

ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СТРЕПТОКОККОВ И КЛЕБСИЕЛЛ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ИХ ЭТИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА

Л.А. Краева^{1,2}, Е.С. Кунилова¹, О.А. Бургасова³, Г.Н. Хамдулаева¹,
Е.М. Данилова¹, Г.И. Беспалова⁴

¹ ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

⁴ Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Наряду с известными возбудителями воспалительных процессов респираторного тракта в клинической практике часто встречаются представители стрептококков и клебсиелл, ранее считавшиеся комменсалами слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Обмен генетической информацией способствует передаче детерминант вирулентности между штаммами не только в пределах вида, но и рода. В таких случаях приобретение генов вирулентности от представителей патогенных видов способствует проявлению непатогенными стрептококками ранее не присущих им свойств. Поэтому целью исследования стало изучение вирулентности условно-патогенных стрептококков и клебсиелл при воспалительных процессах респираторного тракта и обоснование их этиологической роли в развитии заболеваний. Изучены 220 штаммов *Streptococcus* spp. и 97 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных от пациентов с воспалительными процессами в респираторном тракте и от здоровых лиц. Стрептококки исследовали на наличие генов вирулентности *sagA*, *lmb*, *fap1*, *ply*, *lytA*. Штаммы *Klebsiella* spp. исследовали на наличие генов вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*. Фенотипическим маркером экспрессии гена *lmb* у стрептококков и гена *MrkD* у клебсиелл служил показатель адгезии выделенных штаммов к клеткам буккального эпителия. Экспрессию гена *fap1* оценивали в фенотипическом тесте биопленкообразования. У лиц с воспалительными процессами верхних дыхательных путей наиболее часто присутствовали виды стрептококков: *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis*. Штаммы указанных видов, выделенные при воспалительных процессах в верхних дыхательных путях, обладали в 2–4 раза большей адгезивностью, чем штаммы, выделенные от здоровых лиц. Фенотипическое определение способности к биопленкообразованию показало, что штаммы стрептококков, содержащие ген *fap1*, формировали выраженную биопленку в отличие от штаммов, не имеющих гена *fap1*. Штаммы *K. oxytoca*, выделенные от людей с гайморитом, имели гены вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*, которые характерны для штаммов *K. pneumoniae*. В фенотипических тестах

Адрес для переписки:

Краева Людмила Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-94-85. Факс: 8 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Contacts:

Lyudmila A. Kraeva
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-94-85. Fax: +7 (812) 498-09-39.
E-mail: lykraeva@yandex.ru

Библиографическое описание:

Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н.,
Данилова Е.М., Беспалова Г.И. Значение факторов патогенности
некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении
их этиологической роли в развитии воспалительных процессов
респираторного тракта // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1.
С. 121–128. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339

Citation:

Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M.,
Bespalova G.I. The importance of pathogenicity factors of some
Streptococcus spp. and *Klebsiella* spp. in determining their etiological role
in the inflammatory processes of the respiratory tract // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2020, vol. 10, no. 1,
pp. 121–128. doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339

установлено, что значение индекса адгезии у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных, в 4 раза выше, чем у штаммов этого вида, выделенных от здоровых лиц. Таким образом, для подтверждения этиологической роли условно-патогенного микроорганизма в развитии инфекционного процесса необходимо руководствоваться данными о генетических и фенотипических маркерах вирулентности выделенного штамма.

Ключевые слова: факторы патогенности, стрептококки, клебсиеллы, генетические и фенотипические маркеры вирулентности.

THE IMPORTANCE OF PATHOGENICITY FACTORS OF SOME *STREPTOCOCCUS* spp. AND *KLEBSIELLA* spp. IN DETERMINING THEIR ETIOLOGICAL ROLE IN THE INFLAMMATORY PROCESSES OF THE RESPIRATORY TRACT

Kraeva L.A.^{a,b}, Kunilova E.S.^a, Burgasova O.A.^c, Hamdulaeva G.N.^a, Danilova E.M.^a, Bespalova G.I.^d

^a St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^b Military Medical Academy named S.M. Kirov, St. Petersburg, Russian Federation

^c RUDN University, Moscow, Russian Federation

^d North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Together with the known pathogens of inflammatory processes of the respiratory tract in clinical practice are often found representatives of *Streptococcus* and *Klebsiella*, previously considered commensals of the mucous membranes of the upper respiratory tract. The exchange of genetic information facilitates the transfer of virulence factors between strains not only within the species but also within the genus. In such cases, the acquisition of virulence genes by non-pathogenic species from representatives of pathogenic species contributes to the manifestation of previously not typical properties. Therefore, the aim of the research was to study the virulence of opportunistic *Streptococcus* spp. and *Klebsiella* spp. in inflammatory processes of the respiratory tract and substantiate their etiological role in the development of the disease. We studied 220 strains of *Streptococcus* spp. and 97 strains of *Klebsiella* spp., isolated from patients with inflammatory processes in the respiratory tract and from healthy individuals. Strains of *Streptococcus* spp. were investigated for the presence of virulence genes: *sagA*, *lmb*, *fapI*, *ply*, *lytA*. Strains of *Klebsiella* spp. were examined for the presence of virulence genes: *MrkD*, *magA*, *kfu*. The phenotypic marker of *lmb* gene expression in *Streptococcus* and *MrkD* gene in *Klebsiella* was the indicator of adhesion of isolated strains to buccal epithelial cells. Expression of the *fapI* gene was evaluated in a phenotypic biofilm formation test. In individuals with upper respiratory tract inflammation, the most common types of streptococci were: *S. mitis*, *S. anginosus*, and *S. oralis*. Strains of these species isolated from inflammatory processes in the upper respiratory tract had 2–4 times greater adhesiveness than strains isolated from healthy individuals. Phenotypic determination of the ability to biofilm formation showed that strains of *Streptococcus* containing the *fapI* gene formed a dense biofilm in contrast to strains without the *fapI* gene. *K. oxytoca* strains isolated from people with sinusitis had *mrkd*, *magA*, and *kfu* virulence genes that are characteristic of *K. pneumoniae* strains. In phenotypic tests, it was found that the value of the adhesion index in *K. oxytoca* strains isolated from patients is 4 times higher than in strains of this species isolated from healthy individuals. Thus, to confirm the etiological role of an opportunistic microorganism in the development of the infectious process, it is necessary to be guided by data on the genetic and phenotypic markers of virulence of the isolated strain.

Key words: pathogenicity factors, *Streptococcus*, *Klebsiella*, genetic and phenotypic markers of virulence.

Введение

Наибольшие затруднения в определении этиологической роли выделенных бактерий возникают при диагностике инфекционной патологии дыхательных путей в случае нахождения в исследуемом материале условно-патогенных микроорганизмов. В большей части таких случаев возбудитель инфекции остается неизвестным, так как выделяемые условно-патогенные бактерии не подлежат этиологическому учету из-за видовой принадлежности [28]. Не получая достоверной информации об истинном возбудителе заболевания и его основных биологических свойствах, лечащий врач делает назначения не этиологического, а патогенетического характера. Результатом такого подхода может быть неадекватная и не всегда успешная терапия.

По данным ряда исследователей возбудителями воспалительных процессов респираторного тракта чаще всего являются бактерии: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus (pneumoniae, pyogenes)*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* [2, 4, 5]. Соотношение видов варьирует при различных нозологиях, в различных регионах, у стационарных или амбулаторных больных. Этиологическая роль перечисленных бактерий не вызывает сомнений в силу принадлежности к видам, характеризующимся наличием целого ряда факторов патогенности. Так, среди стрептококков наибольшим количеством известных генов вирулентности обладают *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* [6, 8, 29, 33]. На основе сравнений последовательностей генов 16S рРНК все стрептококки условно разделены на 6 групп (*Anginosus*, *Bovis*,

Mitis, Mutans, Pyogenic, Salivarius) и два вида, пока не включенных в какую-либо группу: *S. entericus*, *S. pluranimalium* [33]. Представители видов *S. pyogenes* и *S. agalactiae* входят в группу Pyogenic, а *S. pneumoniae* — в группу Mitis [24]. И если представители группы Pyogenic имеют значительные генетические различия между собой, то некоторые стрептококки группы Mitis, в частности *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, имеют более 99% гомологии по анализу гена 16S рНК [15]. Несмотря на тесные генетические связи между этими видами, *S. pneumoniae* может быть опасным патогеном, а *S. oralis* и *S. mitis* обычно являются комменсальными микроорганизмами слизистых оболочек. Однако в некоторых случаях они способны вызывать оппортунистические заболевания у иммунокомпрометированных больных, особенно при замене клапанов сердца, пересадке органов или у онкологических больных [7, 14, 27]. Представители группы Mitis естественно трансформируемы, что позволяет осуществлять обмен генетической информацией между видами путем гомологичной рекомбинации [17, 30]. Именно по этой причине увеличение резистентности к пенициллину в популяции пневмококков было связано с формированием измененных вариантов пенициллинсвязывающих белков в результате приобретения штаммами генов резистентности к пенициллину от *S. mitis* и *S. oralis* [12]. Отмечены также гомологичные рекомбинации с родственными видами в генах пневмококковой вирулентности, кодирующих протеазу IgA и нейраминидазу А (*nanA*) [25], а гомологи факторов пневмококковой вирулентности, таких как пневмолизин (*Ply*) и аутолизин А (*LytA*), были идентифицированы в родственных видах группы Mitis [21, 32, 36]. Особого внимания заслуживает исследование штаммов стрептококков группы Mitis на наличие пневмолизина, ответственного за инвазивные свойства бактерий, и приводящего к распространению инфекции в организме человека [18, 22].

Наличие у штаммов *S. pyogenes* и *S. agalactiae* большого количества нехромосомных генетических элементов способствует горизонтальному переносу генов вирулентности не только между представителями одного вида, но и представителями разных видов [31]. Так, ген вирулентности *lmb*, который кодирует ламинин-связывающий белок, может быть передан родственным штаммам стрептококков с помощью транспозона или «острова» патогенности [13, 16]. В то же время гены стрептококков, постоянных резидентов ротовой полости, ответственные за образование биопленок, могут способствовать закреплению бактерий в местах локализации или дальнейшему их распространению в организме человека, что особенно важно при наличии у штаммов других факторов патогенности [34].

Так, экспериментальные исследования показали, что *fap1*, высокомолекулярный гликопротеин, имеет важное значение для длительного формирования фимбрий и образования биопленок у стрептококков ротовой полости [37].

Приобретение генов вирулентности от представителей патогенных видов способствует проявлению непатогенными стрептококками ранее не присущих им свойств. Так, основным фактором вирулентности у штаммов *S. pyogenes* является белок М, который появляется в виде волосовидных выступов на поверхности клеток. Он придает устойчивость бактериям к комплемент-опосредованному уничтожению полиморфноядерными лейкоцитами и макрофагами, тем самым защищая бактерии от фагоцитоза. Белок М также вызывает агрегацию стрептококков во время адгезии к клеткам тонзиллярного эпителия, поэтому он также может играть важную роль в инициации колонизации слизистой оболочки дыхательных путей [11]. Исследования *in vitro* показали непосредственное участие локуса *sagA* в реализации прикрепления бактериальной клетки к клеткам слизистого эпителия [26]. Однако недостаточное количество клинических данных не позволяют сделать однозначную оценку этих наблюдений.

Как известно, бактерии рода *Klebsiella* находят на слизистых оболочках носоглотки здоровых людей в 1–6% случаев, однако при различных заболеваниях респираторного тракта частота их выделения возрастает от 10% при синуситах до 29% при вентилятор-ассоциированных пневмониях [23]. При этом определяющее значение в развитии инфекционного процесса имеет резистентность штаммов к антибактериальным препаратам. Однако крайне важным также является наличие у бактерий рода *Klebsiella* ряда факторов патогенности. На пусковом этапе патогенеза заболевания наибольшее значение имеют факторы, определяющие взаимодействие бактерий с эпителиальными клетками входных ворот, — различные адгезины. Один из них — ген *MrkD*, который кодирует тип 3 фимбриальных адгезинов, обеспечивающих прикрепление клебсиелл к целому ряду тканей человека [10, 19]. В развитии инфекционного процесса, обусловленного клебсиеллами, большое значение имеет наличие у бактерий капсулы, защищающей их от фагоцитоза и бактерицидных факторов макроорганизма. Рядом исследователей был изучен ассоциированный антиген капсульных штаммов *K. pneumoniae* и ген, кодирующий его, — *magA*. Этот ген был выявлен у определенных серотипов *K. pneumoniae* [35]. Он может служить маркером вирулентности, так как при удалении гена *magA* путем направленных мутаций штаммы не вызывали поражений у экспериментальных

животных [9]. Клебсиеллы, как и большинство других бактерий, нуждаются в ионах железа, которое является для них важнейшим элементом, участвуя в переносе электронов и являясь кофактором синтеза нуклеиновых кислот. Бактерии приобретают ионы железа путем синтеза и секреции сидерофоров или гемофоров для захвата железа или гема, а также с помощью специализированных рецепторов внешней мембраны для транспортировки железа. При этом ключевую роль играет ген, отвечающий за связывание железа, — *kfu*. Являясь маркером вирулентности, этот ген часто присутствует у штаммов *K. pneumoniae*. Однако последние исследования показали, что его могут иметь также штаммы *Klebsiella oxytoca*, выделенные от больных людей и животных [20]. Таким образом, вполне очевиден недостаток информации о способности некоторых видов стрептококков и клебсиелл вызывать воспалительные процессы в респираторном тракте.

Цель исследования: дать характеристику вирулентности условно-патогенных бактерий при инфекционной патологии дыхательных путей и усовершенствовать методику этиологической расшифровки возбудителей.

Материалы и методы

Изучены 220 штаммов *Streptococcus* spp. (105 штаммов, выделенных из отделяемого верхних дыхательных путей лиц с воспалительными процессами верхнего респираторного тракта (фарингит, тонзиллит, ларингит), и 115 штаммов, выделенных от здоровых лиц (контрольная группа); 97 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных от лиц с синуситом (преимущественно гайморит), и 28 штаммов, выделенных от здоровых лиц. В исследование были включены только те случаи, когда из биопробы не были выделены патогенные микроорганизмы, а условно-патогенные — лишь один вид в количестве не менее 1×10^5 КОЕ/мл.

В работе были использованы следующие методы исследования: бактериологические методы выделения микроорганизмов из клинического материала; методы выявления фенотипических маркеров вирулентности; методы выявления генотипических маркеров вирулентности; математические методы обработки данных.

Стрептококки исследовали на наличие следующих генов:

- ген *sagA* — 1-й ген в *sag*-локусе из 9 генов, которые необходимы стрептококку для продукции стрептолизина S. Он также участвует в транскрипции гена *emm*, который кодирует выработку белка М. Наличие этого гена характерно для штаммов *S. pyogenes*;

- ген *lmb*, регулирующий выработку протеина, являющегося составной частью адгезивных гликопротеинов стрептококков группы В;

- ген *fap1*, кодирующий выработку одного из адгезинов, которые участвуют в биопленкообразовании;

- ген *ply*, ответственный за выработку токсина — пневмолизина, характерного для *S. pneumoniae*;

- ген *lytA* — ген конъюгативной плазмиды пневмококков, кодирующий выработку пневмококкового аутолизина.

Штаммы *Klebsiella* spp. исследовали на наличие следующих генов:

- ген *MrkD*, кодирующий тип 3 фимбриальных адгезинов, обеспечивающих прикрепление клебсиелл к целому ряду тканей человека;

- ген *magA*, ассоциированный антиген капсульных штаммов *K. pneumoniae*;

- ген *kfu*, отвечающий за связывание железа, некротические изменения тканей.

Фенотипическим маркером экспрессии гена *lmb* у стрептококков и гена *MrkD* у клебсиелл служил показатель адгезии выделенных штаммов к клеткам букального эпителия [2]. Индекс адгезии рассчитывали по формуле: $ИА = АКБ_{50}/50Э$, где: ИА — индекс адгезии, $АКБ_{50}$ — количество клеток бактерий, прикрепившихся к 50 эпителиоцитам, 50Э — 50 изученных эпителиоцитов.

Экспрессию гена *fap1* оценивали в фенотипическом тесте биопленкообразования. Для этого на предметное стекло наносили каплю объемом 200 мкл, содержащую 1×10^5 КОЕ/мл штамма исследуемого стрептококка в бульоне Мюллера–Хинтона. Стекло размещали в чашке Петри, создав условия «влажной камеры», и оставляли в термостате при 37°C на 48 ч. Затем фиксировали образовавшуюся биопленку 4%-ным раствором параформальдегида 20 мин при 4°C. Удаляли фиксирующий раствор и наносили каплю красителя Дапи (1:1000) на 30 мин, смывали физиологическим раствором и проводили микроскопию с помощью люминесцентного микроскопа Axio Scope A1 (производства «Zeiss») при увеличении в 630 раз и профессиональной стационарной цифровой фотокамеры AxioCam HRc Rev3.

Результаты

При исследовании стрептококков оказалось, что от здоровых лиц было выделено 22 вида, в то время как от лиц с воспалительными процессами — всего 11 видов стрептококков. Среди них наибольшую долю составляли *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* наряду с *S. agalactiae* и *S. pneumoniae*.

В таблице 1 представлена частота выявления генов вирулентности у штаммов трех наиболее часто встречающихся видов стрептококков. В ряде случаев отмечалось сочетание в одном штамме нескольких генов. Причем, штаммы, выделенные от здоровых лиц, имели меньше генов вирулентности как по количеству, так и по их сочетанию. Наибольшим набором генов вирулентности обладали штаммы *S. mitis*, выделенные от больных с фарингитом как в острой, так и в хронической форме заболеваний.

Индекс адгезии у штаммов, выделенных от больных, был в 2–4 раза выше, чем у штаммов, выделенных от здоровых лиц (табл. 2).

Штаммы *S. anginosus*, выделенные при воспалительных процессах в верхних дыхательных путях, обладали в 3 раза большей адгезивностью, чем штаммы того же вида, выделенные от здоровых лиц. Штаммы *S. oralis*, выделенные от лиц с тонзиллитами, были в 2,5 раза более адгезивными, чем штаммы от здоровых лиц.

Фенотипическое определение способности к биопленкообразованию показало, что штаммы стрептококков, содержащие ген *fap1*, формировали выраженную биопленку в отличие от штаммов, не имеющих гена *fap1* (рис., III обложка).

Штаммы *K. oxytoca*, выделенные от лиц с воспалительными процессами, так же как и штаммы *K. pneumoniae*, содержали гены вирулентности (табл. 3).

При этом, штаммы *K. oxytoca*, выделенные от людей с гайморитом, имели гены вирулентности *MrkD*, *magA*, *kfu*, которые характерны для штаммов *K. pneumoniae* (табл. 4).

В фенотипических тестах установлено, что индекс адгезии у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных, в 4 раза выше, чем у штаммов этого вида, выделенных от здоровых лиц. Так, штаммы *K. oxytoca*, выделенные от лиц с гайморитом, имели индекс адгезии $20,75 \pm 6,4$, в то время, как у штаммов, выделенных от здоровых лиц, он был равен $5,6 \pm 1,1$.

Обсуждение

Пейзаж видов стрептококков, выделенных от лиц с воспалительными процессами верхних дыхательных путей, отличался более узким спектром видов стрептококков, чем у здоровых лиц. Кроме того, от лиц с заболеваниями, наряду с *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* и *S. pyogenes*, были выделены *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* и в единичных случаях *S. dysgalactiae*, *S. intermedius*, *S. mutans*, *S. salivarius*. Если 3 первых вида давно известны своей причастностью к развитию воспалительных процессов в силу наличия большого набора факторов патогенности, то остальные виды все еще продолжают считаться комменсалами или условно-патогенными микро-

Таблица 1. Частота встречаемости генов вирулентности среди штаммов *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* при различных состояниях обследуемых

Table 1. The frequency of occurrence of virulence genes among strains *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* in different status of the examined patient

Стрептококки <i>Streptococcus</i>	Диагноз Diagnosis	Гены вирулентности Virulence genes				
		<i>sagA</i>	<i>lmb</i>	<i>fap1</i>	<i>ply</i>	<i>lytA</i>
<i>S. mitis</i>						
n = 28	Больные Patients	3	4	4	1	1
n = 25	Здоровые Healthy	–	1	1	–	–
<i>S. anginosus</i>						
n = 17	Больные Patients	–	2	3	1	–
n = 4	Здоровые Healthy	–	–	1	–	–
<i>S. oralis</i>						
n = 16	Больные Patients	–	2	2	3	4
n = 8	Здоровые Healthy	–	1	2	–	–

Таблица 2. Адгезивная активность штаммов *Streptococcus* spp. с наличием гена *lmb* по отношению к клеткам буккального эпителия

Table 2. Adhesive activity of strains of *Streptococcus* spp. with the presence of the *lmb* gene to buccal epithelial cells

Стрептококки <i>Streptococcus</i> spp.	Индекс адгезии штаммов, M±m The adhesion index of strains, M±m	
	Здоровые Healthy	Больные Patients
<i>S. mitis</i>	4,5±0,6	8,2±0,7
<i>S. anginosus</i>	3,3±0,3	11,1±1,2
<i>S. oralis</i>	2,8±0,2	6,10±0,9

Таблица 3. Частота встречаемости генов вирулентности у штаммов *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*

Table 3. Incidence of virulence genes in *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains

<i>Klebsiella</i> spp.	Доля штаммов <i>Klebsiella</i> spp., несущих гены вирулентности, % The proportion of strains of <i>Klebsiella</i> spp., carrying virulence genes, %		
	<i>MrkD</i>	<i>magA</i>	<i>kfu</i>
<i>K. pneumoniae</i>	35,4	40,2	23,2
<i>K. oxytoca</i>	20,9	37,2	23,3

Таблица 4. Частота встречаемости генов вирулентности у штаммов *K. oxytoca*Table 4. Incidence of virulence genes in *K. oxytoca* strains

Группы обследованных Investigated groups	Доля штаммов <i>K. oxytoca</i> , несущих гены вирулентности, % Proportion of <i>K. oxytoca</i> strains carrying virulence genes, %		
	<i>MrkD</i>	<i>magA</i>	<i>kfu</i>
Гайморит Maxillary sinusitis	61,3	25,8	32,3
Здоровые лица Healthy people	16,7	0	8,3

организмами. Именно частое обнаружение *S. mitis*, *S. anginosus*, *S. oralis* у больных с воспалительными процессами в верхних дыхательных путях послужило причиной изучения у них факторов патогенности.

По результатам исследования генетических маркеров вирулентности штаммы *S. mitis*, выделенные от больных лиц, обладали наибольшим набором изучаемых генов, в том числе гена *sagA*, принимающего участие в выработке стрептолизина. В то же время у этого вида стрептококков при выделении от больных присутствовали гены, отвечающие за адгезивную активность и способность к биопленкообразованию. Очевидно, именно эти факторы способствовали хронизации инфекции у больных лиц, что подтверждалось выделением их от больных с хроническим фарингитом и тонзиллитом.

В результате исследования фенотипических маркеров адгезивности было выявлено, что штаммы изучаемых видов стрептококков, выделенные от лиц с воспалительными процессами респираторного тракта, были более адгезивными, чем штаммы тех же видов, выделенные от здоровых лиц. По-видимому тесные генетические связи между стрептококками *S. pneumoniae*, *S. mitis* и *S. oralis*, описанные ранее, дают возможность близкородственным микроорганизмам иметь сходные факторы патогенности.

Такое же соответствие наблюдалось при изучении фенотипических маркеров биопленкообразования: штаммы стрептококков, выделенные от больных лиц, несущие гены, отвечающие за способность к образованию биопленок, формировали ее подобно патогенным видам стрептококков. Как видно из фотографий био-

пленок, их плотность примерно одинакова у штаммов патогенных и условно-патогенных видов стрептококков, выделенных в одинаковых условиях. Поскольку масштабные исследования по выявлению различных факторов патогенности у этих видов стрептококков, выделенных от больных и здоровых лиц, ранее не проводились, то единичные такие находки ранее рассматривались как случайность [3].

При изучении штаммов клебсиелл, выделенных в исследовании, обращает на себя внимание тот факт, что при воспалительных процессах верхних дыхательных путей чаще выделялся вид *K. pneumoniae*, реже — *K. oxytoca*. Гены вирулентности, отвечающие за адгезивную активность, также чаще встречались у штаммов *K. pneumoniae*, в то время как гены, отвечающие за формирование капсулы и связывание железа в среде, были почти с одинаковой частотой представлены у микроорганизмов обоих видов.

Однако при детальном изучении факторов патогенности штаммов *K. oxytoca* выявлено, что этот вид чаще всего встречается при гайморитах и характеризуется наличием нескольких маркеров вирулентности. В то же время от здоровых лиц не было выделено штаммов с геном *magA*, участвующим в капсулообразовании; редко встречались штаммы, несущие гены *magA* и *kfu*, отвечающие за адгезию и перенос железа в бактериальную клетку. Более того, в фенотипических тестах была подтверждена экспрессия гена *magA* именно у штаммов *K. oxytoca*, выделенных от больных лиц. Собранные факты подтверждают важность изучения факторов патогенности у бактерий, относящихся к группе условно-патогенных, а не обоснования результатов бактериологического исследования только на принадлежности выделенного микроорганизма к патогенному виду.

Заключение

Для подтверждения этиологической роли условно-патогенного микроорганизма в развитии инфекционного процесса необходимо руководствоваться данными о генетических и фенотипических маркерах вирулентности выделенного штамма. Это поможет назначить адекватную терапию на ранних этапах инфекционного процесса и предотвратить развитие осложнений.

Список литературы/References

1. Барлетт Д.Д. Инфекции дыхательных путей: пер. с англ. М.: Бином, 2000. 192 с. [Bartlett D.D. Respiratory tract infections. Moscow: Binom, 2000. 192 p. (In Russ.)]
2. Благонравова А.С., Афонин А.Н., Воробьева О.Н., Широкова И.Ю. Сравнительный анализ адгезивности микроорганизмов, выделенных от больных и с объектов внешней среды лечебно-профилактических учреждений // Медицинский альманах. 2011. № 5 (18). С. 215–218. [Blagonravova A.S., Afonin A.N., Vorobyeva O.N., Shirokova I.Yu. Comparative analysis of the adhesion of microorganisms isolated from patients and from the objects of the external environment of medical institutions. *Meditsinskii al'manakh = Medical Almanac*, 2011, no. 5 (18), pp. 215–218. (In Russ.)]

3. Бургасова О.А., Краева Л.А., Петрова И.С., Келли Е.И. Случай тяжелого течения смешанной респираторно-вирусной инфекции (грипп А (H1N1) + RS-вирусная), осложненной внебольничной пневмонией, вызванной *Streptococcus equi* // Инфекционные болезни. 2015. Т. 13, № 1. С. 71–74. [Burgasova O.A., Kraeva L.A., Petrova I.S., Kelly E.I. Case of severe course of mixed respiratory viral infection (influenza A (H1N1) + RS-viral) complicated by community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus equi*. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 71–74. (In Russ.)]
4. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. 39 с. [Laboratory diagnosis of community-acquired pneumonia: Guidelines. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2014. 39 p. (In Russ.)]
5. Перцева Т.А., Плеханова О.В., Дмитриченко В.В. Клинически значимые возбудители инфекций дыхательных путей: конспект врача-клинициста и микробиолога. Часть 3: Гемофила. Моракселла // Клиническая иммунология. Аллергология. Инфектология. 2007. № 6 (1). С. 15–20. [Pertseva T.A., Plekhanova O.V., Dmitrichenko V.V. Clinically significant pathogens of respiratory tract infections: abstract of Clinician and microbiologist. Part 3: Hemophila. Moraxella. *Klinicheskaya immunologiya. Allergologiya. Infektologiya = Clinical Immunology. Allergology. Infectology*, 2007, no. 6 (1), pp. 15–20. (In Russ.)]
6. Тоголян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека. СПб.: Человек, 2010. 212 с. [Totolyan A.A., Suvorov A.N., Dmitriev A.V. Group B *Streptococcus* in human pathology. St. Petersburg: Chelovek, 2010. 212 p. (In Russ.)]
7. Beighton D., Carr A.D., Oppenheim B.A. Identification of viridans *Streptococci* associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. *J. Med. Microbiol.*, 1994, no. 40, pp. 202–204. doi: 10.1099/00222615-40-3-202
8. Benton A.H., Marquart M.E. The role of pneumococcal virulence factors in ocular infectious diseases. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.*, 2018: 2525173. doi: 10.1155/2018/2525173
9. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebize R., Diancourt L., Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization, 2009. *PLoS One*, no. 4 (3): e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982
10. Brisse S., Grimont F., Grimont P.A.D. The genus *Klebsiella*. *Prokaryotes*, 2006, no. 6, pp. 159–196. doi: 10.1007/0-387-30746-x_8
11. Caparon M.G., Stephens D.S., Olsen A., Scott J.R. Role of M protein in adherence of group A streptococci. *Infect. Immun.*, 1991, no. 59, pp. 1811–1817.
12. Chi F., Nolte O., Bergmann C., Ip M., Hakenbeck R. Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic pbp2xin *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2007, no. 297, pp. 503–512. doi: 10.1016/j.ijmm.2007.02.009
13. Dmitriev A., Shakleina E., Tkacikova L. Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B *Streptococci*. *Folia Microbiol.*, 2002, vol. 47, pp. 291–295. doi: 10.1007/bf02817655
14. Douglas C.W., Heath J., Hampton K.K., Preston F.E. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.*, 1993, no. 39, pp. 179–182. doi: 10.1099/00222615-39-3-179
15. Facklam R. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, no. 15, pp. 613–630. doi: 10.1128/CMR.15.4.613-630.2002
16. Franken C., Haase G., Brandt C. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing scpB and lmb. *Mol. Microbiol.*, 2001, vol. 41, pp. 925–935. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02563.x
17. Havarstein L.S., Gaustad P., Nes I.F., Morrison D.A. Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol. Microbiol.*, 1996, no. 21, pp. 863–869. doi: 10.1046/j.1365-2958.1996.521416.x
18. Hirst R.A., Cosai B., Rutman A., Guerin C.J., Nicotera P., Andrew P.W., O'Callaghan C. *Streptococcus pneumoniae* deficient in pneumolysin or autolysin has reduced virulence in meningitis. *J. Infect. Dis.*, 2008, no. 197, pp. 744–751. doi: 10.1086/527322
19. Hornick D.B., Allen B.L., Horn M.A., Clegg S. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. *Infect Immun.*, 1992, no. 60, pp. 1577–1588.
20. Hossain S., De Silva B.C.J., Dahanayake P.S., Heo G.J. Phylogenetic relationships, virulence and antimicrobial resistance properties of *Klebsiella* sp. isolated from pet turtles in Korea. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2020, vol. 70, iss. 2, pp. 71–78. doi: 10.1111/lam.13245
21. Jefferies J., Nieminen L., Kirkham L.A., Johnston C., Smith A., Mitchell T.J. Identification of a secreted cholesterol-dependent cytolysin (mitilysin) from *Streptococcus mitis*. *J. Bacteriol.*, 2007, no. 189, pp. 627–632. doi: 10.1128/JB.01092-06
22. Jounblat R., Kadioglu A., Mitchell T.J., Andrew P.W. Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect. Immun.*, 2003, no. 71, pp. 1813–1819. doi: 10.1128/IAI.71.4.1813-1819.2003
23. Khilnani G.C., Dubey D., Hadda V., Sahu S.R., Sood S., Madan K., Tiwari P., Mittal S., Mohan A., Pandey R.M., Guleria R. Predictors and microbiology of ventilator-associated pneumonia among patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Lung India*, 2019, vol. 36, no. 6, pp. 506–511. doi: 10.4103/lungindia.lungindia_13_19
24. Kilian M., Poulsen K., Blomqvist T., H avarstein L.S., Bek-Thomsen M., Tettelin H., Sorensen U.B.S. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One*, vol. 3, iss. 7: e2683. doi: 10.1371/journal.pone.0002683
25. King S.J., Whatmore A.M., Dowson C.G. NanA, a neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae*, shows high levels of sequence diversity, at least in part through recombination with *Streptococcus oralis*. *J. Bacteriol.*, 2005, no. 187, pp. 5376–5386. doi: 10.1128/JB.187.15.5376-5386.2005
26. Li Z., Sledjeski D.D., Kreikemeyer B., Podbielski A., Boyle M.D. Identification of pel, a *Streptococcus pyogenes* locus that affects both surface and secreted proteins. *J. Bacteriol.*, 1999, no. 181, pp. 6019–6027.
27. Lucas V.S., Beighton D., Roberts G.J., Challacombe S.J. Changes in the oral streptococcal flora of children undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *J. Infect.*, 1997, no. 35, pp. 135–141. doi: 10.1016/S0163-4453(97)91545-0
28. Marrie T.J., Peeling R.W., Fine M.J. Ambulatory patients with community-acquired pneumonia: the frequency of atypical agents and clinical course. *Am. J. Med.*, 1996, vol. 101, pp. 508–515. doi: 10.1016/S0002-9343(96)00255-0

29. Marrie T.J., Tirrel G.J., Majumbar S.R., Eurich D. Risk factors for pneumococcal endocarditi. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 37, no. 2, pp. 277–280. doi: 10.1007/s10096-017-3128-z
30. Morrison, D.A. Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb. Drug Resist.*, 1997, no. 3, pp. 27–37. doi: 10.1089/mdr.1997.3.27
31. Nakagawa I., Kurokawa K., Yamashita A. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. *Genome Res.*, 2003, vol. 13, no. 6A, pp. 1042–1055.
32. Neeleman C., Klaassen C.H., Klomberg D.M., de Valk H.A., Mouton J.W. Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and is a putative virulence factor of *S. mitis* and other streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, no. 42, pp. 4355–4357. doi: 10.1128/JCM.42.9.4355-4357.2004
33. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2009, vol. 73, no. 3, pp. 407–450. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.
34. Potera C. Foraging a link between biofilms and disease. *Science*, 1999, no. 283, pp. 1837–1839. doi: 10.1126/science.283.5409.1837
35. Struve C., Bojer M., Nielsen E.M., Hansen D.S., Krogfelt K.A. Investigation of the putative virulence gene magA in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: magA is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. *J. Med. Microbiol.*, 2005, no. 54, pp. 1111–1113. doi: 10.1099/jmm.0.46165-0
36. Whatmore A.M., Efstratiou A., Pickerill A.P., Broughton K., Woodard G., Sturgeon D., George R., Dowson C.G. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of “atypical” pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect. Immun.*, 2000, no. 68, pp. 1374–1382. doi: 10.1128/iai.68.3.1374-1382.2000
37. Wu H., Mintz K.P., Ladha M., Fives-Taylor P.M. Isolation and characterization of Fap1, a fimbriae-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis* FW213. *Mol. Microbiol.*, 1998, no. 28 (3), pp. 487–500. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00805.x

Авторы:

Краева Л.А., д.м.н., доцент, зав. лабораторией медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; профессор кафедры микробиологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия;

Кунилова Е.С., младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Бургасова О.А., д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней с курсами эпидемиологии и фтизиатрии ФГАОУ ВПО Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

Хамдулаева Г.Н., младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Данилова Е.М., врач-педиатр высшей категории, зав. поликлиническим отделением медицинского центра ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;

Беспалова Г.И., к.б.н., доцент кафедры микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Kraeva L.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Professor, Department of Microbiology, S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation;

Kunilova E.S., Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Burgasova O.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases with Courses in Epidemiology and Phthisiology RUDN University, Moscow, Russian Federation;

Hamdulaeva G.N., Junior Researcher, Laboratory of Medical Bacteriology, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Danilova E.M., Pediatrician, Head of the Polyclinic Department of the Medical Center, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;

Bespalova G.I., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Microbiology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 08.12.2019
Отправлена на доработку 13.02.2020
Принята к печати 11.03.2020

Received 08.12.2019
Revision received 13.02.2020
Accepted 11.03.2020

Иллюстрации к статье «Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта» (авторы: Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И.) (с. 121–128)

Illustrations for the article "The importance of pathogenicity factors of some *Streptococcus* spp. and *Klebsiella* spp. in determining their etiological role in the inflammatory processes of the respiratory tract" (authors: Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bepalova G.I.) (pp. 121–128)

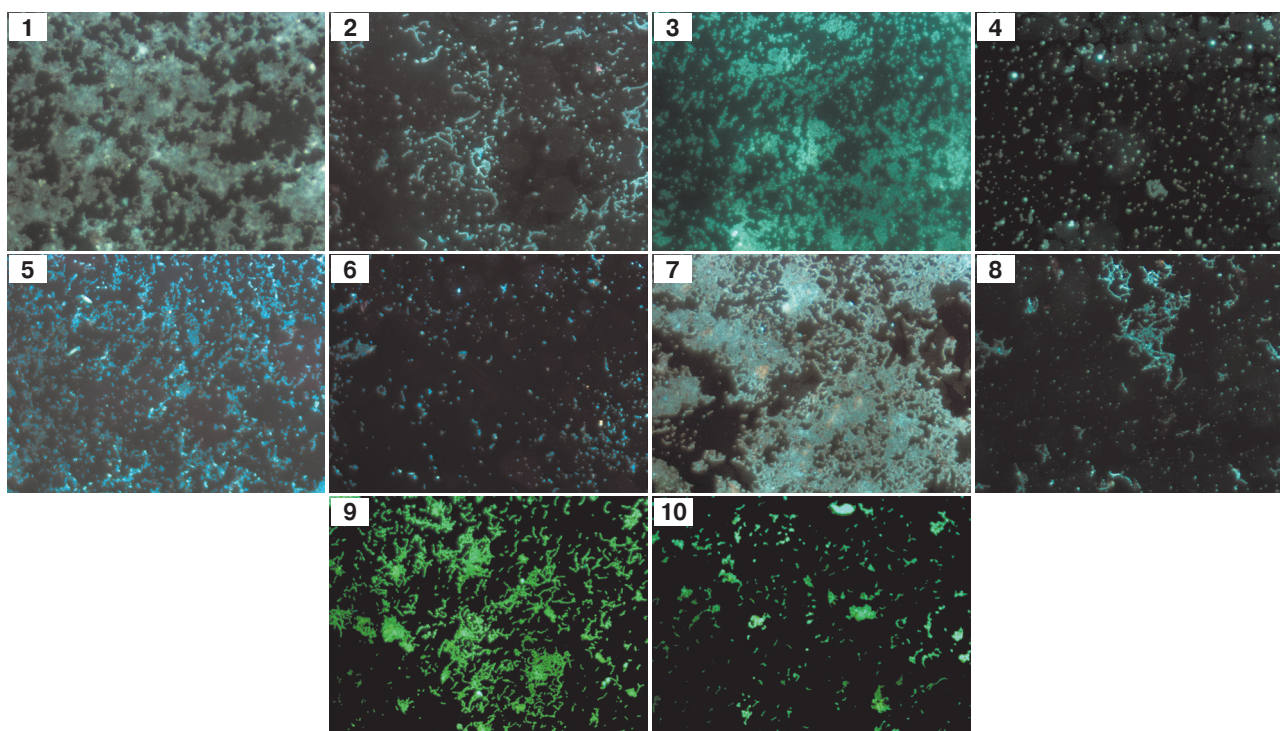


Рисунок. Люминесцентная микроскопия биопленок стрептококков (×630)

Figure. Fluorescent microscopy of streptococcal biofilms (×630)

1. *S. pyogenes*, содержащий ген *fap1*; 2. *S. pyogenes*, не содержащий ген *fap1*;
 3. *S. agalactiae*, содержащий ген *fap1*; 4. *S. agalactiae*, не содержащий ген *fap1*;
 5. *S. mitis*, содержащий ген *fap1*; 6. *S. mitis*, не содержащий ген *fap1*;
 7. *S. anginosus*, содержащий ген *fap1*; 8. *S. anginosus*, не содержащий ген *fap1*;
 9. *S. oralis*, содержащий ген *fap1*; 10. *S. oralis*, не содержащий ген *fap1*.
1. *S. pyogenes* containing the *fap1* gene; 2. *S. pyogenes* not containing the *fap1* gene;
 3. *S. agalactiae* containing the *fap1* gene; 4. *S. agalactiae* not containing the *fap1* gene;
 5. *S. mitis* containing the *fap1* gene; 6. *S. mitis* not containing the *fap1* gene;
 7. *S. pyogenes* containing the *fap1* gene; 8. *S. anginosus* not containing the *fap1* gene;
 9. *S. oralis* containing the *fap1* gene; 10. *S. oralis* not containing the *fap1* gene.