

АНТИКАРНОЗИНОВАЯ И АНТИГЕМОГЛОБИНОВАЯ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СОБАК С НАРУЖНЫМИ ОТИТАМИ

Т.М. Пашкова, кандидат биологических наук
ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
тел. 8(3532)77-44-63, pashkova070782@mail.ru
А.С. Акжигитов, аспирант
ФГБОУ ВПО Оренбургский ГАУ
тел. 8(908)321-57-52, abaj_akz@mail.ru
О.Л. Карташова, доктор биологических наук
тел. 8(3532)77-44-63, labpersist@mail.ru
Л.П. Попова, кандидат медицинских наук
ФГБУН Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
тел. 8(3532)77-44-63, ploomy@list.ru

Ключевые слова: *Malassezia*, бактерии, отиты, антикарнозиновая активность, антигемоглобиновая активность

Работа посвящена изучению видового состава и факторов персистенции микроорганизмов, выделенных при наружных отитах у собак. Установлено, что наиболее частыми ассоциантами грибов рода *Malassezia*, выделенных при разных формах течения отита, являлись *Staphylococcus spp.* Показано, что формирование микробных ассоциаций грибов со стафилококками характеризуется преимущественным повышением их антикарнозиновой и антигемоглобиновой активности. Полученные данные могут быть использованы для дифференциальной диагностики процесса и расшифровки патогенеза заболевания.

Введение. Наружные отиты являются одной из самых распространенных патологий у собак [1, 2, 3, 4] и их возбудителями могут быть бактерии, дрожжеподобные и плесневые грибы, а также грибково-бактериальные ассоциации [5]. Нередко заболевание переходит в хроническую форму, длительность заболевания достигает 3 и более лет [1]. Существенный вклад в длительное переживание микроорганизмов в организме хозяина вносят секретлируемые факторы персистенции. Известно, что микроорганизмы способны инактивировать механизмы естественной противоинойфекционной резистентности макроорганизма, такие как лактоферрин, катионный белок тромбоцитов, лизоцим, карнозин [6].

Однако у микроорганизмов, выделенных при наружных отитах у собак, изучена лишь антилизоцимная активность [7, 8]. Необходимым фактором сохранения жизнеспособности для большинства микроорганизмов является способность усвоения ионов железа из железосодержащих молекул макроорганизма, в частности, гемоглобина [9]. Вместе с тем, у микроорганизмов, выделенных при отитах у собак, не изучены

такие факторы персистенции как антикарнозиновая и антигемоглобиновая активности, что и явилось целью данного исследования.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследования послужили 24 изолята грибов рода *Malassezia* и 46 штаммов бактерий. Исследуемый материал получали методом смывов с помощью тампона из наружного слухового прохода собак [1], заседали на среду Лиминга-Нотманна и кровяной агар. Чашки со средой Лиминга-Нотманна инкубировали при t 37°C в течение 48 часов, чашки с кровяным агаром - при t 37°C в течение 18-24 часов.

Идентификацию грибов осуществляли по морфологическим и культуральным характеристикам [10], бактерии идентифицировали по морфологическим и культуральным свойствам, а также биохимическим характеристикам с использованием тест-систем «СТАФИ-тест», «ЭНТЕРО-тест», «НЕФЕРМ-тест» («Lachema», Чехия).

Антикарнозиновую активность (АКрА) микроорганизмов определяли фотометрическим методом [6], антигемоглобиновую активность (АнтиHbА) определяли по [11].

Статистическую обработку данных проводили биометрическими методами [12].

Результаты исследований и их обсуждение. Изучение микробиоценоза наружного слухового прохода у собак при отитах выявило ведущее значение микроорганизмов родов *Staphylococcus* (71,4%) и *Malassezia* (57%) при более низкой частоте выделения энтеробактерий, неферментирующих бактерий, стрептококков, энтерококков, коринебактерий. Доминирующее положение занимали штаммы *Staphylococcus hyicus* и *Malassezia pachydermatis*.

Микрофлора, выделенная при остром течении заболевания, была представлена преимущественно монокультурами (56,1%), тогда как при хроническом течении процесса в 80% случаев регистрировали ассоциации микроорганизмов («бактерии-бактерии», «бактерии-грибы»).

Показано, что при хроническом течении отита грибы рода *Malassezia* выделялись в 88,9% случаев, а при остром - в 50% случаев. Причем отмечено, что среди всех выделенных грибов 87,5% штаммов при разных формах течения заболевания были представлены видом *M. pachydermatis*. *M. obtusa* выделены в 12,5% случаев только при хроническом течении отита; *M. furfur* – только при остром течении заболевания (12,5% случаев).

Среди бактерий, выделенных при разных формах отита, наиболее частыми ассоциантами грибов рода *Malassezia* являлись *Staphylococcus spp.* (*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. intermedius*), также были выделены бактерии рода *Enterobacteriaceae spp.* (*P. vulgaris*, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*), *P. aeruginosa*, бактерии родов *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*

У всех выделенных грибов рода *Malassezia* была изучена распространенность и выраженность антикарнозиновой и антигемоглобиновой активности.

При остром течении отита 37,5% грибов рода *Malassezia* обладали антикарнозиновой активностью. Штамм *M. furfur*, выделенный в монокультуре, обладал АКрА, равной $0,8 \pm 0,05$ мг/мл, тогда как штамм *M. furfur*, выделенный в ассоциации с бактериями - $2,9 \pm 0,01$ мг/мл. АКрА у штаммов *M. pachydermatis*, выделенных в монокультуре, была равна $0,54 \pm 0,5$ мг/мл, в ассоциации с бактериями – $0,48 \pm 0,3$ мг/мл. При хроническом течении отита 12,5% грибов рода *Malassezia* обладали антикарнозиновой активностью. Штаммы *M. obtusa* и *M. pachydermatis*, выделенные в монокультуре, АКрА не обладали, тогда как среднее значение признака у штаммов *M. pachydermatis*, выделенных в ассоциации с бактериями, составляло $0,23 \pm 0,2$ мг/мл.

При остром течении отита 18,8% грибов рода *Malassezia* обладали антигемоглобиновой активностью. *M. furfur*, выделенные как в монокультуре, так и в ассоциации, и *M. pachydermatis*, выделенные в ассоциации с бактериями, данной активностью не обладали. АнтиНбА штаммов *M. pachydermatis*, выделенных в монокультуре, составляла $0,9 \pm 0,5$ г/л. При хроническом течении инфекционного процесса 50% грибов рода *Malassezia* характеризовались наличием антигемоглобиновой активности. Так, АнтиНбА штамма *M. obtusa*, выделенного в ассоциации с бактериями, была равна $6,9 \pm 3,9$ г/л. Штамм *M. pachydermatis*, выделенный в монокультуре, данной активностью не обладал, а у *M. pachydermatis*, выделенных в ассоциации, среднее значение АнтиНбА составляло $1,3 \pm 0,9$ г/л.

Далее была изучена распространенность и выраженность антикарнозиновой и антигемоглобиновой активности у *Staphylococcus spp.*, как наиболее часто выделяемых при наружных отитах бактерий.

59,1% стафилококков, выделенных при остром течении инфекционного процесса, характеризовались наличием АКрА. Среднее значение признака у стафилококков, выделенных в монокультуре, составляло $0,4 \pm 0,1$ мг/мл, в ассоциации с другими бактериями - $0,7 \pm 0,3$ мг/мл, в ассоциации с грибами рода *Malassezia spp.* - $1,1 \pm 0,4$ мг/мл. Способностью к инактивации карнозина обладали 62,5% стафилококков, выделенных при хроническом течении инфекционного процесса в ассоциации с *Malassezia spp.*, среднее значение признака составляло $1,6 \pm 0,4$ мг/мл.

При изучении АнтиНбА у штаммов стафилококков, выделенных при остром течении отита, наличие признака было выявлено у 81,9% штаммов. У стафилококков, выделенных в монокультуре, среднее значение признака составило $12,8 \pm 4$ г/л, в ассоциации с бактериями - $3,7 \pm 1,8$ г/л, в ассоциации с грибами - $18,9 \pm 4,6$ г/л. Все стафилококки, выделенные при хроническом течении отита, обладали АнтиНбА, среднее значение признака у штаммов, выделенных в ассоциации «бактерии-бактерии» было равно $28,1 \pm 1,2$ г/л, в ассоциации «бактерии-грибы» - $17 \pm 2,5$ г/л.

Заключение. В результате проведенных исследований показано, что при разных формах течения отита среди грибов рода *Malassezia* доминировал вид *M. pachydermatis*, а наиболее частыми ассоциантами грибов являлись *Staphylococcus spp.* (*S. hyicus*, *S. xylosus*). Грибы рода *Malassezia* в ассоциациях с бактериями при остром течении отита, характеризовались более высокими значениями АКрА по сравнению со штаммами, выделенными в монокультуре, напротив АнтиНбА об-

ладали штаммы грибов, выделенные в монокультуре. При хроническом течении отита грибы рода *Malassezia spp.* характеризовались наличием изученных персистентных свойств (АКрА и АнтиНбА) только в ассоциациях с бактериями.

У стафилококков, выделенных в ассоциации с грибами, при остром течении отита, значения изученных персистентных свойств были выше по сравнению с таковыми у штаммов, выделенных в монокультуре и в ассоциации с другими бактериями, а при хроническом течении процесса – по сравнению со штаммами, выделенными в ассоциации

«бактерии-бактерии». Таким образом, формирование микробных ассоциаций грибов со стафилококками характеризуется преимущественным повышением их факторов персистенции.

Полученные данные о том, что наличие ассоциаций микроорганизмов, выделенных при наружном отите у собак, отражает хронизацию процесса, могут быть использованы для дифференциальной диагностики заболевания. Расшифровке патогенеза наружного отита будут способствовать полученные результаты о повышении факторов персистенции у грибов и бактерий при межмикробных взаимодействиях.

Библиографический список:

1. Ершов, П.П. Этиологическая значимость дрожжевых грибов рода *Malassezia* при кожных заболеваниях животных: дис. ... канд. вет. наук. / П.П. Ершов - Москва, 2008. - 165 с.
2. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa / L.C. Oliveira, C.A. Leite, R.S. Brilhante, C.V. Carvalho // Can Vet J. - 2008. - № 49(8). - P. 785-788.
3. Lehner, G. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa / G. Lehner, C.S. Louis, R.S. Mueller // Vet Rec. - 2010. - № 167(1). - P. 23-26.
4. Linek, M. Otitis externa and media in the dog and cat / M. Linek // Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. - 2011. - № 39(6). - P. 451-463.
5. Грибы рода *Malassezia* в заболеваниях животных: клинические формы, диагностика, терапия / Р.С. Овчинников, М.Г. Маноян, А.Г. Гайнуллина, А.Н. Панин // Vetpharma. - 2013. - № 3. - С. 37-52.
6. Бухарин, О.В. Персистенция патогенных бактерий / О.В. Бухарин. - Изд-во: Медицина Екатеринбург: УрО РАН, 1999. - 366 с.
7. Видовой состав и биологические свойства микроорганизмов, выделенных от животных при гнойно-воспалительных заболеваниях [Электронный ресурс] / С.А. Пензурова, Л.С. Мулюкова, Н.С. Пашинин, Р.М. Нургалиева // Современные проблемы науки и образования. - 2012. - № 6; URL: www.science-education.ru/106-7891.
8. Акжигитов, А.С. Биологические свойства *Malassezia pachydermatis*, выделенных от собак / А.С. Акжигитов, О.А. Капустина, Н.С. Пашинин // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 64. - С. 53-55.
9. Neisseria meningitidis produces iron-regulated proteins to the RTX-family of exoproteins / S.A. Thomson, L.L. Wang, A. West // J. Bacteriol 1993. - №175. - P. 811-818.
10. Faergemann, J. Atopic Dermatitis and Fungi / J. Faergemann // Clinical Microbiology Reviews. - 2000. - Vol. 15. - № 4. - P. 545-563.
11. Пат. 2262705 Российская Федерация, МПК G01N33/72 Способ определения антигемоглобиновой активности микроорганизмов / О.В. Бухарин, Б.Я. Усвятцов, Е.А. Ханина; заявитель и патентообладатель Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; заяв. 27.05.2004; опубл. 20.10.2005.
12. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - Москва: Изд-во Высшая школа, 1990. - 352 с.

ANTICARNOSINE AND ANTIHAEMOGLOBIN ACTIVITIES OF MICROORGANISMS ALLOCATED FROM DOGS WITH EXTERNAL OTTIS

Pashkova T.M., Akzhigitov A.S., Kartashova O.L., Popova L.P.

Keywords: *Malassezia, bacteria, otitis, anticarnosine activity, antihaemoglobin activity*

Work is devoted to the study of specific structure and persistent factors of microorganisms allocated from dogs with external otitis. It is established that the most frequent associate of *Malassezia spp.* allocated at different forms of otitis is *Staphylococcus spp.* It is shown that formation of microbic associations of fungi and staphylococci is characterized by primary increase of their anticarnosine and antihaemoglobin activities. The obtained data can be used for differential diagnostics of otitis and interpretation of its pathogenesis.