

УДК 579.262

ПАТОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ KLEBSIELLA SPP. И STAPHYLOCOCCUS AUREUS ПРИ АССОЦИАТИВНОМ СИМБИОЗЕ У ДЕТЕЙ ПЕРВОГО ГОДА ЖИЗНИ

¹Бухарова Е.В., ¹Долгих В.В., ¹Попкова С.М., ^{1,2}Ракова Е.Б., ¹Шабанова Н.М.,
¹Немченко У.М., ¹Иванова Е.И., ¹Сердюк Л.В.

¹ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск,
e-mail: buharowa.ekaterina@yandex.ru;

²ГБОУ ВПО Иркутский государственный медицинский университет МЗ РФ, Иркутск

В работе представлена микрoэкологическая характеристика аутоштаммов *Klebsiella* spp. в кишечной микрофлоре детей первого года жизни, а также результаты чувствительности к антибиотическим препаратам и к специфическим лечебным бактериофагам. Выделенные штаммы клебсиелл (n=100) характеризовались высоким уровнем чувствительности к антибиотикам и низкой чувствительностью к бактериофагам. Регистрация исследованных детерминант в ДНК аутоштаммов *Klebsiella* spp. (n=100) и *Staphylococcus aureus* (n=40), не относящихся к клиническим изолятам, свидетельствовала о циркуляции среди них факторов патогенности и, следовательно, о возможной этиологической роли в формировании дисбиотических процессов у детей раннего возраста.

Ключевые слова: *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, кишечная микрофлора, ассоциативный симбиоз, гены патогенности

PATHOGENIC POTENTIAL OF KLEBSIELLA SPP. AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN ASSOCIATIVE SYMBIOSIS IN CHILDREN FIRST YEAR OF LIFE

¹Bukharova E.V., ¹Dolgikh V.V., ¹Popkova S.M., ^{1,2}Rakova E.B., ¹Shabanova N.M.,
¹Nemchenko U.M., ¹Ivanova E.I., ¹Serdyuk L.V.

¹Research Center of family health and human reproduction problems, Irkutsk,
e-mail: buharowa.ekaterina@yandex.ru;

²Institute of Biomedical Technology Irkutsk state medical university, Irkutsk

Microecological characteristics *Klebsiella* spp. strains as well as the results of the antibiotic and specific therapeutic bacteriophages sensitivity in infants intestinal microbiota were presented. Isolated *Klebsiella* strains (n = 100) were characterized by a high antibiotic and low bacteriophages sensitivities. Investigated determinants detection in DNA of non-clinical isolates of *Klebsiella* spp. (n = 100) and *Staphylococcus aureus* (n = 40) indicated to the circulation of these pathogenicity factors and their possible role in the dysbiotic disorders in infants.

Keywords: *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, intestinal microbiota, associative symbiosis, pathogenicity genes

Дисбиотические нарушения в настоящее время широко распространены в России и за рубежом. Особенно часто встречается дисбиоз кишечника, от которого, по данным различных исследователей, в той или иной степени страдает до 90% населения страны [1]. Самым многочисленным как по видовому разнообразию, так и в количественном отношении является ассоциативный симбиоз микробных сообществ толстого кишечника [3]. 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 [2]. Микробиоценоз кишечника характеризуется неустойчивостью, связанной с микробной сукцессией при формировании микрофлоры, особенностями иммунной системы, неадекватным иммунным ответом организма на заселение кишечника УПМ [1; 3]. Од-

нако мало изученными остаются вопросы, связанные с распространенностью и взаимодействием генетических маркеров патогенности среди клебсиелл и стафилококков, персистирующих совместно в кишечном биотопе. Низкая эффективность эмпирического использования антибиотиков в сочетании с их побочным иммуносупрессивным эффектом приводит к подавлению нормальной микрофлоры кишечника и последующим формированием дисбиозов. Среди альтернативных антимикробных препаратов особый интерес представляют бактериофаги. В то время как антибиотики воздействуют на широкий спектр бактерий, в том числе и на нормальную микрофлору, бактериофаги обладают выраженной специфичностью [6].

Цель исследования. Оценить патогенный потенциал аутоштаммов *Klebsiella* spp. в ассоциации со *Staphylococcus aureus*, изолированных от детей первого года жизни с дисбиозами кишечника посредством де-

текции генетических детерминант патогенности.

Материалы и методы исследования

Были исследованы копрологические пробы 100 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) [8]. Исследуемая выборка была разделена на две группы: группа 1 – 60 детей, у которых аутоштаммы клебсиелл выделялись в монокультуре; группа 2 – 40 детей, у которых клебсиеллы вегетировали в ассоциации с золотистым стафилококком. Антибиотикорезистентность клебсиелл определяли диско-диффузионным методом [7]. Использовались антибиотические препараты (АБП) следующих групп: β -лактамы (амоксциллин, цефтазидим, ампициллин, цефотаксим), аминогликозиды (амикацин), хинолоны (норфлоксацин). Фагочувствительность определялась к коммерческим препаратам бактериофагов – «очищенному фагу клебсиелл пневмонии», «очищенному бактериофагу клебсиелл поливалентному» и «пиобактериофагу поливалентному» («Секстафаг») производства НПО «Микроген» г. Пермь. Тестирование проводилось согласно [4]. Бактериологический анализ содержимого толстой кишки производили согласно [8] и в соответствии с утвержденными методическими рекомендациями. Выделенные микроорганизмы идентифицировали общепринятыми методами [1]. Всего для ПЦР детекции факторов патогенности использовали 140 проб, где в группе 1 были типированы 60 проб с *Klebsiella* spp., а в группе 2 – по 40 проб *Klebsiella* spp. и *Staphylococcus aureus*. Для выделения ДНК бактерий из культуральной среды использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Типирование проводили с шестью парами праймеров [2], отобранных согласно рекомендациям [5; 9; 10].

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 [2]. Электрофорез ПЦР-фрагментов ДНК клебсиелл проводили с использованием 1,0%-го агарозного геля в 1% 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 [2] при его соответствии с длиной маркерного фрагмента. Исследования проводились в течение 2012–2014 гг. Для статистической обработки результатов использовали Excel из пакета MS Office 2003.

Результаты исследования и их обсуждение

В обследованной группе детей первого года жизни *Klebsiella* spp. была выделена в 60% случаев, в том числе в ассоциации с золотистым стафилококком – в 40%. Также был выявлен микрoэкологический дисбаланс, который характеризовался дефицитом бифидобактерий ($63,1 \pm 4,8$), лактобацилл ($6,8 \pm 2,5$), нормальной кишечной палочки ($11,7 \pm 3,2$) на фоне высокой плотности бактерий рода *Klebsiella* ($> 10^4$ КОЕ/г). В мазках 60% аутоштаммов клебсиелл имели плотную полисахаридную капсулу, которая способствовала усилению гидрофобности клеточной стенки и препятствует проникновению фагов и АБП в клетку. Клебсиеллы чаще встречались в ассоциациях с *Enterococcus* spp. ($78,6 \pm 4,1$), *Staphylococcus aureus* ($40,8 \pm 4,9$); реже – с *E. coli* со слабой ферментативной активностью ($26,2 \pm 4,4$), *Clostridium* spp. ($25,2 \pm 4,3$) и грибами рода *Candida* ($15,5 \pm 3,6$). Далее по частоте убывания регистрировались *E. coli* с гемолитической активностью ($13,6 \pm 3,4$), коагулазонегативные виды стафилококка ($4,9 \pm 2,2$), *Proteus* spp. ($3,0 \pm 1,7$), *Enterobacter* spp. ($2,0 \pm 1,4$), *Citrobacter freundii* ($2,0 \pm 1,4$).

Установлено, что исследуемые штаммы клебсиелл ($n=100$) были чувствительны практически ко всем тестируемым антибиотикам. Процент штаммов чувствительных к β -лактамам антибиотикам составлял $85 \pm 3,5\%$ (цефтазидим), $83 \pm 3,8\%$ (амоксциллин), $89 \pm 3,1\%$ (цефотаксим). Исключение составил ампициллин, к которому были резистентны $70 \pm 4,5\%$ штаммов. Полученные данные подтверждают факт природной устойчивости клебсиелл к ампициллину. Также был высок процент штаммов чувствительных к амикацину и норфлоксацину (по $92 \pm 2,7\%$ случаев соответственно).

Результаты чувствительности штаммов *Klebsiella* spp. ($n=156$) к коммерческим препаратам бактериофагов представлены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика чувствительности аутоштаммов *Klebsiella* spp к бактериофагам, (%)

Активность бактериофага	Бактериофаг поливалентный (n=50)	Бактериофаг клебсиелл пневмоний (n=50)	Бактериофаг Секста (n=56)
0-1х	$66,0 \pm 6,7$	$76,0 \pm 6,0$	$59,0 \pm 6,6$
2х	$24,0 \pm 6,0$	$16,0 \pm 5,1$	$39,2 \pm 6,5$
3-4х	$10,0 \pm 4,2$	$8,0 \pm 3,8$	$1,8 \pm 1,7$

Примечание. 0-1х – штамм нечувствителен; 2х – не более 50 отдельных негативных колоний; 3х – полусливной лизис со вторичным ростом; 4х – сливной лизис.

У аутоштаммов клебсиелл наблюдалась слабая чувствительность (0-1х) к бактериофагу поливалентному, фагу клебсиелл пневмоний и «Секстафагу» (66,0, 76,0 и 59,0% штаммов соответственно). Средний уровень чувствительности (2х) штаммов клебсиелл регистрировался в 24,0% случаев к бактериофагу поливалентному; в 40% случаев к бактериофагу «Секста», что более, чем в два раза превышало частоту встречаемости штаммов, чувствительных к фагу клебсиелл пневмоний (16,0% случаев). Высокий уровень чувствительности (3-4х) наблюдался у 10,0% штаммов *Klebsiella* spp. к бактериофагу поливалентному, у 8,0% штаммов к бактериофагу клебсиелл пневмоний, и всего лишь в 1,8% случаев к «Секстафагу». Таким образом, в целом региональные штаммы клебсиелл характеризовались низким уровнем чувствительности к специфическим лечебным бактериофагам, что могло быть одной из основных причин низкой эффективности терапии используемыми в настоящее время коммерческими бактериофагами.

Был произведён скрининг изолятов *Klebsiella* spp. на наличие нуклеотидных последовательностей генов, контролирующих синтез факторов патогенности *mag A*,

uge, *kfu*, *bfp*, *stx 1*, *stx 2* [2; 5; 9; 10]. В аутоштаммах клебсиелл обеих групп частота встречаемости гена *uge*, кодирующего уридин-дифосфат-галактозо-4-эпимеразу и оказывающего существенное влияние на вирулентность, регистрировалась в 28,3% и 22,5% случаев соответственно. Также этот ген был обнаружен у стафилококка в ассоциации с *Klebsiella* spp. в 12,5% случаев. Ген *kfu*, кодирующий систему поглощения железа, не был зарегистрирован у штаммов клебсиелл 1 группы, в то время как у аутоштаммов клебсиелл, вегетирующих совместно с золотистым стафилококком (группа 2) – выявлялся с одинаковой частотой как у клебсиелл, так и у золотистого стафилококка (2,5% случаев соответственно). Ген *bfp*, кодирующий связывание пилей, был выявлен не только у клебсиелл обеих групп (6,7 и 2,5% случаев соответственно), но и у *S. aureus* в 15% случаев, что говорит о высоком адгезивном потенциале ассоциации клебсиелл и золотистого стафилококка. У детей второй группы в 15% случаев был выявлен ген *stx 1*, что почти в три раза меньше чем у образцов клебсиелл в монокультуре (6,7%). Ген *stx 2* был обнаружен только в 3,3% случаев у образцов клебсиелл в монокультуре (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика изолятов *Klebsiella* spp. по признаку детекции генов патогенности

Гены патогенности	1 Группа	2 Группа	
	Клебсиелла в монокультуре (n=60)	Клебсиелла в ассоциации с <i>S.aureus</i> (n=40)	<i>S.aureus</i> (n=40)
<i>mag A</i>	0	0	0
<i>uge</i>	17/28,3±5,8	9/22,5±6,6	5/12,5±5,2
<i>kfu</i>	0	1/2,5±2,5	1/2,5±2,5
<i>bfp</i>	4/6,7±3,2	1/2,5±2,5	6/15,0±5,6
<i>stx 1</i>	4/6,7±3,2	6/15±5,6	0
<i>stx 2</i>	2/3,3±2,3	0	0

Примечание. Количество изолятов / частота встречаемости, (%).

Ген *mag A* у клебсиелл был обнаружен только в сочетании с геном *uge* (2,5%) второй группы детей, что свидетельствовало о редкой встречаемости штаммов способных продуцировать слизистую субстанцию повышенной вязкости. Сочетания генов *uge+kfu* регистрировались примерно на одном уровне в обеих группах (8,3% и 12,5% случаев соответственно). Сочетания генов *uge+bfp* были выявлены в образцах клеб-

сиелл как в монокультуре (16,7%), так и в образцах клебсиелл в ассоциации (10,0%). Также данное сочетание генов патогенности было выявлено в 5,0% случаев у золотистого стафилококка. Сочетание генов *uge+stx 1* были зарегистрированы только в образцах клебсиелл обеих групп почти с одинаковой частотой (11,7 и 12,5%), также как и сочетание генов *bfp+stx 1* (1,7 и 2,5% случаев соответственно) (табл. 3).

Таблица 3

Парные сочетания генов патогенности, %

Двойные сочетания генов	Группа 1	Группа 2	
	Клебсиелла в монокультуре (n=60)	Клебсиелла в ассоциации с золотистым стафилококком (n=40)	Золотистый стафилококк (n=40)
mag A+uge	0	1/2,5±2,4	0
uge+kfu	5/8,3±3,6	5/12,5±5,2	0
uge+bfp	10/16,7±4,8	4/10,0±4,7	2/5,0±3,4
uge+stx 1	7/11,7±4,1	5/12,5±5,2	0
bfp+stx 1	1/1,7±1,6	1/2,5±2,4	0

Примечание. Количество изолятов / частота встречаемости, (%).

Сочетания трех и более генов патогенности встречались достаточно часто, и в основном, в образцах клебсиелл в монокультуре (табл. 4).

Таблица 4

Сочетания трех и более генов патогенности, %

Тройные сочетания генов	Группа 1	Группа 2	
	Клебсиелла в монокультуре (n=60)	Клебсиелла в ассоциации с золотистым стафилококком (n=40)	Золотистый стафилококк (n=40)
uge+kfu+stx 1	2/3,3±2,3	3/7,5±4,1	0
uge+bfp+stx 1	0	1/2,5±2,4	0
bfp+stx 1+stx 2	1/1,7±1,6	0	0
uge+kfu+bfp	2/3,3±2,3	0	0
uge+kfu+bfp+stx 1	1/1,7±1,6	0	0

Примечание. Количество изолятов / частота встречаемости, (%).

Наиболее часто у клебсиелл, вегетирующих в составе исследуемых ассоциаций, регистрировалось сочетание генов *uge+kfu+stx 1* (7,5%). У образцов клебсиелл первой группы были выявлены сочетания четырех генов патогенности *uge+kfu+bfp+stx 1* (1,7%).

Заключение

У детей первого года жизни, в кишечном биотопе которых регистрировалась высокая популяционная плотность клебсиелл, вегетировали штаммы с наличием генов патогенности. Исследуемые аутоштаммы клебсиелл (n=100) были чувствительны практически ко всем тестируемым антибиотикам разных групп. Региональные штаммы клебсиелл характеризовались низким уровнем чувствительности к специфическим лечебным бактериофагам, что может быть одной из основных причин низкой эффективности терапии используемыми в настоящее время коммерческими бактериофагами.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что среди штаммов клебсиелл, не являющихся клиниче-

скими, 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 *S. aureus* различной степени вирулентности показало увеличение частоты встречаемости искомым ампликонов. Следовательно, в результате взаимоадаптации микросимбионтов происходило увеличение численности особей, в генотипе которых локализованы *uge, kfu, mag A, bfp, stx 1, stx 2* гены и их сочетания, что явилось свидетельством их взаимного влияния на способность реализации патогенного потенциала в условиях ассоциативного симбиоза. А взаимовлияние ассоциативных симбионтов приводит к селекции и накоплению вирулентных вариантов в бактериальной популяции, которые могут быть этиологически ассоциированными с заболеваниями кишечного тракта.

Решение вопроса о роли клебсиелл с набором генов патогенности, а также их

ассоциаций с золотистым стафилококком, с высокой частотой встречающихся в кишечнике детей первого года жизни, требует пристального внимания учёных и клиницистов и необходимости дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. – М.: ГЭОТАР-медиа, 2007. – С. 18-27.
2. Бухарова Е.В. Детекция некоторых генетических маркеров факторов патогенности в аутоштаммах *Klebsiella* spp. у детей первого года жизни / Е.В. Бухарова, С.М. Попкова, Е.Б. Ракова, Ю.П. Джиоев, Е.И. Иванова, Н.М. Шабанова, У.М. Немченко // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2014. – № 2 (96). – С. 58–62.
3. Бухарин О.В. Инфекция – модельная система ассоциативного симбиоза // Журнал микробиологии. – 2009. – № 1. – С. 83–86.
4. Голубева И.В. Энтеробактерии: Руководство для врачей – М.: Медицина, 1985. – С. 241-303.
5. Иванова Е.И. Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, уштаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей / Е.И. Иванова, С.М. Попкова, Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 2(90), Ч. 2. – С. 111–114.
6. Красильников И.В. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И. В. Красильников, К.А. Лыско, Е.В. Отрашевская, А.К. Лобастова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26. – № 2 (2). – С. 33–37.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04.
8. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» / ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ № 231 от 09.06.2003. – 70 с.
9. 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 Journal of Veterinary Medicine. – 2012. – Vol. 67, № 4. – P. 249–252.
10. Regue M., Hita B., Pique A. Gene uge is essential for *K. pneumoniae* virulence // Infect. Immun. – 2004. – P. 54–61.