

ВЛИЯНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК *ESCHERICHIA COLI* НА ИХ АНТАГОНИСТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРИ ОПИСТОРХОЗНОЙ ИНВАЗИИ



Л.В. Катаева, Н.Ф. Карпухина, А.А. Вакарина, О.Н. Колотова, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова

ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Тюмень, Россия

Резюме. *Введение.* Инвазия *Opisthorchis felineus* в организме человека вызывает воспалительные и дискинетические нарушения желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся изменениями фенотипических особенностей микробиоты толстой кишки. Цель исследования — изучение влияния фенотипических характеристик изолятов *Escherichia coli* в отношении бактерий *Klebsiella* spp., выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз», на их антагонистическую активность. *Материалы и методы.* Изучены фенотипические свойства 54 изолятов *E. coli* и 8 — бактерий рода *Klebsiella*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз». Идентификация изолятов, анализ протеомных профилей выполнен с использованием программного обеспечения Maldi BioTyper 3.0. Проведено 204 исследования антагонистической активности изолятов *E. coli* с различными свойствами в отношении *Klebsiella* spp. методом совместного культивирования. Изоляты *E. coli* и *Klebsiella* spp. изучены методом полногеномного секвенирования. *Результаты.* Бактерии *E. coli* с типичными фенотипическими характеристиками проявляли достоверно более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp. Установлен статистически достоверно более высокий уровень антагонистической активности в отношении бактерий *K. oxytoca*, чем при взаимодействии со штаммами *K. pneumoniae*. Протеомные профили штаммов разделились на кластеры в зависимости от уровня антагонистической активности. Молекулярное серотипирование *E. coli* по O- и H-антигенам в 60,0% случаев выявило гены энтеротоксигенных, энтероинвазивных и внекишечных патогенов. Определены штаммы, обладающие максимально высокими показателями индекса антагонистической активности, являющиеся носителями генов энтеротоксигенных *E. coli* сиквенс-серотипов Об:Н1 и Об:Н5. Геном этих штаммов включал наибольшее количество комплексов генов вирулентности: адгезинов, инвазинов, токсинов, бактериоцинов. Мультилокусное сиквенс-типирование и сиквенс-серотипирование штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* установило их гетерогенность, изоляты *K. oxytoca* определены как ST242 и ST176. Для всех штаммов была характерна гомология маркеров антибиотикорезистентности (*oqxA*, *oqxB*, *fosA*) и разнообразие вариантов генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам. *Заключение.* Установлено, что изоляты *E. coli*, обладающие типичными фенотипическими характеристиками и являющиеся носителями комплексов генов вирулентности, проявляли достоверно более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp., изолированных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз».

Ключевые слова: антагонистическая активность, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, протеинограммы, молекулярное серотипирование, сиквенс-типы, комплексы генов вирулентности, маркеры резистентности.

Адрес для переписки:

Катаева Любовь Владимировна
625026, Россия, г. Тюмень, ул. Республики, 147,
ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 909 740-50-74.
E-mail: KataevaLV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Contacts:

Lyubov V. Kataeva
625026, Russian Federation, Tyumen, Republic str., 147,
Tyumen Region Infection Pathology Research Institute.
Phone: +7 909 740-50-74.
E-mail: KataevaLV@Tniikip.rosпотребнадzor.ru

Для цитирования:

Катаева Л.В., Карпухина Н.Ф., Вакарина А.А., Колотова О.Н.,
Степанова Т.Ф., Степанова К.Б. Влияние фенотипических
характеристик *Escherichia coli* на их антагонистическую активность
при описторхозной инвазии // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 6.
С. 1049–1057. doi: 10.15789/2220-7619-ECP-13303

Citation:

Kataeva L.V., Karpukhina N.F., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Stepanova T.F.,
Stepanova K.B. *Escherichia coli* phenotypic characteristics and antagonistic
activity in opisthorchiasis invasion // Russian Journal of Infection and
Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 6, pp. 1049–1057.
doi: 10.15789/2220-7619-ECP-13303

ESCHERICHIA COLI PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND ANTAGONISTIC ACTIVITY IN OPISTHORCHIASIS INVASION

Kataeva L.V., Karpukhina N.F., Vakarina A.A., Kolotova O.N., Stepanova T.F., Stepanova K.B.

Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation

Abstract. *Opisthorchis felineus* invasion in human causes inflammatory and dyskinetic disorders of the gastrointestinal tract accompanied by altered phenotypic characteristics in colon microbiota. The aim of research — study an impact of the *Escherichia coli* isolate phenotypic characteristics on *Klebsiella* spp. bacteria, isolated from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis as well as *E. coli* antagonistic activity. **Materials and methods.** The phenotypic properties of 54 *E. coli* isolates and 8 genus *Klebsiella* isolates obtained from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis were assessed. Identification of isolates and analysis of proteomic profiles were performed using Maldi BioTyper 3.0 software. 204 co-cultivation datasets were analyzed investigating antagonistic activity of *E. coli* isolates with varying properties on *Klebsiella* spp. *E. coli* and *Klebsiella* spp. isolates were examined by whole genome sequencing. **Results.** *E. coli* bacteria with typical phenotypic characteristics showed significantly more prominent antagonistic activity against *Klebsiella* spp. A significantly higher level of antagonistic activity against *K. oxytoca* bacteria vs *K. pneumoniae* strains. The proteomic bacterial strain profiles were divided into clusters depending on the level of antagonistic activity. *E. coli* molecular serotyping for O- and H-antigens revealed the genes of enterotoxigenic, enteroinvasive and extraintestinal pathogens in 60.0% of cases. Strains with the highest antagonistic activity index, which are carriers of the genes typical to enterotoxigenic *E. coli* sequence serotypes O6:H1 and O6:H5, were identified. The genome of such strains consisted of the largest number of virulence gene complexes: adhesins, invasins, toxins, bacteriocins. Multilocus sequence typing and sequence serotyping of *E. coli* and *K. pneumoniae* strains established their heterogeneity; *K. oxytoca* isolates were identified as ST242 and ST176. All strains were characterized by homology of antibiotic resistance markers (*oqxA*, *oqxB*, *fosA*) and a variety of beta-lactam resistance gene variants. **Conclusion.** It was found that *E. coli* isolates with typical phenotypic characteristics and carriers of virulence gene complexes exhibited significantly more pronounced antagonistic activity against *Klebsiella* spp. isolated from colonic contents of patients with diagnosed opisthorchiasis.

Key words: antagonistic activity, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, proteinograms, molecular serotyping, sequence types, virulence gene complexes, resistance markers.

Введение

Кишечная микробиота — одна из основных гомеостатических систем организма, дисбаланс которой становится причиной многих соматических и инфекционных заболеваний. Паразитирование гельминтов в организме хозяина, вызывает патологические изменения тканей и органов, усугубляя нарушение микробиоценоза [15]. Описторхоз, относящийся к группе биогельминтозов, наносит немалый ущерб здоровью населения. Течение болезни при данной нозологии нередко сопровождается хронизацией процесса и необратимыми осложнениями [3].

Различные виды и биотопы микроорганизмов находятся в состоянии топической и пищевой конкуренции, обеспечивающей образование синтрофных связей, обмен генетическим материалом, формирование консорциумов, реализующиеся в механизме антагонизма [2]. Феномен оппозитного влияния микросимбионтов на их биологические свойства (антагонистический, антилизоцимный, персистентный потенциал и биопленкообразование) позволяет реализовать распознавание чужеродных патогенов в микробиоте [4]. В частности, жизнедеятельность гельминта *O. felineus* в организме «хозяина» оказывает системное влияние на микробиоту желчевыводящих путей ки-

шечного биотопа, приводящее к изменению ее вирулентных свойств и нарушению барьерной функции [15]. Паразитарные инвазии способствуют нарушению симбиотических и синергических взаимоотношений бактерий в макроорганизме, обеспечивая трансформацию таксономического состава микробиоты, изменение факторов и механизмов микробной регуляции. Активация антагонистических свойств культуры осуществляется при условии улучшения ее метаболических и ростовых характеристик. Ингибирование антагонистической активности бактерий — представителей нормобиоты связано с подавлением их антимикробных факторов и функциональных свойств патогенами, а также с негативным действием на активность генов, экспрессирующих продукты обмена [12].

Постоянный представитель кишечной микробиоты млекопитающих *E. coli*, преимущественно не проявляет патогенной активности, однако в последнее время отмечается ее способность к продукции токсинов [6]. Установлено, что при описторхозной инвазии в составе кишечной микробиоты человека выявляются *E. coli*, в геноме которых обнаруживаются маркеры патогенных *E. coli* — носителей кластеров O-антигенов и H-антигенов, ассоциированных с вирулентностью. Обмен мобильными генетическими элементами ведет к появлению новых вариантов *E. coli*, обладающих генами,

кодирующими различные факторы патогенности [15], провоцируя аномальные воспалительные реакции, различные дегенеративные и злокачественные эффекты в пораженном органе.

Некоторые комменсальные штаммы бактерий могут контролировать рост патогенных бактерий, однако при инвазии *O. felinus* количество их бактериальных клеток снижается и приводит к изменению микробиоты кишечника, что показано на экспериментальной модели (инвазированные хомяки) [20].

Одним из основных микробных патогенов при описторхозной инвазии являются бактерии рода *Klebsiella* spp. (в $19,6 \pm 7,4\%$ случаев) [15]. Классический тип *K. pneumoniae* чаще вызывает инфекции у ослабленных реанимационных пациентов, в то время как гипервирулентные штаммы с гипермукоидным фенотипом вызывают тяжелые инфекции у ранее здоровых пациентов [10]. *K. oxytoca* также вызывает нозокомиальные и внебольничные инфекции, может быть причиной тяжелого геморрагического колита [8].

Таким образом, изучение функционирования микропаразитоценоза при инфекционно-инвазионном процессе представляется актуальной проблемой, в том числе с позиций молекулярно-генетических исследований. Чрезвычайно важно изыскание новых подходов для профилактики инфекций и дальнейших исследований по снижению риска осложнений воспалительного характера после дегельминтизации.

Цель исследования — определить антагонистическую активность изолятов *E. coli* в отношении бактерий *Klebsiella* spp., выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз».

Материалы и методы

Изучены фенотипические свойства 54 изолятов *E. coli* и 8 — бактерий рода *Klebsiella* (3 — *K. oxytoca*; 5 — *K. pneumoniae*), выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз». Штаммы *E. coli* разделены по биохимическим свойствам на группы: ферментирующие/не ферментирующие лактозу (Lac+/Lac–); обладающие/не обладающие гемолитической активностью (Gem+/Gem–); подвижные/неподвижные (подв./подв.–). Микробиологические исследования проводились классическим бактериологическим методом. Видовую идентификацию бактерий подтверждали методом масс-спектрометрии с использованием программного обеспечения *Maldi BioTyper 3.0*. Уровень идентификации изолятов выше 2.0 свидетельствовал о высокой достоверности. Пакет прикладных программ позволил изучить протеомный профиль всех исследован-

ных штаммов, свидетельствующий о гомологии их белковых спектров и выражающийся коэффициентом корреляции.

Проведено 204 исследования антагонистической активности изолятов *E. coli* с различными свойствами в отношении бактерий *Klebsiella* spp. Определение АА бактерий проводили по методике совместного культивирования в жидкой питательной среде. Для этого суточную агаровую культуру смывали стерильным физиологическим раствором и готовили суспензию, содержащую 500 млн микробных клеток в 1 мл. В 5,0 мл мясо-пептонного бульона (МПБ) с pH 7,2–7,4 вносили 1,0 мл взвеси *E. coli* и 0,1 мл — *Klebsiella* spp. Суспензию инкубировали при 37°C и через 24, 48 и 72 ч из бульонных культур готовили ряд последовательных десятикратных разведений. Из разведений 10^{-5} и 10^{-6} производили высевы по 0,1 мл, в двойной повторности на чашки Петри со средой Левина. Посевы выдерживали в термостате при 37°C 18–20 ч, после чего подсчитывали число выросших колоний *E. coli* и *Klebsiella* spp. на каждой чашке отдельно. Значение индекса антагонистической активности (ИАА) вычисляли по формуле (%):

$$\text{ИАА} = \frac{K}{K + \Phi} \times 100,$$

где *K* — число колоний *E. coli*; Φ — число колоний *Klebsiella* spp. (объекта антагонизма), выросших на плотной питательной среде при высевах из МПБ после сокультивирования.

Все штаммы *E. coli* по выраженности АА были разделены на три группы. В группу с низкой АА были отнесены штаммы с показателем ≤ 29 ; штаммы с показателем от 30 до 70 составили среднюю группу; штаммы, которые имели ИАА более 70, характеризовали как обладающие высокой АА.

Определение и оценка чувствительности к антибиотикам изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp. осуществлялись по минимальной подавляющей концентрации (МПК) в автоматическом режиме (Sensititre Aris 2x).

Штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* изучены методом полногеномного секвенирования. Полученные единичные прочтения для каждого штамма были собраны в контиги при помощи программы *Unicycler v.0.4.7*. Образцы с величиной средних покрытий геномов выше 200 свидетельствовали о достаточном объеме данных. Обработка результатов полногеномного секвенирования проводилась с помощью программного обеспечения анализа метагеномных образцов *Kraken Metagenomics version 2* (классификатор родов — коротких нуклеотидных последовательностей). Филогенетические исследования осуществляли в программе *Wombac 2.0*, которая позволяла находить коровые SNP в нуклеотидных

последовательностях и производить выравнивание этих полиморфизмов. Для определения О-антигенов и капсульных антигенов штаммов *K. pneumoniae* использовали сервер Kaptive. Определение сиквенс типов осуществляли с использованием сервера MLST 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST>), а также программой Lasergene.

Статистическая обработка полученных данных и визуализация результатов были проведены в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Для анализа применялись методы статистической обработки с применением программы SPSS, версия 22. Номинальные данные описывались с указанием абсолютных значений, процентных долей и доверительных интервалов (95% ДИ) — метод Клоппера–Пирсона. Анализ статистической значимости различий ИАА проведен с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и таблиц сопряженности по критерию хи-квадрат Пирсона (χ^2). Различия полученных значений считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Фенотипические исследования изолятов *E. coli*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом описторхоз показали, что в их структуре преобладали лактозопозитивные, не обладающие гемолитической активностью и подвижные штаммы (рис. 1). Изоляты *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*, идентифицированные в этой же группе пациентов, характеризовались проявлением типичных для этих видов свойств. При исследовании изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp.

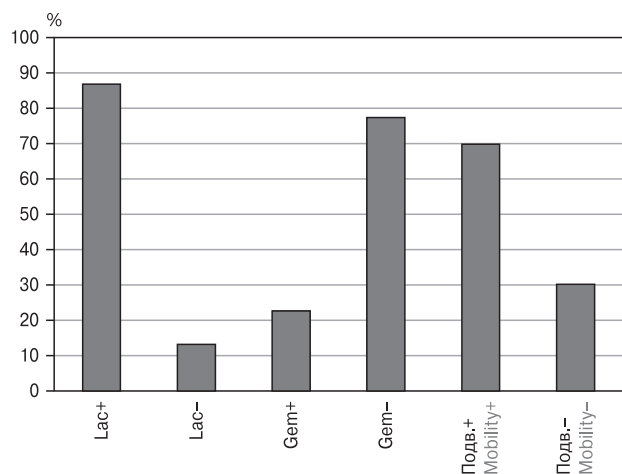


Рисунок 1. Структура изолятов *E. coli*, выделенных из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз», по фенотипическим характеристикам, %

Figure 1. The pattern of *E. coli* isolates obtained from large intestine contents of patients with diagnosed opisthorchiasis based on phenotypic characteristics, %

на чувствительность к антибиотикам установлено, что все они были чувствительны к цефалоспорином, карбапенемам, защищенным пенициллинам, хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу и аминогликозидам.

Изучение антагонистической активности изолятов *E. coli* в отношении бактерий рода *Klebsiella* выявило повышение ИАА с 33,7% (95% ДИ: 17,5–28,5) в первые сутки совместного культивирования бактерий до 54,1% (95% ДИ: 17,5–28,5) к 3-м суткам. Средний показатель ИАА составил 45,4% (95% ДИ: 17,5–28,5). Увеличение значений индекса АА штаммов *E. coli* не зависело от их фенотипических свойств за весь период наблюдения (рис. 2). Вместе с тем сравнительный анализ показателей ИАА штаммов *E. coli* в группах, ферментирующих лактозу и обладающих подвижностью, в 1,3 раза выше при сравнении с аналогичными показателями изолятов с противоположными свойствами на вторые сутки наблюдения. Статистически значимые более высокие показатели ИАА установлены на вторые и третьи сутки наблюдения только по подвижности штаммов (непараметрический критерий Манна–Уитни, $p = 0,002$ и $p = 0,001$ соответственно).

В структуре всех штаммов на долю *E. coli*, обладающих низкой антагонистической активностью (ИАА ≤ 20), пришлось 22,2% (95% ДИ: 12,04–35,6), с высокой антагонистической активностью (ИАА > 70) — 48,1% (95% ДИ: 34,34–62,16).

Таким образом, все штаммы *E. coli* с типичными фенотипическими характеристиками

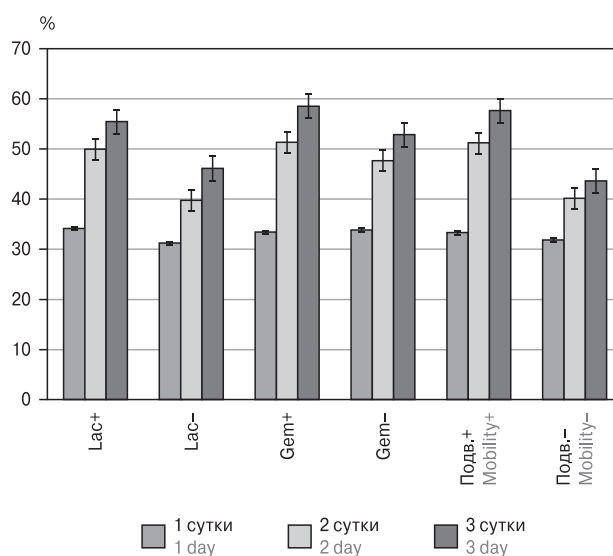


Рисунок 2. Сравнительная характеристика ИАА изолятов *E. coli*, отличающихся по фенотипическим свойствам, в динамике по суткам, %

Figure 2. Comparative characteristics of IAA of *E. coli* isolates differing in phenotypic properties, daily dynamics, %

(Lac+, Gem–, подв.+), проявляли более выраженную антагонистическую активность в отношении *Klebsiella* spp. при сравнении с ИАА штаммов, проявляющих противоположные признаки. Данные подтверждены статистическим анализом с применением непараметрического критерия Манна–Уитни, $p = 0,027$.

Все штаммы *E. coli*, исследованные на антагонистическую активность, и *Klebsiella* spp. подвергли протеомному анализу. Сравнение белковых спектров штаммов *E. coli*, обладающих низкой антагонистической активностью, выявило два кластера (рис. 3А). Коэффициент корреляции протеинограмм бактерий первого и второго кластера составил 0,80, что свидетельствует о значительной схожести этих штаммов.

Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих высокой антагонистической активностью, различались по степени филогенетического родства и распределились на 4 кластера (рис. 3Б). Анализ протеинограмм установил гетерогенность белковых профилей этой группы *E. coli*, что подтверждается умеренным показателем коэффициента корреляции — 0,65. Четвертый кластер представлен максимальным количеством штаммов (15), которые по фенотипическим свойствам отличались незначительно, коэффициент корреляции их протеинограмм составил 0,7. Генетически сходные штаммы (большая их часть) разлагали лактозу, были подвижными и не обладали гемолитической активностью.

Анализ спектральных профилей штаммов *Klebsiella* spp. показал разделение их по видам: *K. oxytoca* и *K. pneumoniae*. Изоляты *E. coli* проявляли высокую АА в отношении бактерий

K. oxytoca значительно чаще, чем при взаимодействии со штаммами *K. pneumoniae*, различия статистически достоверные ($\chi^2 = 7,113$; $p = 0,008$).

Изоляты *E. coli* (13), обладающие высоким уровнем АА, были изучены молекулярно-генетическими методами. Молекулярное серотипирование по О- и Н-антигенам в 60% случаев выявило наличие генов энтеротоксигенных (O6:H1, O6:H5, O6:H31, O8:H30, O25:H4), энтероинвазивных (O144:H45) и внекишечных патогенных (O1:H7, O2:H6) *E. coli*. Мультилокусное сиквенс-типирование по семи локусам (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) этих штаммов установило, что только два штамма относились к сиквенс-типу ST10 одного клонального комплекса; у 5 штаммов принадлежность к клональному комплексу не определялась. Таким образом, по сиквенс-типам штаммы характеризовались гетерогенностью.

Результаты полногеномного секвенирования штаммов *E. coli*, изолированных от пациентов с описторхозной инвазией, свидетельствовали о наличии у них 25 комплексов генов, ассоциированных с вирулентностью: адгезинов — *pic*, *sfaS*, *iha*, *lpfA*; инвазинов — *mchF*, *iroN*, *ireA*; токсинов — *astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*, *senB*, *eilA*, *sigA*; бактериоцинов — *mchB*, *mchC*, *mcmA*, *cba*, *cma*, *selB*. Практически у всех штаммов (80%) обнаружен ген increased serum survival (*iss*) — ген повышенной выживаемости в сыворотке крови, а также ген glutamate decarboxylase (*gad*) — фермент, катализирующий процесс декарбоксилирования в микробной клетке. Два штамма, обладающие максимально высоким показателем ИАА, являлись носителями наибольшего ко-

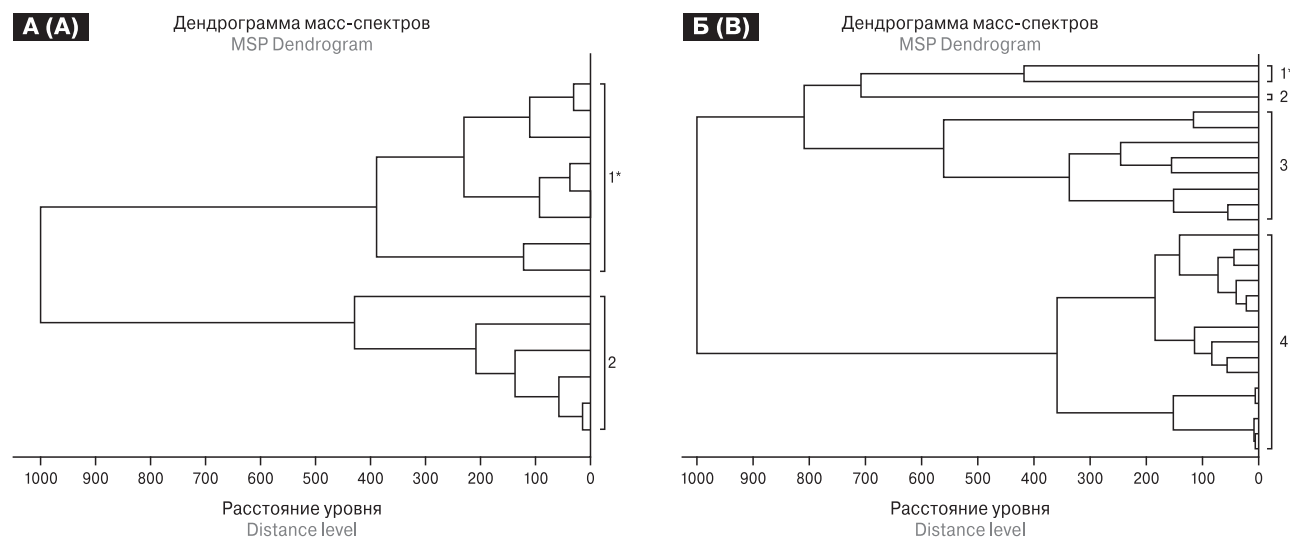


Рисунок 3. Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих низким показателем ИАА ≤ 20 (А) и высоким — ИАА > 70 (Б)

Figure 3. Dendrograms of *E. coli* strains with low IAA ≤ 20 (A) and high — IAA > 70 (B)

Примечание. *Цифрами обозначены отдельные кластеры *E. coli*.

Note. *Numbers indicate separate *E. coli* clusters.

личества комплексов генов вирулентности (48% и 36%): адгезинов (*pic*, *sfaS*, *iha*); инвазинов (*mchF*, *iroN*); токсинов (*astA*, *crf1*, *vat*, *sat*) и бактериоцинов (*mchB*, *mchC*, *mcmA*), и относились к энтеротоксигенным *E. coli* сиквенс-серотипам O6:H1 и O6:H5.

Сиквенс-серотипирование штаммов *K. pneumoniae*, выявило отличие их по O- и капсульному (KL) антигенам: KL2:O1v2; KL1:O1v2; KL47:O1v1; KL139:O1v1; KL125:O5. Мультилокусное сиквенс-типирование (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) установило принадлежность к разным сиквенс типам. Для всех штаммов была характерна гомология маркеров антибиотикорезистентности *oqxA*, *oqxB* (chloramphenicol, benzylkonium chloride, cetylpyridinium chloride, nalidixic acid, ciprofloxacin, trimethoprim) и *fosA* (fosfomycin) и разнообразие вариантов генов резистентности к бета-лактамам антибиотикам.

Сиквенс-типы бактерий *K. oxytoca* определены как ST242 (два штамма) и ST176. По маркерам резистентности к различным группам антимикробных препаратов один штамм в геноме имел максимальный набор (*oqxA*, *oqxB*, *qnrB1*, *fosA*, *fosA3*, *rmtB*, *dfrA14*, *tet(A)*, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{SHV-106}, *bla*_{TEM-214}, *bla*_{TEM-209}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{TEM-206}, *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{TEM-141}); у двух других выявлены гены только группы *bla*_{OXY-2-5}, *bla*_{OXY-5-1}, *bla*_{OXY-5-2}.

Таким образом, изоляты *E. coli*, выделенные из содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом «Описторхоз» показали, что в их структуре преобладали культуры ферментирующие лактозу, обладающие подвижностью и не проявляющие гемолитическую активность. Установлено, что изоляты этой группы проявляли высокую антагонистическую активность в отношении бактерий рода *Klebsiella* и характеризовались носительством генов сиквенс-серотипов по O- и H-антигенам энтеротоксигенных, энтероинвазивных и внекишечных патогенных *E. coli*. Кроме того, они являлись носителями генов, ассоциированных с вирулентностью.

Обсуждение

Микробиота играет существенную роль в жизнедеятельности организма. Одна из основных ее функций — формирование барьера колонизационной резистентности, предотвращающая контаминацию слизистых оболочек патогенами путем проявления антагонистической активности автохтонной микробиоты [7, 14]. Иммунологический статус макроорганизма обеспечивает оптимальные для конкретных ситуаций симбиотические и антагонистические отношения микроорганизмов, способствующие формированию новых фенотипических и генотипических свойств [9]. Так называемый «микробный орган» характеризуется феноти-

пической гетерогенностью, генетической разнородностью и сложными скоординированными связями. Факторы, определяющие структуру микробных сообществ и их антагонистические взаимодействия в кишечнике, еще мало изучены [1, 16].

Типичными представителями микробиоты млекопитающих являются *E. coli*, характеризующиеся широким спектром ферментативной активности, подвижности, биоопленкообразования, участием в горизонтальном переносе генетической информации [5]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что изоляты *E. coli*, выделенные из фекалий пациентов с диагнозом «Описторхоз» обладали преимущественно типичными фенотипическими свойствами, но при этом являлись носителями комплексов генов вирулентности. Почти половина изученных нами изолятов обладали генами, ответственными за продукцию бактериоцинов. Известно, что гены системы продукции бактериоцинов, являются важными факторами колонизационной резистентности кишечника и связаны с их пробиотическими свойствами [14]. Антимикробная активность бактериоцинов, обуславливающая антагонизм между бактериями, направлена не только на штаммы филогенетически родственных видов бактерий, но и других видов и родов. Решение проблемы резистентности к антибиотикам бактерий инициирует интерес к естественным альтернативам — колицинам и микроцинам, продуцируемым *E. coli* [18, 19]. В 80% случаев штаммы *E. coli*, изолированные от пациентов с описторхозной инвазией, являлись носителями гена *glutamate decarboxylase (gad)* — фермента, катализирующего необратимое декарбоксилирование L-глутаминовой кислоты, участвующей в выполнении различных физиологических функций [21, 22].

В кишечной микробиоте человека при описторхозной инвазии наиболее часто встречаются бактерии *K. pneumoniae*, которые могут быть представлены как комменсальными, так и высокопатогенными штаммами с гипермукоидным фенотипом. Генетические детерминанты патогенного потенциала этих штаммов (гены вирулентности, связанные с адгезией и мукоидным фенотипом) значительно чаще выявляются при воспалительных заболеваниях кишечника [11]. Наибольшую опасность представляют случаи, связанные с гипервирулентными штаммами, способными одновременно продуцировать и бета-лактамазы расширенного спектра действия. Сочетание вирулентности и множественной лекарственной резистентности представляет высокий риск развития бактериальной инфекции [13, 17]. Результаты проведенных исследований изолятов *K. pneumoniae*

выявили наличие в их геномах факторов вирулентности — капсульных антигенов. Несмотря на это, некоторые штаммы *E. coli*, обладающие антагонистической активностью, подавляли рост вирулентных штаммов *K. pneumoniae*.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что антагонистическая активность штаммов *E. coli* с типичными фенотипическими признаками является одним из важных факторов колонизационной резистентности биотопа организма человека от патогенов при инфекционном заболевании. Установлено, что геномы типичных представителей нормобиоты кишечника (*E. coli*) при описторхозной инвазии содержат комплексы генов вирулентности и патогенности. Возможно, эти характеристики обеспе-

чивают высокий уровень их антагонистической активности в отношении *Klebsiella spp.*

Результаты исследований позволили определить штаммы, отличающиеся выраженными антагонистическими свойствами, и депонировать их в государственной коллекции. Нуклеотидные последовательности редких штаммов размещены в GenBank NCBI. Результаты исследования генома штаммов *E. coli* положены в основу изобретения, получен патент РФ № 2756794 «Штамм нового генотипа *Escherichia coli* 1654-1 для молекулярно-генетического типирования бактерий рода *Escherichia*».

Понимание молекулярно-биологических особенностей на уровне фенотипических свойств отдельных изолятов даст возможность прогнозирования колонизационной резистентности биотопа и управления инфекционно-инвазионным процессом.

Список литературы/References

1. Андрюков Б.Г., Тимченко Н.Ф., Ляпун И.Н., Бынина М.П., Матосова Е.В. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021. Т. 98, № 1. С. 73–83. [Andryukov B.G., Timchenko N.F., Lyapun I.N., Bynina M.P., Matosova E.V. Heterogeneity in isogenic bacteria populations and modern technologies of cell phenotyping. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2021, vol. 98, no. 1, pp. 73–83. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-33
2. Афонюшкин В.Н., Донченко Н.А., Козлова Ю.Н., Давыдова Н.В., Коптев В.Ю., Черепушкина В.С. Роль биопленок в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды на примере *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы) // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99, № 4. С. 379–383. [Afonyushkin V.N., Donchenko N.A., Kozlova J.N., Davidova N.A., Koptev V.Yu., Cherepushkina V.S. Questions on the role of biofilms for the adaptation of microorganisms to unfavorable environmental factors by the example of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gigiya i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2020, vol. 99, no. 4, pp. 379–383. (In Russ.)] doi: 10.47470/0016-9900-2020-99-4-379-383
3. Бибик О.И. Описторхоз — актуальная проблема здравоохранения (обзор и анализ проблемы) // Российский паразитологический журнал. 2020. Т. 14, № 4. С. 38–49. [Bibik O.I. Opisthorchosis is a topical health problem (problem overview and analysis). *Rossiiskii parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*, 2020, vol. 14, no. 4, pp. 38–49. (In Russ.)] doi: 10.31016/1998-8435-2020-14-4-38-49
4. Бухарин О.В., Перунова Н.Б. Роль микробиоты в регуляции гомеостаза организма человека при инфекции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. Т. 97, № 5. С. 458–467. [Bukharin O.V., Perunova N.B. The role of microbiota in the regulation of homeostasis in the human body during infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 5, pp. 458–467. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-8
5. Годовалова А.П., Ожгибесов Г.П., Никулина Е.А. Особенности штаммов *Escherichia coli*, выделенных при воспалительных заболеваниях // Вестник современной клинической медицины. 2019. Т. 12, № 4. С. 7–10. [Godovalov A.P., Ozhgibesov G.P., Nikulina E.A. The properties of *Escherichia coli* strains isolated in human inflammatory diseases. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine*, 2019, vol. 12, no. 4, pp. 7–10. (In Russ.)] doi: 10.20969/VSKM.2019.12(4).7-10
6. Дружинин В.Г., Буслаев В.Ю., Баранова Е.Д., Начева Л.В. Роль микробиоты в поддержании гомеостаза и индукции мутагенеза в соматических клетках человека // Фундаментальная и клиническая медицина. 2018. Т. 3, № 4. С. 83–92. [Druzhinin V.G., Buslaev V.Y., Baranova E.D., Nacheva L.V. The role of microbiota in cellular homeostasis and mutagenesis. *Fundamental'naya i klinicheskaya meditsina = Fundamental and Clinical Medicine*, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 83–92. (In Russ.)] doi: 10.23946/2500-0764-2018-3-4-83-92
7. Заславская М.И., Махрова Т.В., Александрова Н.А., Игнатова Н.И., Белова И.В., Точилина А.Г., Соловьева И.В. Перспективы использования бактериоцинов нормальной микробиоты в антибактериальной терапии (обзор) // Современные технологии в медицине. 2019. Т. 11, вып. 3. С. 136–145. [Zaslavskaya M.I., Makhrova T.V., Aleksandrova N.A., Ignatova N.I., Belova I.V., Tochilina A.G., Solovyeva I.V. Prospects for using bacteriocins of normal microbiota in antibacterial therapy (review). *Sovremennye tekhnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine*, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 136–145. (In Russ.)] doi: 10.17691/stm2019.11.3.17
8. Захаренко С.М. Токсин-продуцирующие *Klebsiella oxytoca* как причина антибиотик-ассоциированного колита // Альманах клинической медицины. 2018. Т. 46, № 5. С. 497–503. [Zakharenko S.M. Toxin-producing *Klebsiella oxytoca* as a cause of antibiotic-associated colitis. *Al'manakh klinicheskoi meditsiny = Almanac of Clinical Medicine*, 2018, vol. 46, no. 5, pp. 497–503. (In Russ.)] doi: 10.18786/2072-0505-2018-46-5-497-503

9. Караулов А.В., Афанасьев С.С., Алешкин В.А., Бондаренко Н.Л., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Алешкин А.В., Борисова О.Ю., Овсянникова Е.Г., Рубальский О.В., Пылев А.Л., Бочкарева С.С., Сердюков В.Г., Рубальская Е.Е., Воропаев А.Д., Махмудов Р.С. Механизмы приобретения вирулентности условно-патогенными микроорганизмами и формирования пула нозокомиальных штаммов в микробиоценозах слизистых открытых полостей организма // Астраханский медицинский журнал. 2018. Т. 13, № 2. С. 17–31. [Karaulov A.V., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L., Voropaeva E.A., Afanas'ev M.S., Nesvizhskii Yu.V., Aleshkin A.V., Borisova O.Yu., Ovsyannikova E.G., Rubal'skii O.V., Pylev A.L., Bochkareva S.S., Serdyukov V.G., Rubal'skaya E.E., Voropaev A.D., Makhmudov R.S. Mechanisms of virulence acquisition of opportunistic microorganisms and nosocomial strains pool formation in mucosal microbiocenoses of open cavities of the body. *Astrakhanskii meditsinskii zhurnal = Astrakhan Medical Journal*, 2018, vol. 13, no. 2, pp. 17–31. (In Russ.)] doi: 10.17021/2018.13.2.17.31
10. Лазарева И.В., Старкова П.С., Агеевец В.А., Волкова М.О., Лебедева М.С., Навацкая А.С., Мясникова Е.Б., Митрошина Г.В., Сидоренко С.В. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию // Антибиотики и химиотерапия. 2018. Т. 63, № 11–12. С. 18–23. [Lazareva I.V., Starkova P.S., Ageevets V.A., Volkova M.O., Lebedeva M.S., Navatskaya A.S., Myasnikova E.B., Mitroshina G.V., Sidorenko S.V. Assessment of the distribution of rectal carriage of virulence and carbapenemases genes in patients enrolled for planned hospitalization. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*, 2018, vol. 63, no. 11–12, pp. 18–23. (In Russ.)]
11. Пай Г.В., Ракитина Д.В., Сухина М.А., Юдин С.М., Макаров В.В., Мания Т.Р., Загайнова А.В. Оценка наличия генов, связанных с вирулентностью, у изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022. Т. 99, № 4. С. 436–444. [Pay G.V., Rakitina D.V., Sukhina M.A., Yudin S.M., Makarov V.V., Maniya T.R., Zagaaynova A.V. Multiplex PCR screening for virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from microbiota of diseased and healthy people. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 4, pp. 436–444. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-237
12. Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных отношений // Бюллетень оренбургского научного центра УРО РАН. 2013. № 1: 8. [Semenov A.V. Antagonism as a result cross-species interaction between microorganisms. *Bulleten' orenburgskogo nauchnogo tsentra URO RAN = Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences*, 2013, no. 1: 8. (In Russ.)] URL: [http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/SemenovAV\(2013-1\).pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2013-1/Articles/SemenovAV(2013-1).pdf) (05.06.2023)
13. Семенова Д.Р., Николаева И.В., Фиалкина С.В., Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Валиуллина И.Р. Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами *Klebsiella pneumoniae* новорожденных и грудных детей с внебольничной и нозокомиальной клебсиеллезной инфекцией // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2020. Т. 65, № 5. С. 158–163. [Semenova D.R., Nikolaeva I.V., Fialkina S.V., Khaertynov Kh.S., Anohin V.A., Valiullina I.R. Frequency of colonization with “hypervirulent” *Klebsiella pneumoniae* strains of newborns and infants with community-acquired and nosocomial klebsiella infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2020, vol. 65, no. 5, pp. 158–163. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2020-65-5-158-163
14. Синягина М.Н., Лайков А.В., Маркелова М.И., Булыгина Е.А., Хуснутдинова Д.Р., Абдулхаков С.Р., Григорьева Т.В. Физиолого-биохимическая и генетическая характеристика конкурентных свойств штаммов *Escherichia coli* в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 669–681. [Siniagina M.N., Laikov A.V., Markelova M.I., Boulygina E.A., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V. Competitive ability of *Escherichia coli* strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 6, pp. 669–681. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-192
15. Степанова К.Б., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф., Колотова О.Н. Молекулярно-генетическая характеристика представителей микропаразитоценоза при описторхозе // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2022. № 1. С. 3–10. [Stepanova K.B., Kataeva L.V., Stepanova T.F., Kolotova O.N. Molecular-genetic characteristics of microparasitocenosis members in opisthorchiasis. *Meditsinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni = Medical Parasitology and Parasitic Diseases*, 2022, vol. 1, pp. 3–10. (In Russ.)] doi: 10.33092/0025-8326mp2022.1.3-10
16. Топол И.А., Полякова И.С., Елыкова А.В. Роль кишечной микробиоты в регуляции иммунных реакций в иммунной системе кишечника в условиях стресса и при модуляции ее состава путем введения антибиотиков и пробиотиков // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 722–733. [Topol I.A., Polyakova I.S., Elykova A.V. Role of intestinal microbiota in regulation of immune reactions of gut-associated lymphoid tissue under stress and following the modulation of its composition by antibiotics and probiotics administration. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2022, vol. 99, no. 6, pp. 722–733. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-270
17. Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Ризванов А.А., Давидюк Ю.Н., Халиуллина С.В., Любин С.А., Казакова Ф.М., Сатрутдинов М.А., Фаттахов М.Г. Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции // Российский вестник перинатологии и педиатрии. 2018. Т. 63, № 5. С. 139–146. [Khaertynov K.S., Anohin V.A., Rizvanov A.A., Davidyuk Yu.N., Khaliullina S.V., Lyubin S.A., Kazakova F.M., Satrutdinov M.A., Fattahov M.G. Virulence and antibiotic resistance of isolates of *Klebsiella pneumoniae* in newborns with localized and generalized forms of infection. *Rossiiskii vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics*, 2018, vol. 63, no. 5, pp. 139–146. (In Russ.)] doi: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-139-146
18. Baquero F., Lanza V.F., Baquero M.R., Del Campo R., Bravo-Vázquez D.A. Microcins in Enterobacteriaceae: peptide antimicrobials in the eco-active intestinal chemosphere. *Front. Microbiol.*, 2019, vol. 10: 2261. doi: 10.3389/fmicb.2019.02261
19. Marković K.G., Grujović M.Ž., Koračević M.G., Nikodijević D.D., Milutinović M.G., Semedo-Lemsaddek T., Djilas M.D. Colicins and microcins produced by Enterobacteriaceae: characterization, mode of action, and putative applications. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 2022, vol. 19, no. 18: 11825. doi: 10.3390/ijerph191811825

20. Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zapparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. Opisthorchis viverrini, Clonorchis sinensis and Opisthorchis felinus affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2023, vol. 17, no. 2: e0011111. doi: 10.1371/journal.pntd.0011111
21. Sun L., Bai Y., Zhang X., Zhou C., Zhang J., Su X., Luo H., Yao B., Wang Y., Tu T. Characterization of three glutamate decarboxylases from *Bacillus* spp. for efficient γ -aminobutyric acid production. *Microb. Cell Fact.*, 2021, vol. 20, no. 1: 153. doi: 10.1186/s12934-021-01646-8
22. Yogeswara I.B.A., Maneerat S., Haltrich D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria — a key enzyme in GABA Synthesis. *Microorganisms*, 2020, vol. 8, no. 12: 1923. doi: 10.3390/microorganisms8121923

Авторы:

Катаева Л.В., д.м.н., главный научный сотрудник, зав. бактериологической лабораторией ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Карпухина Н.Ф., биолог бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Вакарина А.А., к.м.н., старший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Колотова О.Н., младший научный сотрудник бактериологической лаборатории ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова Т.Ф., д.м.н., профессор, директор ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия;

Степанова К.Б., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов ФБУН Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии Роспотребнадзора, г. Тюмень, Россия.

Authors:

Kataeva L.V., DSc (Medicine), Head Researcher, Head of the Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Karpukhina N.F., Biologist, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Vakarina A. A., PhD (Medicine), Senior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Kolotova O.N., Junior Researcher, Bacteriological Laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova T.F., DSc (Medicine), Professor, Director of Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation;

Stepanova K.B., PhD (Medicine), Leading Researcher, Laboratory of Clinics and Immunology of Biohelminthiasis, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russian Federation.