

УДК 579. 842.16: 616.093

## ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, КОДИРУЮЩИХ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ, ПРИ ДИСБИОТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЯХ НА ФОНЕ БЛАСТОЦИСТНОЙ ИНВАЗИИ

Бурганова Р.Ф., Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С.

ГОУ ВПО «Ульяновский государственный университет», Ульяновск, e-mail: nemova\_irina@bk.ru

С помощью ПЦР исследовали 119 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у обследованных при патологиях желудочно-кишечного тракта на фоне бластоцистной инвазии, на наличие генов, ассоциированных с факторами патогенности. Установили увеличение частоты образования искомым ампликонов, специфичных изучаемым генам клебсиелл, усиливающееся в ассоциации с бластоцистами.

**Ключевые слова:** микробиоценоз, генетические детерминанты, факторы патогенности, бактериально-протозойные ассоциации

## DETECTION OF GENES *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CODING PATHOGENIC AGENTS AT DISBIOTIC DEFECTS ON THE BACKGROUND OF BLASTOCYST INVASION

Burganova R.F., Potaturkina-Nesterova N.I., Nemova I.S.

Ulyanovsk State University, Ulyanovsk, e-mail: nemova\_irina@bk.ru

Using polymerase chain reaction (PCR) 119 strains of *K. pneumoniae* were examined. They were isolated from the patients with the digestive tract pathologies on the background of blastocyst invasion for the presence of genes associated with pathogenic factors. It was found out that the formation frequency of required amplicons which are peculiar to the examined *Klebsiella* genes was increasing. *Blastocystis hominis* in their tern also stimulate formation frequency.

**Keywords:** microbiocenosis, genetic determinants, pathogenic factors, bacteria-protozoa associations

В патогенезе развития дисбактериоза кишечника важную роль играют не только количественные и качественные изменения микрофлоры, но и «патогенный потенциал» микроорганизмов [3]. Патогенность микроорганизма является полидетерминантным признаком, который определяется совокупным действием различных факторов патогенности, присущих возбудителю.

Условно-патогенные энтеробактерии рода *Klebsiella* в последние годы привлекают внимание исследователей, так как, обладая выраженной биологической и экологической пластичностью, они могут приобретать возможность к длительному существованию в организме человека и являться причиной дисбиоза [7, 8, 9, 10]. В качестве одного из оснований этого явления рассматривают изменение патогенности этих микроорганизмов [2]. Установлено, что изменение патогенности у бактерий реализуется на генетическом уровне через мутации и генетические рекомбинации [11]. Наиболее существенными для изменения патогенности условно-патогенных энтеробактерий, ввиду «скачкообразного» характера и кардинальности происходящих превращений микроорганизма, рассматривают генетические рекомбинации, которые определяют геномную пластичность *Enterobacteriaceae*, реализуемую через несколько конкретных механизмов, связанных, в частности, с «островами» и «островками» патогенности [2].

До настоящего времени не изученными в инфекционной патологии остаются проблемы определения роли протозойно-бактериальных ассоциаций, в частности энтеробактерий рода *Klebsiella* и простейших *Blastocystis hominis*, в патогенезе смешанных инфекций и развитии бактериальных осложнений.

Изменение важных характеристик вирулентности микроорганизмов-участников симбиотических ассоциаций, наряду с их количественной оценкой, может существенно сказаться на течении заболеваний, осложнённых дисбиозом кишечника [1, 5].

Цель исследования. В связи с этим целью настоящего исследования явилось определение генов *Klebsiella pneumoniae*, кодирующих факторы патогенности, при дисбиотических нарушениях на фоне бластоцистной инвазии.

### Материалы и методы исследования

Для изучения факторов патогенности мы использовали 119 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у обследованных при патологиях желудочно-кишечного тракта на фоне бластоцистной инвазии. Группа сравнения включала 52 практически здоровых человека, репрезентативных по полу и возрасту.

Изучение микрофлоры кишечника у больных и лиц контрольной группы проводили согласно приказу Минздрава России от 09.06.2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004–2003). Наличие бластоцист выявля-

ли путем микроскопии нативных или окрашенных препаратов, приготовленных из фекалий больных. Культивирование простейших *B. hominis* проводили с использованием среды Suresh СЕМ [6, 12]. Вирулентность бластоцист определяли путем внутрибрюшинного введения белым мышам (массой  $23,1 \pm 2,2$  г) 0,5 мл взвеси культуры простейших, выращенной на среде K.Suresh. Через сутки у каждого штамма определяли величину  $LD_{50}$ . В соответствии с получаемыми показателями к высоко вирулентным относили штаммы с  $LD_{50}$  от  $10^1$  до  $10^3$  КОЕ/мл, к умеренно вирулентным – от  $10^3$  до  $10^6$  КОЕ/мл, а штаммы с  $LD_{50}$  свыше  $10^6$  КОЕ/мл считали слабовирулентными (Костюкова и др., 1996).

Тотальную бактериальную ДНК выделяли из суточной агаровой культуры, 1 мл суспензии клеток осаждали при 12000 об./мин на центрифуге. Осадок ресуспендировали и разводили в буфере, содержащем 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl (pH 8,4), 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% желатин, до конечной концентрации  $10^8$  КОЕ/мл. Лизирование осуществляли лизоцимом (Германия) в концентрации 1 мг/мл в течение 15 мин при комнатной температуре (22–25 °C) с последующим добавлением протеиназы К до конечной концентрации 200 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин при 60 °C. Для обнаружения генов, кодирующих факторы патогенности клебсиелл, использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Для этого применяли наборы НПФ «Литех», г. Москва. Хранение образцов перед использованием осуществляли при 4 °C.

Подбор праймеров и температуры отжига осуществляли при использовании пакета программ «Lasergene» (США). Используемые праймеры: *PAP C1 (f)* – 5-GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3' (65 °C); *hly A1 (f)*–5-GGTGCAGCAGAAAAGTTGTAG-3' (57 °C); *LT1 (f)*–5-ATTACGGCGTTACTATCCTC-3' (50 °C).

### Результаты исследования и их обсуждение

Из выделенных 190 штаммов *K. pneumoniae* 119 (77,8%) получены у гастроэнтерологических больных с бластоцистной инвазией (1-я группа) и 71 (78,9%) – у пациентов с таким же спектром заболеваний, но без бластоцидоза (2-я группа).

Используя набор праймеров, амплифицирующих фрагменты генов *rap C* (адгезины – пили Р), *hly A* (α-гемолизин), *elt LT-1*, *LT-2* (термалабильные энтеротоксины), были протестированы фенотипически различные *K. pneumoniae*: 119 штаммов, выделенный у гастроэнтерологических больных с бластоцистной инвазией, и 71 изолят – выделенных из консорциумов, где бластоцисты не являлись участниками микробного сообщества.

Выявление ампликонов проводили у клебсиелл, выделенных из ассоциаций с *B. hominis* различной степени вирулентности, а также после их совместного культивирования. В качестве контрольного использовали эталонный штамм *K. pneumoniae*,

содержащий гены, детерминирующие синтез факторов патогенности.

Культуры бактерий при сокультивировании с простейшими отбирались в период увеличения их численности и проявления цитопатогенного действия на клетки бластоцист.

Для детекции генов, кодирующих определенные факторы патогенности, были протестированы штаммы с праймерами к *rap C* гену. Положительный сигнал был получен в первой группе клебсиелл с 31 культурой, что составило 26,1%. В общем пуле штаммов, изолированных от больных второй группы, положительные сигналы были получены у 2 культур (2,8%).

Анализ уровня распространенности ампликонов *rap C* генов после проведенного сокультивирования представлен в табл. 1 штаммов.

**Таблица 1**  
Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей *rap C* гена у культур *K. pneumoniae*

Штаммы <i>K. pneumoniae</i> в ассоциации с бластоцистами	Совместное культивирование	Частота встречаемости фрагмента <i>rapC</i> гена (%)
Авирулентными	До сокультивирования	4,5 ± 0,4
	После 3-х суток сокультивирования	5,3 ± 0,9
Умеренно вирулентными	До сокультивирования	6,4 ± 1,1
	После 3-х суток сокультивирования	10,8 ± 0,21*
Высоковирулентными	До сокультивирования	9 ± 0,9
	После 3-х суток сокультивирования	21,8 ± 1,5*
Клебсиеллы, выделенные у больных без бластоцистной инвазии	До сокультивирования	3,4 ± 0,21
	После 3-х суток сокультивирования	10,4 ± 1,2*

Примечание: \* – показатель достоверности между показателями частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей *rap C* гена у культур *K. pneumoniae* до и после их сокультивирования с бластоцистами ( $p < 0,05$ ).

*K. pneumoniae* с бластоцистами различной степени вирулентности показал, что частота встречаемости фрагмента *rap C* гена клебсиелл была наиболее высокой после 3-х суток сокультивирования в ассоциации с высоковирулентными бластоцистами (21,8 ± 2,5%).

Наиболее значимые различия в частоте обнаружения *hly A* генов имелись у клебсиелл, выделенных совместно с вирулент-

ными бластоцистами после их совместного культивирования (рисунок).



Электрофореграмма рестрикционных профилей *hly A* гена у культур клебсиелл

Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей *hly A* гена была практически одинаковой в первой и второй группах клебсиелл (табл. 2).

Энтеротоксины (*LT*) являются основными факторами патогенности клебсиелл. Их образование кодируют хромосомные гены, они проявляют цитотоксичность в отношении клеток различных типов, вызывая приток жидкости в подслизистую оболочку кишечника [4].

Далее в собственных исследованиях изучали распространение генетических детерминант термалабильных энтеротоксинов (*elt LT-1*, *LT-2*) у клебсиелл, выделенных у гастроэнтерологических больных.

**Таблица 2**  
Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей *hly A* гена у культур *K. pneumoniae*

Штаммы <i>K. pneumoniae</i> в ассоциации	Совместное культивирование	Частота встречаемости фрагмента <i>hly A</i> гена (%)
С авирулентными бластоцистами	До сокультивирования	0,9 ± 0,3
	После 3-х суток сокультивирования	1,2 ± 0,4
С бластоцистами с умеренной вирулентностью	До сокультивирования	1,0 ± 0,3
	После 3-х суток сокультивирования	3,8 ± 0,6*
С высоковирулентными бластоцистами	До сокультивирования	1,2 ± 0,2
	После 3-х суток сокультивирования	5,3 ± 0,4*
Клебсиеллы, выделенные у больных без бластоцистной инвазии	До сокультивирования	0,8 ± 0,1
	После 3-х суток сокультивирования	1,9 ± 0,4

**Примечание:** \* – показатель достоверности между показателями частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей *hly A* гена у культур *K. pneumoniae* до и после их сокультивирования с бластоцистами ( $p < 0,05$ ).

Из общего числа бактерий при инкубации с авирулентными бластоцистами ампликоны к *elt LT-1*, *LT-2* были выявлены у 2,8 ± 0,4% и 2,5 ± 0,3% штаммов клебсиелл (табл. 3).

**Таблица 3**  
Частота встречаемости нуклеотидных последовательностей *elt LT-1*, *LT-2* генов культур *K. pneumoniae*

Штаммы <i>K. pneumoniae</i>	Период изучения	Частота встречаемости гена (%)	
		<i>elt LT-1</i>	<i>LT-2</i>
В ассоциации с авирулентными бластоцистами	До сокультивирования	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,3
	После 3-х суток сокультивирования	7,2 ± 0,7*	2,6 ± 0,5
В ассоциации с умеренными бластоцистами	До сокультивирования	4,1 ± 0,4	3,6 ± 0,4
	После 3-х суток сокультивирования	8,6 ± 0,7*	7,2 ± 0,9*
В ассоциации с высоковирулентными бластоцистами	До сокультивирования	23,4 ± 2,7	5,3 ± 1,2
	После 3-х суток сокультивирования	34,1 ± 2,1*	14,1 ± 1,3*
Клебсиеллы, выделенные у больных без бластоцистной инвазии	До сокультивирования	2,1 ± 0,9	2,3 ± 0,8
	После 3-х суток сокультивирования	12,3 ± 2,1*	13,7 ± 2,3*

**Примечание:** \* – показатель достоверности между показателями частоты встречаемости нуклеотидных последовательностей *elt LT-1* и *LT-2* генов *K. pneumoniae* до и после их сокультивирования с бластоцистами ( $p < 0,05$ ).

Частота обнаружения ампликонов, специфичных изучаемым генам после проведения совместного культивирования клебсиелл с умеренно вирулентными

бластоцистами, увеличилась в 2,1 и 2,0 раза, с высоковирулентными бластоцистами – 1,5 и 2,7 раза соответственно.

### Вывод

Штаммы клебсиелл, выделенные из испражнений гастроэнтерологических больных с бластоцистной инвазией, обладали факторами, способствующими адгезии микроорганизма на поверхности кишечного эпителия и обеспечивающими устойчивость к защитным реакциям макроорганизма и персистенцию клебсиелл в кишечнике у лиц с дисбиотическими нарушениями. В общем пуле исследуемых штаммов клебсиелл отмечено увеличение частоты образования искомым ампликонов, специфичных изучаемым генам, усиливающееся в ассоциации с бластоцистами. В работе установлено статистически достоверное увеличение встречаемости изучаемых генов *parC*, *hly A*, *elt LT-1*, *LT-2*, индуцированное усилением вирулентности симбионтов *V. hominis*.

Полученные данные свидетельствуют об изменении патогенного потенциала бактерий под воздействием ассоциантов бластоцист, приводящих к селекции и накоплению вирулентных вариантов в гетерогенной бактериальной популяции, как механизма взаимодействия и выживания в системе «хищник-жертва».

### Список литературы

1. Аклан Набила Ш.М. Распространенность и биологические свойства клебсиелл в условиях техногенной нагрузки крупного промышленного города: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Волгоград, 2006. – 23 с.
2. Бондаренко В.М. «Острова» патогенности бактерий // Микробиология. – 2001. – №4. – С. 67–74.
3. Мамбетова Э.Ф. Сравнительная характеристика некоторых биологических свойств монокультур и сокультивируемых вариаций бактерий рода *Serratia* и *Staphylococcus aureus*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Челябинск, 2007. – 21 с.
4. Поздеев, О.К., Федоров, Р.В. Энтеробактерии: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 322–349.
5. Постникова Е.А. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2004. – №1. – С. 62–67.
6. Простейшие *Blastocystis hominis* и их воздействие на макроорганизм / Н.И. Потатуркина-Нестерова, Н.В. Бугеро, Н.А. Ильина и др. – СПб.: Наука, 2009. – С. 25–30.
7. Титов Л.П., Шабан Ж.Г., Картель А.И. Использование продигозана и тактивина в лечении больных хроническими клебсиеллезами // Журн. Микробиология. – 2001. – №5. – С. 46–49.
8. Фиалкина С.В. Обнаружение маркеров островов патогенности, известных для уропатогенных эшерихий, у клинических штаммов клебсиелл // Материалы VIII съезда Всерос. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2002. – Т.3. – С. 357–358.
9. Maroncle N., Balestrino D., Rich C. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* Genes Involved in Intestinal Colonization and Adhesion Using Signature-Tagged Mutagenesis / N. Maroncle, D. Balestrino, C. Rich et al. // Infect Immun. – 2002. – Vol. 70 (8). – P. 4729–4734.
10. Niyogi S.K., Pal A, Mitra U. et. al. Enteroaggregative *Klebsiella pneumoniae* in association with childhood diarrhea // Indian J Med Res. – 2000. – Vol. 112. – P. 133–134.
11. See, K., Asher, D.M. / Multiplex PCR for detection of Enterobacteriaceae in blood // Transfusion. – 2001. – Vol. 41, №1. – P. 1356–64.
12. Tubulovesicular elements in *Blastocystis hominis* from the caecum of experimentally-infected rats / K. Suresh, S.Y. Chong, J. Howe, L.C. Ho, G.C. Ng, E.H. Yap, M. Singh // International Journal for Parasitology. – 1995. – Vol. 25. – P. 123–126.

### Рецензенты:

Нестеров А.С., д.м.н., профессор кафедры инфекционных и кожно-венерических болезней ИМЭиФК Ульяновского государственного университета, г. Ульяновск;

Ильина Н.А., д.б.н., проректор по научной работе, профессор кафедры зоологии Ульяновского государственного университета имени И.Н. Ульянова, г. Ульяновск.

Работа поступила в редакцию 28.04.2011.