*, что согласуется с полученными нами данными. Установлено наличие у всех изолированных нами *E. coli* гена *kps M*, детерминирующего синтез капсульного полисахарида, защищающего от иммунной системы хозяина, а также гена *hly A*, относящегося к поробразующим токсинам, лизирующим эритроциты и ядросодержащие клетки. Ген *usp*, кодирующий уропатогенный специфичный протеин, выявлен нами у 83,3 % *E. coli*. Известно, что выработка сидерофоров, определяющих способность бактериальных клеток к захвату железа, повышает жизнеспособность микроорганизмов внутри уретрального тракта и активируется во время инфекции. Показано, что экспрессия сидерофоров повышена в уропатогенах по сравнению с комменсальными штаммами *E. coli* [8], что демонстрируют проведенные нами исследования, установившие присутствие гена *fyu A* у всех выделенных изолятов. У всех изученных штаммов также выявлены гены *gyp A* и *pap C*, ответственные за формирование устойчивости к фторхинолонам, гены *qnr B* и *qnr S*, кодирующие белки, уменьшающие связывание хинолона с ДНК и последующее образование комплекса хинолон-гираза; при этом только 66,7 % культур характеризовались наличием гена *qnr A*.

Проведенный анализ био профиля *E. coli*, выделенных от кошек с заболеваниями мочевыводительной системы, показал, что данные микроорганизмы, как в монокультуре, так и ассоциациях, характеризуются выраженным патогенным потенциалом, который определяется наличием у них комплекса вирулентных и пер-

систентных свойств, включая ГА, АПА, БПО, адгезию, антибиотикорезистентность. Таким образом, вирулентный био профиль *E. coli* можно применять как критерий скрининга у больных животных возможных возбудителей заболеваний для последующей селективной элиминации. С другой стороны, настораживает факт значительного распространения генов резистентности к антибиотикам из группы фторхинолонов, которые являются препаратами выбора. Полученные результаты свидетельствуют о том, что фторхинолоны должны использоваться для терапии заболеваний мочевыводительной системы только после определения чувствительности *E. coli* к антибиотикам данной группы.

Заключение

1. Штаммы, выделенные из мочи кошек с заболеваниями мочевыводительной системы, характеризуются определенным био профилем и выраженным патогенным потенциалом.

2. Молекулярно-генетическим методом у уроизолятов с высокой частотой определено наличие генов, кодирующих адгезины, факторы колонизации и персистенции, а также резистентность к фторхинолонам.

Список источников

1. Видовой состав и резистентность к антибиотикам микроорганизмов, выделенных при патологии мочевыводительной системы у плотоядных / Н.В. Морозова [и др.] // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова. 2020. № 1 (58). С. 66–72.
2. Характеристика патогенного потенциала *Escherichia coli*, выделенных у пациентов с калькулезным пиелонефритом / Т.М. Паукова [и др.] // Урология. 2021. № 4. С. 19–24.
3. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. М.: Минздрав России, 2005. 62 с.
4. Johnson J.R., Stella A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny

- and host compromise // *J. Infect. Dis.* 2000. Vol. 181. P. 261–272.
5. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction / S. Yamamoto [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995. Vol.12. P. 85–90.
 6. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains / W. Adamus-Biatek [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* 2018. Vol. 45 (5). P. 1055–1065.
 7. Babacan O., Izgür M. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from urogenital system infections in dogs and cats // *Vet. Hekim. Der. Derg.* 2021. Vol. 92(2). P. 132–142.
 8. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options / A.L. Flores-Mireles [et al.] // *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 13(5). P. 269–284.

References

1. Vidovoj sostav i rezistentnost' k antibiotikam mikroorganizmov, vydelennyh pri patologii mochevydelitel'noj sistemy u plotoyadnyh / N.V. Morozova [i dr.] // *Vestnik Buryatskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii im. V.R. Filippova.* 2020. № 1 (58). S. 66–72.
2. Harakteristika patogenogo potenciala *Escherichia coli*, vydelennyh u pacientov s kal'kuleznym pielonefritom / T.M. Pashkova [i dr.] // *Urologiya.* 2021. № 4. S. 19–24.
3. MUK 4.2.1890-04. Opredelenie chuvstvitel'nosti mikroorganizmov k antibakterial'nym preparatam. M.: Minzdrav Rossii, 2005. 62 s.
4. Johnson J.R., Stella A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise // *J. Infect. Dis.* 2000. Vol. 181. P. 261–272.
5. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction / S. Yamamoto [et al.] // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1995. Vol.12. P. 85–90.
6. The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains / W. Adamus-Biatek [et al.] // *Mol. Biol. Rep.* 2018. Vol. 45 (5). P. 1055–1065.
7. Babacan O., Izgür M. Detection of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from urogenital system infections in dogs and cats // *Vet. Hekim. Der. Derg.* 2021. Vol. 92(2). P. 132–142.
8. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options / A.L. Flores-Mireles [et al.] // *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 13(5). P. 269–284.

Статья принята к публикации 13.03.2023 / The article accepted for publication 13.03.2023.

Информация об авторах:

Ольга Львовна Карташова¹, профессор кафедры микробиологии и заразных болезней; ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов; доктор биологических наук, доцент

Ольга Александровна Пашинина², старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов, кандидат биологических наук

Мария Викторовна Сычева³, заведующая кафедрой микробиологии и заразных болезней, профессор; старший научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов; доктор биологических наук, доцент

Елена Евгеньевна Кочкина⁴, старший преподаватель кафедры микробиологии и заразных болезней, кандидат биологических наук

Татьяна Михайловна Пашкова⁵, профессор кафедры микробиологии и заразных болезней; ведущий научный сотрудник лаборатории персистенции и симбиоза микроорганизмов; доктор биологических наук

Вероника Викторовна Дымова⁶, доцент кафедры микробиологии и заразных болезней, кандидат биологических наук

Information about the authors:

Olga Lvovna Kartashova¹, Professor at the Department of Microbiology and Infectious Diseases; Leading Researcher, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms; Doctor of Biological Sciences, Associate Professor

Olga Alexandrovna Pashinina², Senior Researcher, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms, Candidate of Biological Sciences

Maria Viktorovna Sycheva³, Head of the Department of Microbiology and Infectious Diseases, Professor; Senior Researcher, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms; Doctor of Biological Sciences, Associate Professor

Elena Evgenievna Kochkina⁴, Senior Lecturer, Department of Microbiology and Infectious Diseases, Candidate of Biological Sciences

Tatyana Mikhailovna Pashkova⁵, Professor at the Department of Microbiology and Infectious Diseases; Leading Researcher, Laboratory of Persistence and Symbiosis of Microorganisms; Doctor of Biological Sciences

Veronika Viktorovna Dymova⁶, Associate Professor at the Department of Microbiology and Infectious Diseases, Candidate of Biological Sciences

