

Е.В. Бухарова ¹, С.М. Попкова ¹, Е.Б. Ракова ^{1,2}, Ю.П. Джиоев ^{1,2}, Н.М. Шабанова ¹,
У.М. Немченко ¹, Е.И. Иванова ¹

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ ПРИ АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ АУТОШТАММОВ *KLEBSIELLA* SPP. И *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)

² Иркутский государственный медицинский университет (Иркутск)

В работе представлены результаты детекции генетических детерминант патогенности у 120 штаммов клебсиелл (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*), а также 48 штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из кишечного биотопа детей первого года жизни с дисбиозом кишечника. Регистрация исследованных детерминант в ДНК аутоштаммов *Klebsiella* spp., не относящихся к клиническим изолятам, свидетельствовало о циркуляции среди них факторов патогенности и, следовательно, о возможной этиологической роли в формировании дисбиотических процессов у детей раннего возраста.

Ключевые слова: *Klebsiella* spp., кишечная микробиота, ассоциативный симбиоз, гены патогенности, полимеразная цепная реакция (ПЦР)

DETECTION OF GENETIC MARKERS OF PATHOGENICITY FACTORS AT ASSOCIATIVE SYMBIOSIS OF *KLEBSIELLA* SPP. AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AUTOSTRAINS, ISOLATED FROM INFANTS

E.V. Bukharova ¹, S.M. Popkova ¹, E.B. Rakova ^{1,2}, Yu.P. Dzhioev ^{1,2}, N.M. Shabanova ¹,
U.M. Nemchenko ¹, E.I. Ivanova ¹

¹ Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk

² Irkutsk State Medical University, Irkutsk

The article presents the results of detection of genetic determinants of pathogenicity in 120 *Klebsiella* strains (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) and 48 *Staphylococcus aureus* strains isolated from the intestinal habitat of infants with intestinal dysbiosis. Registration of the investigated determinants in *Klebsiella* spp. autostrains DNA, which are non-clinical isolates, indicates the circulation of pathogenicity factors and, consequently, their possible causation in the formation of intestinal dysbiosis in infants.

Key words: *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, intestinal microbiome, associative symbiosis, pathogenicity genes, polymerase chain reaction (PCR)

Симбиотические ассоциации – это форма существования микроорганизмов в экологических нишах, коими являются микробиоценозы, всех открытых полостей человеческого организма. Самым многочисленным как по видовому разнообразию, так и в количественном отношении является ассоциативный симбиоз микробных сообществ толстого кишечника. Доминантная микрофлора оказывает мутуалистическое влияние на организм хозяина (макросимбионта), включение же в этот симбиоз условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) (ассоциативных микросимбионтов) может иметь разные последствия для макроорганизма. Это связано с тем, что межмикробные взаимодействия внутри ассоциаций – от синергизма до антагонизма – могут изменять биологические свойства микробов, что нередко является патогенетической основой формирования эндогенных инфекций [3, 5, 9]. У детей первого года жизни с высокой частотой и в этиологически значимых количествах выделяются клебсиеллы и золотистый стафилококк, что делает этот возраст уязвимым для развития эндогенных гнойно-воспалительных процессов различной локализации. Микробиоценоз кишечника характеризуется неустойчивостью, связанной с микробной сукцессией при формировании

микробиоты, особенностями иммунной системы, неадекватным иммунным ответом организма на заселение кишечника УПМ [2, 6]. *Klebsiella* spp. и *Staphylococcus aureus* обладают различным набором факторов патогенности, чем и определяется их патогенный потенциал [1, 4, 7, 8, 10, 11, 12, 14]. Однако малоизученными остаются вопросы, связанные с распространенностью и взаимодействием генетических маркеров патогенности среди клебсиелл и стафилококков, персистирующих совместно в кишечном биотопе. Ввиду того, что кишечник является резервуаром для микроорганизмов, а спектр изученных факторов патогенности остается узким, актуальной является проблема поиска патогенных свойств у штаммов, вегетирующих в кишечнике в качестве одного из членов нормального микробного сообщества. В данном исследовании были изучены аутоштаммы клебсиелл и золотистого стафилококка на предмет присутствия генов патогенности *mag A*, *uge*, *kfu* [6, 14, 15, 16].

Цель работы: оценить патогенный потенциал аутоштаммов *Klebsiella* spp. в ассоциации со *St. aureus*, изолированных от детей первого года жизни с дисбиозами кишечника посредством детекции генетических детерминант патогенности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были исследованы копрологические пробы 120 детей первого года жизни, у которых на основании микробиологических критериев был установлен дисбиоз кишечника с индикацией клебсиелл в диагностически значимых концентрациях ($\geq 10^4$ КОЕ/г) [13]. Исследуемая выборка по биохимическим тестам была разделена на две группы: группа 1 – 48 аутоштаммов клебсиелл в ассоциации с золотистым стафилококком (40 % случаев); группа 2 – 72 аутоштамма клебсиелл в монокультуре. Исследования проводили с аутоштаммами клебсиелл и золотистого стафилококка, выделенными у детей первого года жизни, в течение 2012–2014 гг. Бактериологический анализ содержимого толстой кишки производили согласно отраслевому стандарту ОСТ 91500.11.0004-2003 [13] и в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями. Выделенные микроорганизмы идентифицировали общепринятыми методами [2]. Всего для ПЦР детекции факторов патогенности использовали 168 проб из культуральных сред, где в группе 1 были типированы по 48 проб *Klebsiella* spp. и *Staphylococcus aureus*, а в группе 2 – 72 пробы с *Klebsiella* spp. Для выделения ДНК бактерий из культуральной среды использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Типирование проводили с тремя парами праймеров (табл. 1), отобранных, согласно рекомендациям [14, 15, 16].

Для ПЦР-амплификации использовали коммерческий набор AmpliSens-200-1 (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). ПЦР проводили с ДНК-матрицы (3 мкл), прямого и обратного праймеров (1 мкл). ДНК амплифицировали в соответствии с протоколом [6]. Электрофорез ПЦР-фрагментов ДНК клебсиелл проводили с использованием 1,0%-го агарозного геля в

1%-м трис-ацетатном буфере в течение 60 мин при 100 В, окрашивали бромистым этидием (1%) и просматривали с помощью УФ-просвечивания. Выделенные гены были идентифицированы и определены на основе размера фрагмента ДНК продукта (см. табл. 1) при его соответствии с длиной маркерного фрагмента. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ Statistica, Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Микроэкологический дисбаланс детей первого года жизни характеризовался высокой плотностью бактерий рода *Klebsiella* ($> 10^4$ КОЕ/г), а также их сочетанием со *St. aureus* (в 40 % случаев). Был произведен скрининг изолятов *Klebsiella* spp. и *St. aureus* на наличие нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих синтез факторов патогенности *mag A*, *uge*, *kfu* [6].

Как показано в таблице 2, в аутоштаммах клебсиелл обеих групп частота встречаемости гена *uge*, кодирующего уридин-дифосфат-галактозо-4-эпимеразу и оказывающего существенное влияние на вирулентность, регистрировалась в 75 % и 56,9 % случаев соответственно. Также этот ген был обнаружен у стафилококка в ассоциации с *Klebsiella* spp. в 43,8 % случаев. Ген *kfu*, кодирующий систему поглощения железа, выявлялся у штаммов *St. aureus* в 3 раза чаще (6,3 %), чем у клебсиелл группы 2 (1,4 %), в то время как у аутоштаммов клебсиелл, вегетирующих совместно с золотистым стафилококком (группа 1), он не был зарегистрирован ни в одном из исследованных образцов.

Сочетания двух генов патогенности наблюдалось достаточно часто и, как правило, с геном *uge*, который присутствовал в генетическом материале аутоштам-

Таблица 1
Нуклеотидные структуры праймеров, используемых для определения наличия генов патогенности клебсиелл [6, 14]

Ген патогенности	Праймеры	Нуклеотидная последовательность праймера (5'-3')	Размер ампликона (п. н.)
<i>mag A</i>	<i>mag A-F</i> <i>mag A-R</i>	GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	1280
<i>uge</i>	<i>uge-F</i> <i>uge-R</i>	TCT TCA CGC CTT CCT TCA CT GAT CAT CCG GTC TCC CTG TA	534
<i>kfu</i>	<i>kfu-F</i> <i>kfu-R</i>	GAA GTG ACG CTG TTT CTG GC TTT CGT GTG GCC AGT GAC TC	797

Таблица 2
Характеристика изолятов *Klebsiella* spp. в ассоциации со *St. aureus* и в монокультуре по наличию генов патогенности

Гены патогенности и их сочетания	<i>Klebsiella</i> spp. (n = 48)	<i>St. aureus</i> (n = 48)	<i>Klebsiella</i> spp. в монокультуре (n = 72)
	Группа 1		Группа 2
<i>mag A</i>	0	0	0
<i>uge</i>	36 / 75,0 ± 6,0	21 / 43,8 ± 4,6	41 / 56,9 ± 6,4
<i>kfu</i>	0	3 / 6,3 ± 1,7	1 / 1,4 ± 1,0
<i>mag A + uge</i>	3 / 6,3 ± 1,7	0	0
<i>uge + kfu</i>	9 / 18,8 ± 3,0	0	11 / 15,3 ± 3,3

Примечание: количество изолятов / частота встречаемости (%).

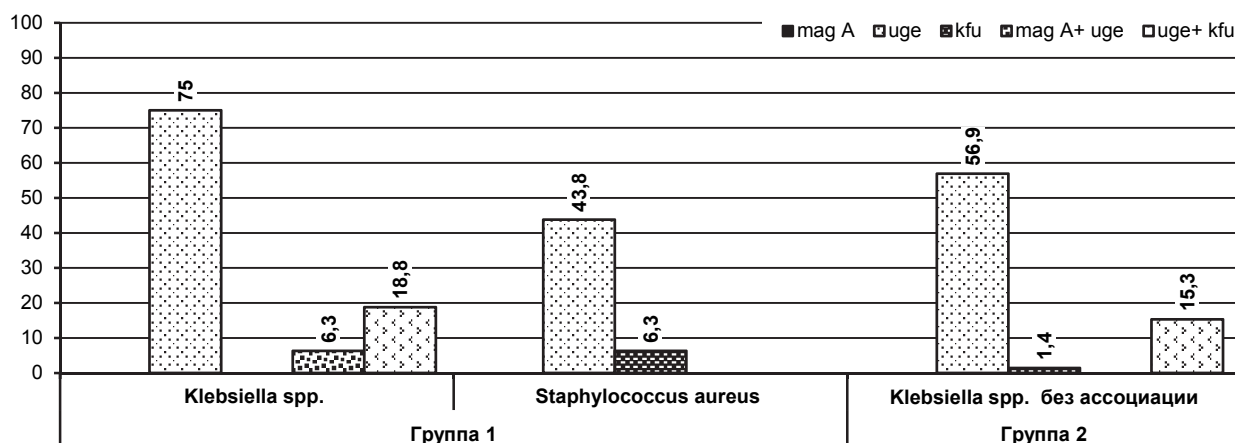


Рис. 1. Детекция генов патогенности в двух группах клебсиелл.

мов. Ген *mag A* у клебсиелл был обнаружен только в сочетании с геном *uge* (6,3 %) первой группы, что свидетельствовало о редкой встречаемости штаммов способных продуцировать слизистую субстанцию повышенной вязкости. Сочетания генов *uge + kfu* регистрировались примерно на одном уровне в обеих группах (18,8 % и 15,3 % случаев соответственно).

В исследовании показано, что у детей первого года жизни, в кишечном биотопе которых регистрируется высокая популяционная плотность клебсиелл, вегетируют штаммы с наличием генов патогенности. Наибольшее распространение (75 %) имеет ген *uge*, который с одинаковой частотой присутствует в генетическом материале обеих исследуемых нами групп (рис. 1).

Одновременное присутствие генов, ответственных за патогенные свойства, усиливает вирулентность бактерий и способствует развитию инфекционных осложнений. Полученные результаты свидетельствуют о том, что среди штаммов клебсиелл, не являющихся клиническими, а вегетирующих в кишечнике детей в качестве составляющей аллохтонной микробиоты, может быть сосредоточен достаточно заметный патогенный потенциал. Выявление генов патогенности у штаммов *Klebsiella* spp. в ассоциации со *St. aureus* различной вирулентности показало увеличение частоты встречаемости искомым ампликонов. Следовательно, в результате взаимoadaptации микросимбионтов с различной вирулентностью в условиях макроорганизма происходило увеличение численности особей, в геномике которых локализованы *uge*, *kfu*, *mag A* гены и их сочетания, что является свидетельством их взаимного влияния на способность реализации патогенного потенциала в условиях ассоциативного симбиоза. Взаимовлияние ассоциативных симбионтов приводит к селекции и накоплению вирулентных вариантов в бактериальной популяции, которые могут быть этиологически ассоциированными с заболеваниями кишечного тракта. Для выяснения роли клебсиелл с набором генов патогенности, а также их ассоциаций с золотистым стафилококком, с высокой частотой встречающихся в кишечнике детей первого года жизни, необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Бондаренко В.М. Генетические маркеры вирулентности условно патогенных бактерий // Ж. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 94–99.
2. Bondarenko V.M. Genetic markers of virulence of opportunistic pathogenic bacterium // Zh. mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. – 2011. – N 3. – P. 94–99. (in Russian)
3. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. – 300 с.
4. Bondarenko V.M., Matsulevitch T.V. Intestinal dysbacteriosis as clinical laboratory syndrome: modern state of problem. – Moscow: GEOTAR-media, 2007. – 300 p. (in Russian)
5. Бондаренко В.М., Рябиченко Е.В. Роль дисфункции кишечного барьера в поддержании хронического воспалительного процесса различной локализации // Ж. микробиологии. – 2010. – № 1. – С. 92–100.
6. Bondarenko V.M., Ryabichenko E.V. Role of intestinal barrier dysfunction in maintaining of chronic inflammatory process of different localization // Zh. mikrobiologii. – 2010. – N 1. – P. 92–100. (in Russian)
7. Бурганова Р.Ф. Изменение патогенности *Klebsiella pneumoniae* при дисбиозе кишечника, вызванного бластоцистной инвазией: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Челябинск, 2011. – 21 с.
8. Burganova R.F. Change of pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* at the intestinal dysbacteriosis caused by blastocyte invasion: abstract of dissertation of Candidate of Biological Sciences. – Chelyabinsk, 2011. – 21 p. (in Russian)
9. Бухарин О.В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза // Ж. микробиологии. – 2009. – № 1. – С. 83–86.
10. Bukharin O.V. Infection – a model system of associative symbiosis // Zh. mikrobiologii. – 2009. – N 1. – P. 83–86. (in Russian)
11. Бухарова Е.В., Попкова С.М., Ракова Е.Б. и др. Детекция некоторых генетических маркеров факторов патогенности в аутоштаммах *Klebsiella* spp. у детей

первого года жизни // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 2 (96). – С. 58–62.

Bukharova E.V., Popkova S.M., Rakova E.B. et al. Detection of some genetic markers of pathogenicity in *Klebsiella* spp. autostrains in infants // Вжл. VSNC SO RAMN. – 2014. – N 2 (96). – P. 58–62. (in Russian)

7. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Макарова М.А. Патогенный потенциал микроорганизмов рода *Klebsiella* как возбудителей острых кишечных инфекций // Вестник Военно-медицинской академии. – 2008. – Прил. 2 (22). – С. 535–536.

Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Makarova M.A. Pathogenic potential of *Klebsiella* microorganisms as infectious agents of acute enteric infections // Vestnik Voenno-meditsinskoj akademii. – 2008. – Suppl. 2 (22). – P. 535–536. (in Russian)

8. Жеребцова Н.Ю., Баймиев А.Х., Валишин Д.А., Мавзютов А.Р. Генетические маркеры патогенности условно патогенных энтеробактерий, выделенных у детей и подростков при острых кишечных инфекциях // Ж. микробиологии. – 2007. – № 2. – С. 3.

Zherebtsova N.Yu., Baymiev A.Kh., Valishin D.A., Mavzyutov A.R. Genetic markers of pathogenicity of opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae isolated from children and teenagers with acute enteric infections // Zh. mikrobiologii. – 2007. – N 2. – P. 3. (in Russian)

9. Захарова Ю.В. Микробиоценоз и биологические свойства микрофлоры кишечника у ВИЧ-инфицированных детей // Immunopathology, Allergology, Infectology. – 2012. – № 3. – С. 48–55.

Zakharova Yu.V. Microbiocenosis and biological properties of intestine microflora in HIV infected children // Immunopathology, Allergology, Infectology. – 2012. – N 3. – P. 48–55. (in Russian)

10. Мавзютов А.Р. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи // Ж. микробиологии – 2007. – № 1. – С. 89–97.

Mavzyutov A.R. Factors of pathogenicity of opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae and their role in the course of diarrhea // Zh. mikrobiologii. – 2007. – N 1. – P. 89–97. (in Russian)

11. Мавзютов А.Р., Фиалкина С.В., Бондаренко В.М. «Острова» патогенности условно-патогенных энтеробактерий // Ж. микробиологии. – 2002. – № 6. – С. 5–9.

Mavzyutov A.R., Fialkina S.V., Bondarenko V.M. Pathogenicity islands of opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae // Zh. mikrobiologii. – 2002. – N 6. – P. 5–9. (in Russian)

12. Николаева И.В. Энтеротоксигенность штаммов *S. aureus*, выделенных у детей с дисбиозом кишечника // Вестник современной клинической медицины. – 2013. – Т. 6 (3). – С. 13–15.

Nikolaeva I.V. Enterotoxigenicity of *S. aureus* strains isolated from the children with intestinal dysbiosis // Vestnik sovremennoj klinicheskoy mediciny. – 2013. – Vol. 6 (3). – P. 13–15. (in Russian)

13. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Утв. 09.06.2003.

Industrial standard OST 91500.11.0004-2003. Patient management protocol. Intestine dysbacteriosis. Approved 09.06.2003. (in Russian)

14. Aher T, Roy A, Kumar P. Molecular detection of virulence genes associated with pathogenicity of *Klebsiella* spp. isolated from the respiratory tract of apparently healthy as well as sick goats // Israel J. Veterinary Med. – 2012. – Vol. 67 (4). – P. 249–252.

15. Niyogi S.K., Pal A., Mitra U. et al. Enteroaggregative *Klebsiella pneumoniae* in association with childhood diarrhea // Indian J. Med. Res. – 2000. – Vol. 112. – P. 133–134.

16. Regue M., Hita B., Pique A. et al. Gene *uge* is essential for *K. pneumoniae* virulence // Infect. Immun. – 2004. – P. 54–61.

Сведения об авторах

Бухарова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru)

Попкова София Марковна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Ракова Елена Борисовна – научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Джиоев Юрий Павлович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий Иркутского государственного медицинского университета, руководитель лаборатории, старший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (e-mail: alanir07@mail.ru)

Шабанова Наталья Михайловна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Немченко Ульяна Михайловна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Иванова Елена Иннокентьевна – младший научный сотрудник Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека

Information about the authors

Bukharova Ekaterina Vladimirovna – Junior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str., 3, Irkutsk, 664025; tel.: +7 (3952) 33-39-52; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru)

Popkova Sofia Markovna – Doctor of Biological Sciences, Senior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Rakova Elena Borisovna – Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Dzhioev Yuri Pavlovich – Candidate of Medical Sciences, Leading Research Officer of Research Institute of Biomedical Technologies of Irkutsk State Medical University, Head of the laboratory, Senior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: alanir07@mail.ru)

Shabanova Natalya Mikhailovna – Junior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Nemchenko Ulyana Mikhailovna – Junior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems

Ivanova Elena Innokentievna – Junior Research Officer of Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems