

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

Катаева Л. В. ¹,

Карпухина Н. Ф. ¹,

Вакарина А. А. ¹,

Колотова О. Н. ¹,

Степанова Т. Ф. ¹,

Степанова К. Б. ¹

¹ Бактериологическая лаборатория, ФБУН ТНIIИКИП Роспотребнадзора, Тюмень, Россия.

**ESCHERICHIA COLI PHENOTYPIC CHARACTERISTICS AND
ANTAGONISTIC ACTIVITY IN OPISTHORCHIASIS INVASION**

Kataeva L. V. ^a,

Karpukhina N. F. ^a,

Vakarina A. A. ^a,

Kolotova O. N. ^a,

Stepanova T. F. ^a,

Stepanova K. B. ^a

^a Bacteriological laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute,
Tyumen, Russia.

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 O6:H1 и O6:H5. 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-лактамным 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.

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 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 *Escherichia 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.

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

1 Введение

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

10 Различные виды и биотопы микроорганизмов находятся в состоянии
11 топической и пищевой конкуренции, обеспечивающей образование
12 синтрофных связей, обмен генетическим материалом, формирование
13 консорциумов, реализующиеся в механизме антагонизма [2]. Феномен
14 оппозитного влияния микросимбионтов на их биологические свойства
15 (антагонистический, антилизоцимный, персистентный потенциал и
16 биопленкообразование) позволяет реализовать распознавание чужеродных
17 патогенов в микробиоте [4]. В частности, жизнедеятельность гельминта *O.*
18 *felineus* в организме «хозяина» оказывает системное влияние на микробиоту
19 желчевыводящих путей кишечного биотопа, приводящая к изменению ее
20 вирулентных свойств и нарушению барьерной функции [15]. Паразитарные
21 инвазии способствуют нарушению симбиотических и синергических
22 взаимоотношений бактерий в макроорганизме, обеспечивая трансформацию
23 таксономического состава микробиоты, изменение факторов и механизмов
24 микробной регуляции. Активация антагонистических свойств культуры
25 осуществляется при условии улучшения ее метаболических и ростовых
26 характеристик. Ингибирование антагонистической активности бактерий,
27 представителей нормобиоты, связано с подавлением их антимикробных
28 факторов и функциональных свойств патогенами, а также с негативным
29 действием на активность генов, экспрессирующих продукты обмена [12].

30 Постоянный представитель кишечной микробиоты млекопитающих *E.*
31 *coli*, преимущественно не проявляет патогенной активности, однако, в
32 последнее время отмечается ее способность к продукции токсинов [6].
33 Установлено, что при описторхозной инвазии в составе кишечной
34 микробиоты человека выявляются *E. coli*, в геноме которых обнаруживаются
35 маркеры патогенных *E. coli*, носителей кластеров О-антигенов и Н-антигенов,
36 ассоциированных с вирулентностью. Обмен мобильными генетическими
37 элементами ведет к появлению новых вариантов *E. coli*, обладающих генами,
38 кодирующими различные факторы патогенности [15], провоцируя
39 аномальные воспалительные реакции, различные дегенеративные и
40 злокачественные эффекты в пораженном органе.

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

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

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

59 **Цель исследования** – определить антагонистическую активность
60 изолятов *Escherichia coli* в отношении бактерий *Klebsiella* spp., выделенных из
61 содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом описторхоз.

62 2 Материалы и методы

63 Изучены фенотипические свойства 54 изолятов *E. coli* и 8 - бактерий
64 рода *Klebsiella* (3 — *K. oxytoca*; 5 – *K. pneumoniae*), выделенных из
65 содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом описторхоз. Штаммы *E.*
66 *coli* разделены по биохимическим свойствам на группы: ферментирующие / не
67 ферментирующие лактозу (*Lac*+/*Lac*-); обладающие / не обладающие
68 гемолитической активностью (*Gem*+/*Gem*-); подвижные / не подвижные
69 (*подв.*+/*подв.*-). Микробиологические исследования проводились
70 классическим бактериологическим методом. Видовую идентификацию
71 бактерий подтверждали методом масс-спектрометрии с использованием
72 программного обеспечения Maldi BioTyper 3.0. Уровень идентификации
73 изолятов выше 2.0 свидетельствовал о высокой достоверности. Пакет
74 прикладных программ позволил изучить протеомный анализ всех указанных
75 штаммов, свидетельствующий о гомологии их белковых спектров и
76 представленный коэффициентом корреляции.

77 Проведено 204 исследования антагонистической активности изолятов *E.*
78 *coli* с различными свойствами в отношении бактерий *Klebsiella* spp.
79 Определение АА бактерий проводили по методике совместного
80 культивирования в жидкой питательной среде. Для этого суточную агаровую
81 культуру смывали стерильным физиологическим раствором и готовили
82 суспензию, содержащую 500 млн микробных клеток в 1 мл. В 5 мл мясо-
83 пептонного бульона (МПБ) с рН 7,2-7,4 вносили 1,0 мл взвеси *E. coli* и
84 *Klebsiella* spp. 0,1 мл. Суспензию инкубировали при 37° С и через 24, 48 и 72 ч
85 из бульонных культур готовили ряд последовательных десятикратных
86 разведений. Из разведений 10⁻⁵ и 10⁻⁶ производили высевы по 0,1 мл, в двойной
87 повторности на чашки Петри со средой Левина. Посевы выдерживали в

88 термостате при 37° С 18-20 ч, после чего подсчитывали число выросших
89 колоний *E. coli* и *Klebsiella* spp. на каждой чашке отдельно. Значение индекса
90 антагонистической активности (ИАА) вычисляли по формуле (%):

$$\text{ИАА} = \frac{\text{К}}{\text{К} + \text{Ф}} \times 100$$

91
92 где, К - число колоний *E. coli*; Ф - число колоний *Klebsiella* spp. (объекта
93 антагонизма), выросших на плотной питательной среде при высеве из МПБ
94 после сокультивирования.

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

100 Определение и оценка чувствительности к антибиотикам изолятов *E.*
101 *coli* и *Klebsiella* spp. осуществлялось по минимальной подавляющей
102 концентрации (МПК) в автоматическом режиме (Sensititre Aris 2х).

103 Штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* изучены методом полногеномного
104 секвенирования. Полученные единичные прочтения для каждого штамма
105 были собраны в контиги при помощи программы Unicycler v.0.4.7. Образцы с
106 величиной средних покрытий геномов выше 200 свидетельствовали о
107 достаточном объеме данных. Обработка результатов полногеномного
108 секвенирования проводилась с помощью программного обеспечения анализа
109 метагеномных образцов Kraken Metagenomics version 2 (классификатор ридов
110 – коротких нуклеотидных последовательностей). Филогенетические
111 исследования осуществляли в программе Wombac 2.0, которая позволяла
112 находить коровые SNP в нуклеотидных последовательностях и производить
113 выравнивание этих полиморфизмов. Для определения О-антигенов и
114 капсульных антигенов штаммов *K. pneumoniae* использовали сервер Kaptive.
115 Определение сиквенс типов осуществляли с использованием сервера MLST

116 2.0 (Multi-Locus Sequence Typing) (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>), а
117 также программой Lasergene.

118 Статистическая обработка полученных данных и визуализация
119 результатов были проведены в электронных таблицах Microsoft Office Excel
120 2016. Для анализа применялись методы статистической обработки с
121 применением программы SPSS, версия 22. Номинальные данные описывались
122 с указанием абсолютных значений, процентных долей и доверительных
123 интервалов (95% ДИ) - метод Клоппера-Пирсона. Анализ статистической
124 значимости различий ИАА проведен с использованием непараметрического
125 критерия Манна-Уитни и таблиц сопряженности по критерию хи-квадрат
126 Пирсона (χ^2). Различия полученных значений считались статистически
127 значимыми при $p < 0,05$.

128 3 Результаты

129 Фенотипические исследования изолятов *E. coli*, выделенных из
130 содержимого толстой кишки пациентов с диагнозом описторхоз показали, что
131 в их структуре преобладали лактозопозитивные, не обладающие
132 гемолитической активностью и подвижные штаммы (рис. 1). Изоляты *K.*
133 *pneumoniae* и *K. oxytoca*, идентифицированные в этой же группе пациентов,
134 характеризовались проявлением типичных для этих видов свойств. При
135 исследовании изолятов *E. coli* и *Klebsiella* spp. на чувствительность к
136 антибиотикам установлено, что все они были чувствительны к
137 цефалоспорином, карбапенемам, защищенным пенициллинам,
138 хлорамфениколу, триметоприму/сульфаметоксазолу и аминогликозидам.

139 Изучение антагонистической активности изолятов *E. coli* в отношении
140 бактерий рода *Klebsiella* выявило повышение ИАА с 33,7% (95% ДИ: 17,5-
141 28,5) в первые сутки совместного культивирования бактерий до 54,1% (95%
142 ДИ: 17,5-28,5) к 3-м суткам. Средний показатель ИАА составил 45,4% (95%
143 ДИ: 17,5-28,5). Увеличение значений индекса АА штаммов *E. coli* не зависело
144 от их фенотипических свойств за весь период наблюдения (рис. 2). Вместе с

145 тем, сравнительный анализ показателей ИАА штаммов *E. coli* в группах,
146 ферментирующих лактозу и обладающих подвижностью, в 1,3 раза выше при
147 сравнении с аналогичными показателями изолятов с противоположными
148 свойствами на вторые сутки наблюдения. Статистически значимые более
149 высокие показатели ИАА установлены на вторые и третьи сутки наблюдения
150 только по подвижности штаммов (непараметрический критерий Манна-
151 Уитни, $p=0,002$ и $p=0,001$ соответственно).

152 В структуре всех штаммов на долю *E. coli*, обладающих низкой
153 антагонистической активностью (ИАА ≤ 20), пришлось 22,2% (95% ДИ: 12,04
154 - 35,6), с высокой антагонистической активностью (ИАА > 70) - 48,1% (95%
155 ДИ: 34,34 - 62,16).

156 Таким образом, все штаммы *E. coli* с типичными фенотипическими
157 характеристиками (*Lac+*, *Gem-*, *подв.+*), проявляли более выраженную
158 антагонистическую активность в отношении *Klebsiella spp.* при сравнении с
159 ИАА штаммов, проявляющими противоположные признаки. Данные
160 подтверждены статистическим анализом с применением непараметрического
161 критерия Манна-Уитни, $p=0,027$.

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

168 Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих высокой
169 антагонистической активностью, различались по степени филогенетического
170 родства и распределились на 4 кластера (рис. 3-Б). Анализ протеинограмм
171 установил гетерогенность белковых профилей этой группы *E. coli*, что
172 подтверждается умеренным показателем коэффициента корреляции – 0,65.
173 Четвертый кластер представлен максимальным количеством штаммов (15),

174 которые по фенотипическим свойствам отличались незначительно,
175 коэффициент корреляции их протеинограмм составил 0,7. Наибольшая часть
176 их были генетически схожими и обладали способностью разлагать лактозу, не
177 обладали гемолитической активностью и были подвижными.

178 Анализ спектральных профилей штаммов *Klebsiella* spp. показал
179 разделение их по видам: *K. oxytoca* и *K. pneumoniae*. Изоляты *E. coli* проявляли
180 высокую АА в отношении бактерий *K. oxytoca* значительно чаще, чем при
181 взаимодействии со штаммами *K. pneumoniae*, различия статистически
182 достоверные ($\chi^2 = 7,113$; $p=0,008$).

183 Изоляты *E. coli* (13), обладающие высоким уровнем АА, были изучены
184 молекулярно-генетическими методами. Молекулярное серотипирование по О-
185 и Н- антигенам в 60,0% случаев выявило наличие генов энтеротоксигенных
186 (О6:Н1, О6:Н5, О6:Н31, О8:Н30, О25:Н4), энтероинвазивных (О144:Н45) и
187 внекишечных патогенных (О1:Н7, О2:Н6) *E. coli*. Мультилокусное сиквенс-
188 типирование по семи локусам (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) этих
189 штаммов установило, что только два штамма относились к сиквенс-типу ST10
190 одного клонального комплекса; у 5 штаммов принадлежность к клональному
191 комплексу не определялась. Таким образом, по сиквенс-типам штаммы
192 характеризовались гетерогенностью.

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

203 количества комплексов генов вирулентности (48% и 36%): адгезинов (*pic*, *sfaS*,
204 *iha*); инвазинов (*mchF*, *iroN*); токсинов (*astA*, *cnf1*, *vat*, *sat*) и бактериоцинов
205 (*mchB*, *mchC*, *mcmA*), и относились к энтеротоксигенным *E. coli* сиквенс-
206 серотипам O6:H1 и O6:H5.

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

216 Сиквенс типы бактерий *K. oxytoca* определены как ST242 (два штамма)
217 и ST176. По маркерам резистентности к различным группам антимикробных
218 препаратов один штамм в геноме имел максимальный набор (*oqxA*, *oqxB*,
219 *qnrB1*, *fosA*, *fosA3*, *rmtB*, *dfrA14*, *tet(A)*, *blaCTX-M-55*, *blaSHV-106*, *blaTEM-*
220 *214*, *blaTEM-209*, *blaNDM-1*, *blaSHV-28*, *blaTEM-206*, *blaTEM-1B*, *blaTEM-*
221 *141*); у двух других выявлены гены только группы *blaOXY-2-5*, *blaOXY-5-1*,
222 *blaOXY-5-2*.

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

232 **4 Обсуждение**

233 Микробиота играет существенную роль в жизнедеятельности организма.
234 Одна из основных ее функций - формирование барьера колонизационной
235 резистентности, предотвращающая контаминацию слизистых оболочек
236 патогенами путем проявления антагонистической активности автохтонной
237 микробиоты [7, 14]. Иммунологический статус макроорганизма обеспечивает
238 оптимальные для конкретных ситуаций симбиотические и антагонистические
239 отношения микроорганизмов, способствующих формированию новых
240 фенотипических и генотипических свойств [9]. Так называемый «микробный
241 орган» характеризуется фенотипической гетерогенностью, генетической
242 разнородностью и сложными скоординированными связями. Факторы,
243 определяющие структуру микробных сообществ и их антагонистические
244 взаимодействия в кишечнике, еще мало изучены [1, 16].

245 Типичными представителями микробиоты млекопитающих являются *E.*
246 *coli*, характеризующиеся широким спектром ферментативной активности,
247 подвижности, биопленкообразования, участием в горизонтальном переносе
248 генетической информации [5]. Результаты настоящего исследования
249 свидетельствуют о том, что изоляты *E. coli*, выделенные из фекалий пациентов
250 с диагнозом описторхоз обладали преимущественно типичными
251 фенотипическими свойствами, при этом являлись носителями комплексов
252 генов вирулентности. Почти половина изученных нами изолятов обладали
253 генами, ответственными за продукцию бактериоцинов. Известно, что гены
254 системы продукции бактериоцинов, являются важными факторами
255 колонизационной резистентности кишечника и связаны с их пробиотическими
256 свойствами [14]. Антимикробная активность бактериоцинов,
257 обуславливающая антагонизм между бактериями, направлена не только на
258 штаммы филогенетически родственных видов бактерий, но и других видов и
259 родов. Решение проблемы резистентности к антибиотикам бактерий
260 инициирует интерес к естественным альтернативам – колицинам и

261 микроцинам, продуцируемых *E. coli* [18, 19]. В 80% случаев штаммы *E. coli*,
262 изолированные от пациентов с описторхозной инвазией, являлись носителями
263 гена glutamate decarboxylase (*gad*) - фермента, катализирующего необратимое
264 декарбоксилирование L-глутаминовой кислоты, участвующей в выполнении
265 различных физиологических функций [21, 22].

266 В кишечной микробиоте человека при описторхозной инвазии наиболее
267 часто встречаются бактерии *K. pneumoniae*, которые могут быть представлены
268 как комменсальными, так и высоко патогенными штаммами с
269 гипермукоидным фенотипом. Генетические детерминанты патогенного
270 потенциала этих штаммов (гены вирулентности, связанные с адгезией и
271 мукоидным фенотипом) значительно чаще выявляются при воспалительных
272 заболеваниях кишечника [11]. Наибольшую опасность представляют случаи,
273 связанные с гипервирулентными штаммами, способными одновременно
274 продуцировать и бета-лактамазы расширенного спектра действия. Сочетание
275 вирулентности и множественной лекарственной резистентности представляет
276 высокий риск развития бактериальной инфекции [13, 17]. Результаты
277 проведенных исследований изолятов *K. pneumoniae* выявили наличие в их
278 геномах факторов вирулентности - капсульных антигенов, при этом,
279 ингибировались некоторыми штаммами *E. coli*.

280 5 Заключение

281 Полученные данные свидетельствуют о том, что антагонистическая
282 активность штаммов *E. coli* с типичными фенотипическими признаками
283 является одним из важных факторов колонизационной резистентности
284 биотопа организма человека от патогенов при инфекционном заболевании.
285 Установлено, что геномы типичных представителей нормобиоты кишечника
286 (*E. coli*) при описторхозной инвазии содержат комплексы генов вирулентности
287 и патогенности. Возможно, эти характеристики обеспечивают высокий
288 уровень их антагонистической активности в отношении *Klebsiella* spp.

289 Результаты исследований позволили выделить штаммы, отличающиеся
290 определенными свойствами, депонировать их в государственной коллекции.
291 Нуклеотидные последовательности редких штаммов размещены в GenBank
292 NCBI. Результаты исследования генома штаммов *E. coli* положены в основу
293 изобретения, получен патент РФ. Патент №2756794 «Штамм нового генотипа
294 *Escherichia coli* 1654-1 для молекулярно-генетического типирования бактерий
295 рода *Escherichia*».

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

РИСУНКИ

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, %.

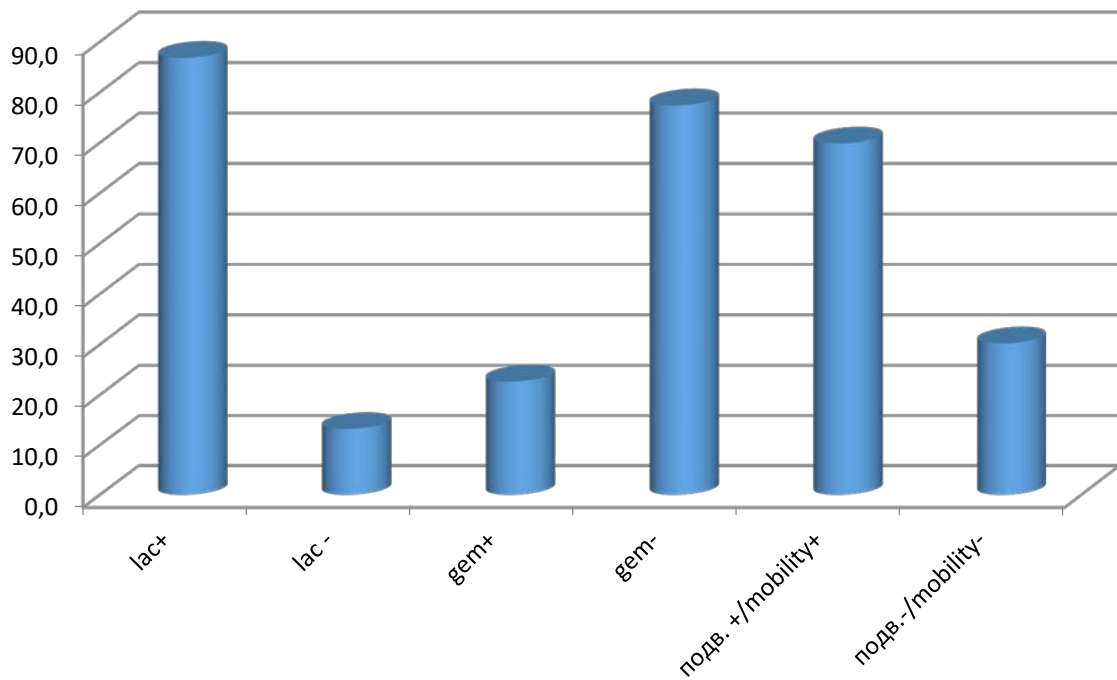


Рисунок 2. Сравнительная характеристика ИАА изолятов *E. coli*, отличающихся по фенотипическим свойствам, в отношении бактерий *Klebsiella spp.* в динамике, %.

Figure 2. Dynamic comparative characteristics of *E. coli* isolate IAA with varying phenotypic properties against *Klebsiella spp.* populations, %.

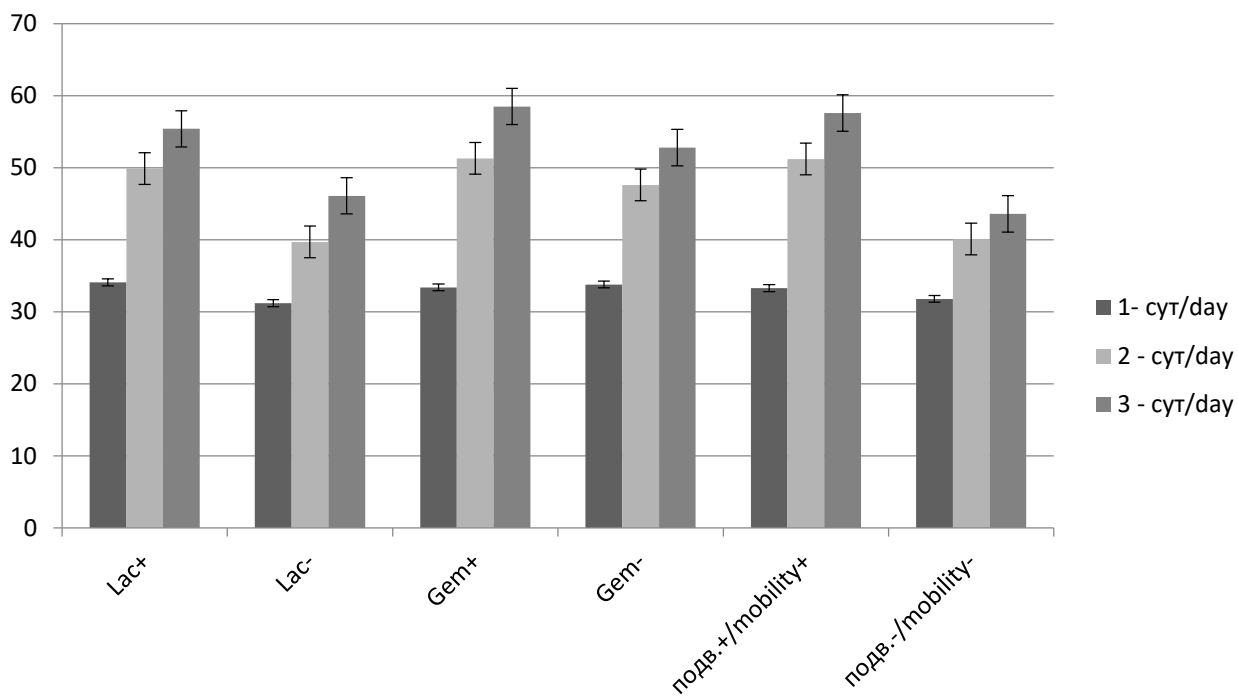
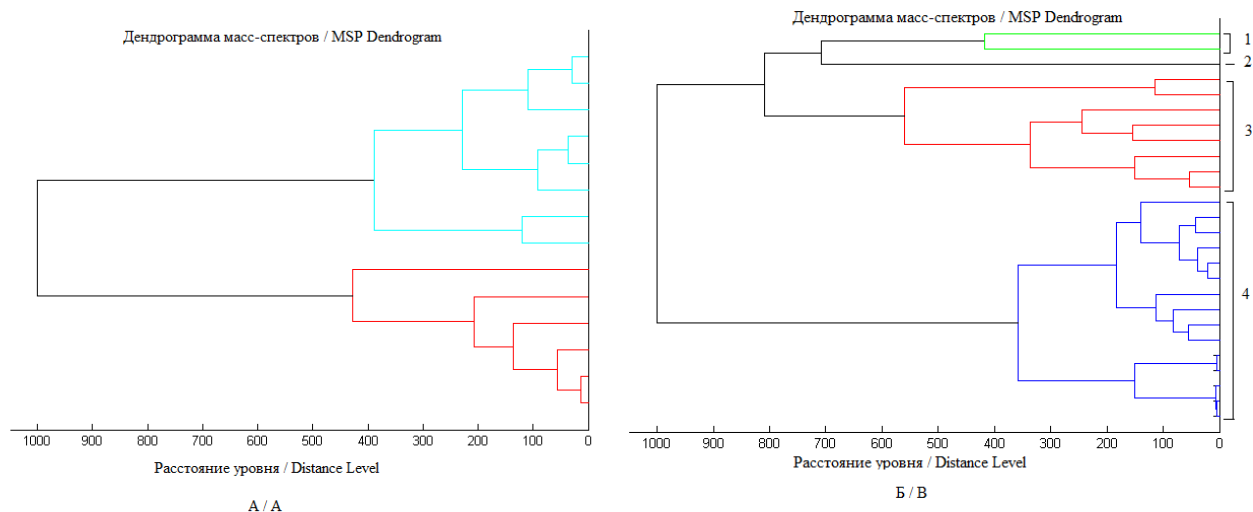


Рисунок 3. Дендрограммы штаммов *E. coli*, обладающих низким показателем ИАА ≤ 20 (А) и высоким - ИАА > 70 (Б).

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



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Катаева Любовь Владимировна – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник, заведующая бактериологической лабораторией; Бактериологическая лаборатория, ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, Тюмень, Россия;

ORCID: [0000-0001-9966-8454](https://orcid.org/0000-0001-9966-8454);

e-mail: KataevaLV@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Kataeva Lyubov Vladimirovna – doctor of medical sciences, chief researcher, head of the bacteriological laboratory; Bacteriological laboratory, Tyumen Region Infection Pathology Research Institute, Tyumen, Russia;

ORCID: [0000-0001-9966-8454](https://orcid.org/0000-0001-9966-8454);

e-mail: KataevaLV@Tniikip.rospotrebnadzor.ru

Блок 2. Информация об авторах

Карпухина Наталья Федоровна – биолог бактериологической лаборатории;
ORCID: 0009-0005-3662-5584

Karpukhina Natalya Fedorovna – biologist of the bacteriological laboratory;
ORCID: 0009-0005-3662-5584

Вакарина Арина Александровна – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник бактериологической лаборатории;
ORCID: 0000-0002-3112-4722

Vakarina Arina Alexandrovna – candidate of medical sciences, senior researcher of the bacteriological laboratory;
ORCID: 0000-0002-3112-4722

Колотова Ольга Николаевна – младший научный сотрудник бактериологической лаборатории;
ORCID: [0000-0002-0798-5549](https://orcid.org/0000-0002-0798-5549)

Kolotova Olga Nikolaevna – junior researcher of the bacteriological laboratory;

ORCID: [0000-0002-0798-5549](https://orcid.org/0000-0002-0798-5549)

Степанова Татьяна Федоровна – доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, Тюмень, Россия;

ORCID: [0000-0002-6289-6274](https://orcid.org/0000-0002-6289-6274)

Stepanova Tatyana Fedorovna – doctor of medical sciences, professor, director.

ORCID: [0000-0002-6289-6274](https://orcid.org/0000-0002-6289-6274)

Степанова Ксения Борисовна – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник, заведующая клиникой;

ORCID: 0000-0002-5420-0919

Stepanova Ksenia Borisovna – candidate of medical sciences, leading researcher, head of the clinic;

ORCID: 0000-0002-5420-0919

Блок 3. Метаданные статьи

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

INFLUENCE OF PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA*
COLI ON THEIR ANTAGONISTIC ACTIVITY IN OPISTHORCHIASIS
INVASION

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА *E. COLI*.

PHENOTYPIC PROPERTIES OF *E. COLI*.

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

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

Оригинальная статья.

Количество страниц текста – 11,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 3.

09.06.2023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

порядков ый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или
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 иммунобиологии. 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. <i>Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology</i> , 2021, vol. 98, no. 1, pp. 73-83. (In Russ.)	[doi.org/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 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (обзор	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 <i>P. aeruginosa</i> . <i>Hygiene and Sanitation</i> , 2020, vol. 99, no. 4, pp. 379-383. (In Russ.)	[doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-4-379-383]

	литературы) // Гигиена и санитария. 2020. Т. 99, № 4. С. 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). <i>Russian Journal of Parasitology</i> , 2020, vol. 14, no. 4, pp. 38-49. (In Russ.)	[doi.org/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. <i>Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology</i> , 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 <i>Escherichia coli</i> ,	Godovalov A.P., Ozhgibesov G.P., Nikulina E.A. The properties of <i>Escherichia coli</i> strains isolated in human inflammatory diseases. <i>The</i>	[doi: 10.20969/VSKM.2019.12(4).7-10]

	выделенных при воспалительных заболеваниях // Вестник современной клинической медицины. 2019. Т. 12, № 4. С. 7-10.	<i>bulletin of contemporary clinical medicine, 2019, vol. 12, no. 4, pp. 7-10. (In Russ.)</i>	
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. <i>Fundamental and Clinical Medicine, 2018, vol. 3, no. 4, pp. 83-92. (In Russ.)</i>	[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) //	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). <i>Modern technologies in medicine, 2019, vol. 11, no. 3, pp. 136–145. (In Russ.)</i>	[doi: https://doi.org/10.17691/stm2019.11.3.17]

	Современные технологии в медицине 2019. Т. 11, выпуск 3. С. 136-145.		
8.	Захаренко С.М. Токсин-продуцирующие <i>Klebsiella oxytoca</i> как причина антибиотик-ассоциированного колита // Альманах клинической медицины. 2018. Т. 46, № 5. С. 497-503.	Zakharenko S.M. Toxin-producing <i>Klebsiella oxytoca</i> as a cause of antibiotic-associated colitis. <i>Almanac of Clinical Medicine</i> , 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	Karaulov A.V., Afanasiev S.S., Aleshkin V.A., Bondarenko N.L., Voropaeva E.A., Afanasiev M.S., Nesvizhsky Yu.V., Aleshkin A.V., Borisov O.Yu., Ovsyannikova E.G., Rubalsky O.V., Pylev A.L., Bochkareva S.S., Serdyukov V.G., Rubalskaya E.E., Voropaev A.D., Mahmudov R.S.	[doi 10.17021/2018.13.2.17.31]

	микробиоценозах слизистых открытых полостей организма // Астраханский медицинский журнал. 2018. Т. 13, № 2. С. 17-31.	Mechanisms of virulence acquisition of opportunistic microorganisms and nosocomial strains pool formation in mucosal microbiocenoses of open cavities of the body. <i>Astrakhan medical journal, 2018, vol. 13, no. 2, pp. 17-31. (In Russ.)</i>	
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. <i>Antibiotics and Chemotherapy, 2018, vol. 63, no. 11-12, pp. 18-23. (In Russ.)</i>	-

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 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных из микробиоты больных и «практически» здоровых людей, с применением метода мультиплексной полимеразной цепной реакции // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 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., Zagaynova A.V. Multiplex PCR screening for virulence genes of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from microbiota of diseased and healthy people. <i>Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology</i> , 2022, vol. 99, no. 4, pp. 436-444. (In Russ.)	[doi.org/10.36233/0372-9311-237]
12.	Семенов А.В. Антагонизм как результат межмикробных отношений // БОНЦ УрО РАН. 2013. № 1. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/antagonizm-kak-rezultat-mezhmikrobnyh-otnosheniy (дата обращения: 05.06.2023).	Semenov A.V. Antagonism as a result cross-species interaction between microorganisms. <i>Bulletin of the Orenburg Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences</i> , 2023, no. 1. URL: https://cyberleninka.ru/article/n/antagonizm-kak-rezultat-mezhmikrobnyh-otnosheniy (Accessed 05.06.2023)	-

13.	Семенова Д.Р., Николева И.В., Фиалкина С.В., Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Валиуллина И.Р. Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами <i>Klebsiella pneumoniae</i> 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” <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains of newborns and infants with community-acquired and nosocomial klebsiella infection. <i>Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics</i> , 2020, vol. 65, no. 5, pp. 158-163. (In Russ.)	[doi.org/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 <i>Escherichia coli</i> в кишечной микрофлоре пациентов с болезнью Крона и здоровых добровольцев // Журнал	Siniagina M.N., Laikov A.V., Markelova M.I., Boulygina E.A., Khusnutdinova D.R., Abdulkhakov S.R., Grigoryeva T.V. Competitive ability of <i>Escherichia coli</i> strains in the intestinal microbiota of patients with Crohn's disease and healthy volunteers: physiological, biochemical and genetic characteristics. <i>Journal of microbiology</i> ,	[doi: 10.36233/0372-9311-192]

	микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 669-681.	<i>epidemiology and immunobiology</i> , 2022, vol. 99, no. 6, pp. 669-681. (In Russ.)	
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 opistorchiasis. <i>Medical parasitology and parasitic diseases</i> , 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 её состава путём введения антибиотиков и пробиотиков // Журнал микробиологии,	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. <i>Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology</i> , 2022, vol. 99, no. 6, pp. 722-733. (In Russ.)	[doi.org/10.36233/0372-9311-270]

	эпидемиологии и иммунобиологии. 2022. Т. 99, № 6. С. 722-733.		
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 <i>Klebsiella pneumoniae</i> у новорожденных с 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 <i>Klebsiella pneumoniae</i> in newborns with localized and generalized forms of infection. <i>Russian Bulletin of Perinatology and Pediatrics</i> , 2018, vol. 63, no. 5, pp. 139-146. (In Russ.)	[doi.org/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 <i>Enterobacteriaceae</i> : Peptide Antimicrobials in the Eco-		[doi: 10.3389/fmicb.2019.02261]

	Active Intestinal Chemosphere. <i>Front. Microbiol.</i> , 2019, vol. 10, 2261 p.		
19.	Marković K.G., Grujović M.Ž., Koraćević M.G., Nikodijević D.D., Milutinović M.G., Semedo-Lemsaddek T., Djilas M.D. Colicins and Microcins Produced by <i>Enterobacteriaceae</i> : Characterization, Mode of Action, and Putative Applications. <i>Int J Environ Res Public Health.</i> , 2022, vol. 19, no. 18, 11825 p.		[doi: 10.3390/ijerph191811825]
20.	Pakharukova M.Y., Lishai E.A., Zaparina O., Baginskaya N.V., Hong S.J., Sripa B., Mordvinov V.A. <i>Opisthorchis viverrini</i> , <i>Clonorchis sinensis</i> and <i>Opisthorchis felinus</i> liver flukes affect mammalian host microbiome in a species-specific manner. <i>PLoS Negl Trop Dis.</i> , 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 <i>Bacillus spp.</i> for efficient γ -aminobutyric acid production. <i>Microb Cell Fact</i> , 2021, vol. 20, no. 1, 153 p.		[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. <i>Microorganisms</i> , 2020, vol. 8, no. 12, 1923 p.		[doi: 10.3390/microorganisms8121923]