

# ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И ДИСБИОТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ КИШЕЧНИКА

С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева

ФГУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург

**Резюме.** Проведена детекция факторов патогенности у 67 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из фекалий. Определяли гены, кодирующие факторы вирулентности возбудителей кишечных инфекций (*Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli*). Исследование показало, что штаммы *Klebsiella* не имеют генов, кодирующих: способность к адгезии (*sfa*, *afa*, *aaf/I*, *eae*), инвазии (*ipaH*, *ial*), продукции термолabileльных (*elt*, *LT II*), термостабильных (*stI*, *st2*) и Шига-токсинов (*stx1*, *stx2*). *Klebsiella spp.* хорошо известны как возбудители оппортунистических инфекций мочевыводящих путей, крови, ран, дыхательных путей. В тоже время, этот микроорганизм не имеет факторов вирулентности диареогенных энтеробактерий и не способен вызывать диарею и другую патологию желудочно-кишечного тракта.

*Ключевые слова:* условно патогенные энтеробактерии, *Klebsiella*, факторы патогенности, острые кишечные заболевания.

## OPPORTUNISTIC ENTEROBACTERIACEAE AS THE CAUSE OF THE ACUTE DIARRHEA AND GUT DISBIOSIS

Egorova S.A., Makarova M.A., Kaftyreva L.A.

**Abstract.** Strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from feces were studied to detect virulence factors of “classical” enteric pathogens causing acute diarrhea (*Shigella*, *Salmonella*, diarrheagenic *Escherichia coli*). We haven’t detect in *Klebsiella* the genes encode different virulence factors: the abilities to adherence (*sfa*, *afa*, *aaf/I*, *eae*), invasion (*ipaH*, *ial*), production of heat-labile toxins (*elt*, *LT II*), heat-stable toxins (*stI*, *st2*) and Shiga toxins (*stx1*, *stx2*). *Klebsiella spp.* is well-known pathogen of the opportunistic infections of urinary tract, blood, wound, respiratory tract. But this bacteria hasn’t virulence factors of diarrheagenic *Enterobacteriaceae* and can’t cause acute diarrhea and other gut pathology. (*Infekc. immun.*, 2011, vol. 1, N 2, p. 181–184)

*Key words:* opportunistic *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, virulence factors, diarrhea.

## Введение

В настоящее время вопрос об этиологической значимости условно патогенных энтеробактерий (УПЭ), включая *Klebsiella spp.*, при возникновении острых кишечных заболеваний (ОКЗ) в нашей стране является спорным. Согласно

существующим нормативным документам (МУ № 11-33/6-40, Москва, 1987), диагностика ОКЗ, вызванных условно патогенными энтеробактериями, включает идентификацию микроорганизма и количественную характеристику, выраженную в КОЕ/1,0 г испражнений. В тоже время известно, что УПЭ являются представи-

поступила в редакцию 09.03.2011  
принята к печати 15.03.2011

© Егорова С.А., Макарова М.А.,  
Кафтырева Л.А., 2011

### Адрес для переписки:

Егорова Светлана Александровна,  
к.м.н., старший научный сотрудник  
лаборатории кишечных инфекций ФГУН  
НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,  
ФГУН НИИЭМ имени Пастера  
Роспотребнадзора.  
Тел.: (812) 232-48-83 (служебн.).  
Факс: (812) 232-92-17.  
E-mail: pasteur@LK14290.spb.edu

телями факультативной микрофлоры толстого кишечника и достаточно часто обнаруживались в значительном количестве в испражнениях практически здоровых людей, не имеющих каких-либо нарушений со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [3, 4, 8, 9]. Согласно современным представлениям о патогенности бактериальных возбудителей ОКЗ, они должны иметь определенный набор факторов патогенности (специфических и неспецифических), обеспечивающих выживание, размножение и развитие патологического процесса в ЖКТ человека. Энтеробактерии как возбудители ОКЗ могут содержать различные факторы патогенности: адгезии, инвазии, персистенции, токсины и токсические продукты, бактериальные модулины, индуцирующие синтез цитокинов и медиаторов воспаления и др. [1]. Официально признанные патогенные энтеробактерии (*Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*) имеют специфические факторы патогенности, определяющие патогенез ОКЗ. Так, *Shigella* и энтероинвазивные *E. coli* (ЭИКП) обладают способностью к внутриклеточной инвазии, энтеропатогенные *E. coli* (ЭПКП) вызывают изменение цитоскелета энтероцитов и слушивание кишечного эпителия, энтеротоксигенные *E. coli* (ЭТКП) продуцируют энтеротоксины, энтерогеморрагические *E. coli* (ЭГКП) способны к продукции шига-подобных токсинов [12, 13, 16, 27]. Кроме специфических факторов, обуславливающих собственно специфический патологический процесс, патогенные энтеробактерии обладают набором неспецифических факторов, необходимых для адгезии и персистенции в организме хозяина [1]. По современным данным многие виды УПЭ могут обладать десятью и более факторами патогенности. Вероятно, с этим связано отсутствие нозологической специфичности вызываемых ими заболеваний, отличающее их от официально признанных патогенных микроорганизмов [5, 10]. УПЭ являются признанными возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний (пневмоний, менингитов, конъюнктивитов, сепсиса, инфекций мочевыводящих путей [МВП]), в основном возникающих у пациентов, находящихся в стационарных условиях [2, 6, 7, 11, 18].

Важным направлением современных исследований является выявление ведущих факторов патогенности УПЭ и кодирующих их генов, оценка их влияния на развитие ОКЗ и дисбиотических состояний кишечника, а также на выраженность клинических проявлений.

Целью данного исследования была детекция генов, кодирующих факторы патогенности, характерные для признанных возбудителей ОКЗ, у штаммов *K. pneumoniae* — УПЭ энтеробактерий, часто выделяющихся при бактериологическом исследовании испражнений.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили 67 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных при бактериологическом исследовании испражнений пациентов, которые не имели признаков ОКЗ и предъявляли жалобы на различные дисбиотические проявления со стороны ЖКТ: неоформленный стул, запоры, боли в животе, повышенное газообразование. Группу сравнения составили штаммы патогенных энтеробактерий (*S. sonnei*, *E. coli* O:124, *E. coli* O:148, *E. coli* O:142, *E. coli* O:157:H7), выделенные от пациентов с выраженными клиническими проявлениями ОКЗ (синдромами колита или энтерита).

Наличие ведущих факторов патогенности у штаммов энтеробактерий изучали путем детекции кодирующих их генов методом ПЦР со специфическими праймерами. Выявляли гены, кодирующие адгезины (*sfa*, *afa*, *aaf/1*, *eaeA*), инвазины (*ial*, *ipaH*), продукцию термолabileного (*elt1*, *elt2*), термостабильного (*st1*, *st2*) и шига-подобного (*stx1*, *stx2*) токсинов. Исползованные праймеры, а также соответствующие им температуры отжига, указаны в табл. 1. Выделение тотальной ДНК проводили с использованием набора реагентов InstaGene matrix (BioRad, Франция) согласно инструкции производителя. Амплификацию проводили согласно разработанным протоколам [16, 19] в DNAThermal Cycler (PTC-100, MJ Research, Inc.). Амплифицированные фрагменты идентифицировали путем электрофореза в 1,2% агарозном геле с добавлением бромистого этидия при 100 В в течение 45 мин и визуализировали в ультрафиолетовом свете при длине волны 200 нм. В качестве маркера молекулярного веса использовали DNA Ladder 100 bp (Fermentas, Латвия).

## Результаты

Результаты исследования представлены в табл. 2. Молекулярно-генетическими методами нам не удалось обнаружить гены, кодирующие конкретные адгезины, присущие многим патогенным и УПЭ: S-пили, агрегативно-адгезивные фимбрии, белок интимин, афимбриальный адгезин. Также не были обнаружены генетические детерминанты, кодирующие инвазины, энтеротоксины и шига-подобные токсины, определяющие патогенез ОКЗ у «классических» возбудителей.

В то же время, в геноме классических энтеропатогенов удалось подтвердить наличие генов, кодирующих ведущие факторы патогенности. Так, у штаммов *S. flexneri* и *S. sonnei*, а также энтероинвазивных *E. coli* O:124 идентифицированы гены, отвечающие за продукцию плазмидных и хромосомных факторов инвазии *ipaH* и *ial*. У штаммов *E. coli* O157:H7 выявлены гены факторов патогенности, по которым они относятся к группе энтерогеморрагических эшерии-

хий: гены шига-подобных токсинов (*stx1* и *stx2*) и *eaeA* ген, ответственный за синтез белка интимина. Штаммы *E. coli* O:148, принадлежащие к группе энтеротоксигенных эшерихий, имели гены, ответственные за продукцию термолабильного и термостабильного энтеротоксинов (*elt1*, *elt2* и *st1*, *st2*).

## Обсуждение

Полученные нами данные подтверждают тот факт, что генетические маркеры, ассоциируе-

мые с патогенностью истинных возбудителей ОКЗ, обнаруживаются среди штаммов УПЭ достаточно редко. По данным отечественных авторов [1, 5, 10] около 10% штаммов УПЭ имеют следующие генетические детерминанты патогенности: ген *sfa*, гены *hlyA*, ген *hlyB*, ген *cnf1*, определяющие способность к адгезии, гемолитическую активность и продукцию цитонекротического фактора. Все перечисленные факторы не являются специфическими и достаточными для того, чтобы обуславливать развитие патоло-

**ТАБЛИЦА 1. ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРАЙМЕРЫ И СООТВЕТСТВУЮЩИЕ ИМ ТЕМПЕРАТУРЫ ОТЖИГА**

Ген	Название	Нуклеотидная последовательность праймера	Tm (°C)
<i>afa</i>	AFA1	5'-GCTGGGCAGCAAAGTACTCTC-3'	65
	AFA2	5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG-3'	
<i>sfa</i>	SFA1	5'-CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC-3'	65
	SFA2	5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3'	
<i>aaf</i>	AAF1A	5'-GCGTTAGAAAGACCTCCAATA-3'	57
	AAF1B	5'-GCCGGATCCTTAAAAATTAATTCGGGC-3'	
<i>eae</i>	FM1	5'-CATTATGGAACGGCAGAGGT-3'	57
	RU4	5'-ATCTTCTGCGTACTGCGTTCA-3'	
<i>ial</i>	PR1	5'-CTGGATGGTATGGTGAGG-3'	70
	PR2	5'-CCAGGCCAACAATTATTTCC-3'	
<i>ipaH</i>	IpaH14a	5'-GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC-3'	70
	IpaH14a	5'-GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC-3'	
<i>elt1-2</i>	LT1	5'-ATTTACGGCGTTACTATCCTC-3'	50
	LT2	5'-TTTTGGTCTCGGTCAGATATG-3'	
<i>sta</i>	Sta1	5'-TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG-3'	50
	Sta2	5'-ACAGGCAGGATTACAACAAG-3'	
<i>stx1</i>	Stx1F	5'-ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC-3'	50
	Stx1R	5'-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3'	
VT	VT2fP	5'-TAAACTGCACTTCAGCAAAT-3'	43
	VT2eP	5'-AATACATTATGGGAAAGTAATA-3'	
<i>stx</i>	LIN 3'	5'-TTTGATTGTTACAGTCAT-3'	50
	LIN 5'	5'-GAACGAAATAATTTATATGT-3'	

**ТАБЛИЦА 2. ГЕНЫ, КОДИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ У ШТАММОВ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ**

Ген	штаммы энтеробактерий				
	<i>K. pneumoniae</i> n = 67	<i>E. coli</i> O:157:H7 n = 2	<i>E. coli</i> O:124 n = 4	<i>E. coli</i> O:148 n = 4	<i>S. sonnei</i> n = 12
<b>Факторы адгезии</b>					
<i>sfa</i>	-	-	-	-	-
<i>afa</i>	-	-	-	-	-
<i>aaf1</i>	-	-	-	-	-
<i>eaeA</i>	-	+	-	-	-
<b>Факторы инвазии</b>					
<i>ial</i>	-	-	+	-	+
<i>ipaH</i>	-	-	+	-	+
<b>Токсины</b>					
<i>st1, st2</i>	-	-	-	+	-
<i>lt1, lt2</i>	-	-	-	+	-
<i>stx1, stx2</i>	-	+	-	-	-

гического процесса в кишечнике. Однако только этих факторов недостаточно для того, чтобы микроорганизмы вызвали ОКЗ. Различные фимбриальные и нефимбриальные адгезины способствуют адгезии микроорганизма к слизи и эпителию кишечного тракта, МВП и дыхательных путей, а также к абиотическим поверхностям, покрытым коллагеном [14, 15]. Это обеспечивает персистенцию условно патогенных микроорганизмов в кишечнике, развитие патологических процессов в биотопах, в норме не являющихся постоянным местом обитания этих микроорганизмов (МВП и респираторный тракт), а также формирование биопленок на поверхностях различных инструментов, используемых при проведении инвазивных процедур.

Для более полного суждения об УПЭ как о возбудителях ОКЗ необходимо углубленное сравнительное изучение биологических свойств штаммов, выделенных от больных при различных патологических состояниях, с применением современных молекулярно-генетических методов.

## Список литературы

1. Бондаренко В.М., Петровская В.Г., Потатуркина-Нестерова Н.И. Проблема патогенности клебсиелл. — Ульяновск: УлГУ, 1996. — 132 с.
2. Воробьева О.Н. Этиологическая структура возбудителей внутрибольничных раневых инфекций // Современные проблемы медицинской микробиологии: мат. XXXX юбилейной науч. конф. «Хлопинские чтения» (СПб., 2007). — СПб., 2007. — С. 178–179.
3. Егорова С.А., Забровская А.В., Лаврениева И.С. Характеристика микрофлоры при дисбиозе кишечника и способы ее коррекции // Современные средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной профилактики актуальных инфекций: материалы науч. конф. с междунар. участием (ВМА, СПб., 2004). — СПб., 2004. — С. 179–181.
4. Егорова С.А. Обнаружение клебсиелл при дисбактериозах кишечника // Актуальные вопросы инфекционной патологии — 2005: материалы Всеросс. науч. конф. молодых ученых с междунар. участием (СПб., 27–28 января 2005). — СПб., 2005. — С. 58.
5. Жеребцова Н.Ю., Баймиев А.Х., Валишин Д.А., Мавзютов А.Р. Генетические маркеры патогенности условно патогенных энтеробактерий, выделенных у детей и подростков при острых кишечных инфекциях // Журн. микробиол. — 2007. — № 2. — С. 3.
6. Камачкова И.М. Этиологическая значимость условно-патогенных бактерий в развитии инфекции мочевыделительной системы // Материалы VIII съезда Всеросс. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М., 2002. — Т. 1. — С. 182.
7. Красноголовец В.Н., Киселева Б.С. Клебсиеллезные инфекции. — М.: Медицина, 1996. — 256 с.
8. Леванова Л.А., Алешкин В.А., Воробьев А.А., Афанасьев С.С., Сурикова Е.В., Рубальский О.В., Алешкин А.В. Становление микрофлоры кишечника у детей первого года жизни // Журн. микробиол. — 2001. — № 4. — С. 47–50.
9. Леванова Л.А., Алешкин В.А., Воробьев А.А., Афанасьев С.С., Зинин-Бернес Н.Н., Алешкин А.В. Микробиоценоз кишечника в критические периоды развития ребенка // Журн. микробиол. — 2001. — № 6. — С. 69–73.
10. Мавзютов А.Р. Факторы патогенности оппортунистических энтеробактерий и их роль в развитии диареи // Журн. микробиол. — 2007. — № 1. — С. 89–97.
11. Турчанинов Д.В. Гнойно-септические инфекции новорожденных в перинатальном центре // Материалы VIII съезда Всеросс. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. — М.: 2002. — Т. 3. — С. 172.
12. Caprioli A., Morabito S., Brugere H. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission // *Vet. Res.* — 2005. — Vol. 36. — P. 289–311.
13. Clarke S.C., Haigh R.D., Freestone P.P.E., Williams P.H. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — Vol. 16, N 3. — P. 365–378.
14. Lavender H.F., Jagnow J.R., Clegg S. Biofilm formation in vitro and virulence in vivo of mutants of *Klebsiella pneumoniae* // *Infect. Immun.* — 2004. — Vol. 72, N 8. — P. 4888–4890.
15. Martino P.D. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces // *Res. Microbiol.* — 2003. — Vol. 154, N 1. — P. 9–16.
16. Mühlendorfer I., Hacker J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. Mini-review // *Microb. Pathog.* — 1994. — Vol. 16. — P. 171–181.
17. Nataro J., Caper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli* // *Clin. Microbiol. Rev.* — 1998. — Vol. 11, N 1. — P. 142–201.
18. Sardan Y.C., Zarakolu P., Altun B., Yildirim A., Yildirim G., Hascelik G., Uzun O. A cluster of nosocomial *Klebsiella oxytoca* bloodstream infections in a university hospital // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* — 2004. — Vol. 25, N 10. — P. 878–882.
19. Tamaki Y., Narimatsu H., Miyazato T., Nakasone N., Higa N., Toma C., Iwanaga M. The relationship between O-antigens and pathogenic genes of diarrhea-associated *Escherichia coli* // *Jpn. J. Infect. Dis.* — 2005. — Vol. 58, N 2. — P. 65–69.