

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ПАТОГЕННОСТИ *E. COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ОБСЛЕДОВАНИИ НА ДИСБИОЗ ДЕТЕЙ С ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРОДУОДЕНИТОМ И КОМОРБИДНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

© Оришак Е.А.¹, Косякова К.Г.¹, Нилова Л.Ю.¹, Листопадова А.П.², Новикова В.П.²

¹ ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет. 194100, Санкт-Петербург, ул. Литовская, д. 2

Резюме. Цель исследования — оценить частоту встречаемости патогенных *E. coli* по результатам серотипирования и молекулярнобиологического исследования чистых культур, выделенных в ходе исследования на дисбиоз у детей с хроническим гастродуоденитом и коморбидными заболеваниями. Обследовано 48 детей в возрасте от 9 до 17 лет. 1) дети с хроническим гастродуоденитом без сопутствующих заболеваний — ХГД (22 человека); 2) дети с хроническим гастродуоденитом и atopическим дерматитом — ХГД+АтД (19 человек); 3) дети с хроническим гастродуоденитом и бронхиальной астмой — ХГД+БА (7 человек). Исследование на дисбиоз проводилось по ОСТ 91500.11.0004–2003. На первом этапе серотипирование выделенных 48 штаммов *E. coli* с типичными свойствами выполняли с помощью агглютинирующих эшерихиозных сывороток (Biomed, Russia). На втором этапе выделенные штаммы от всех пациентов были исследованы с помощью ПЦР. В ходе серотипирования всех выделенных 48 штаммов *E. coli* с типичными свойствами не удалось доказать наличие патогенных. В то же время, при молекулярно-биологическом исследовании из 48 изученных штаммов *E. coli* 10 изолятов обладали генами патогенности основных патогрупп: DAEC — 2 штамма, EAEC — 4, EPEC — 4 штамма, у 1 штамма выявлен ген, кодирующий рецептор к гемину. Данные результаты подтверждают необходимость ПЦР-диагностики для адекватной оценки клинических состояний, сопровождающихся дисбиозами.

Ключевые слова. *Escherichia coli*, дисбиоз, серотипирование, ПЦР, гены патогенности, хронический гастродуоденит, дети

THE IDENTIFICATION OF GENES FOR THE PATHOGENICITY OF *ESCHERICHIA COLI* FOR CHRONIC GASTRODUODENITIS AND COMORBID DISEASES ACCOMPANIED BY DYSBIOSIS IN CHILDREN

© Orishak E.A.¹, Nilova L.Ju.¹, Kosyakova K.G.¹, Listopadova A.P.², Novikova V.P.², Oganessian E.G.¹

¹ North-western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

² St. Petersburg State Pediatric Medical University. 2, Litovskaya St., St. Petersburg, 194100, Russia

Summary. The purpose of the study to reveal diarrheagenic *E. coli* in routine intestinal dysbiosis diagnostics in children are under regular medical check-up because of chronic conditions. Material & methods: For the purpose of bacteriological diagnostics of intestinal dysbiosis 9–17 years old children were examined with standard procedure. Children were subdivided into groups: 1) children with chronic gastroduodenitis — (22 patients); 2) children with atopic dermatitis (AtD) (19 patients); 3) children with bronchial asthma (7 patients). *E. coli* strains with typical properties, which isolated from feces of children in the intestinal dysbiosis diagnostics, were examined. Serotyping of *E. coli* strains was done with agglutinating sera (Ecolab, Russia). In the second stage, isolated strains from all patients were investigated by PCR. Results. In intestinal microbiota of children with chronic gastroduodenitis the changes were significant more specifically increase of staphylococci and other conditionally pathogenic microorganisms including hemolytic bacteria. In the standard bacteriological dysbiosis diagnostics 48 strains of *E. coli* strains were isolated in different groups of children who was under regular medical check-up. On the first stage of investigation serotyping of typical colonies of *E. coli* was done. For advanced study using real-time PCR isolated strains were examined. These strains were typified as DAEC (2 strain), EAEC (2 isolates), EPEC and ATEC (2 strains). 1 strain was typified as EHEC. Diarrheagenic *E. coli* with confirmed virulence coding genes were isolated in children with chronic gastroduodenitis (7 isolates) and in children AtD (4 isolates). These results confirm the need for PCR diagnosis for an adequate assessment of clinical conditions accompanied by dysbiosis.

Keyword. *Escherichia coli*, dysbiosis, serotyping, PCR, pathogenicity genes, chronic gastroduodenitis, children.

Хронический гастроуденит у детей сопровождается нарушением микробиоценоза всех биотопов ЖКТ, и в первую очередь — кишечника [1, 2]. Морфологическим изменениям кишечного эпителия и формированию как функциональной (постинфекционный СРК), так и хронической патологии ЖКТ способствуют перенесенные кишечные инфекции [3–5]. Наиболее типичные изменения микробиоты при ХГД — переход в доминирующую группу условно-патогенных микроорганизмов [6], среди которых особый интерес вызывают *E. coli*.

Эти бактерии представляют собой компоненты нормобиоты человека [7], однако некоторые штаммы видов являются патогенами, связанными с кишечными или внекишечными заболеваниями [8–11]. Возбудителей кишечных эшерихиозов в соответствии с Рекомендациями ВОЗ называют диареогенными (*Diarrheagenic E. coli*). Они принадлежат к семейству *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichia*, в состав которого входит лишь один вид *E. coli*. [11]. Диареогенные *Escherichia coli* часто встречаются у детей в виде клинически манифестных проявлений инфекционного процесса, особенно у детей младшего возраста, или носительства, преимущественно у детей старшего возраста [11]. Предыдущие исследования показали, что патогенез заболеваний связан с наличием у *E. coli* кишечных маркеров вирулентности [8, 9, 12, 13]. В последние годы активно изучаются гены, определяющие патогенность микроба [14–16]. Показано, что у детей определяется меньшее, чем у взрослых, разнообразие генов патогенности; их накопление происходит с возрастом, под влиянием различных факторов [16]. Было обнаружено, что целый ряд генов патогенности, таких как гены, кодирующие фимбриальные адгезины, транспорт железа, протектины или токсины, обнаруживаются не только у патогенных микроорганизмов, но также в микрофлоре здоровых людей [9, 13, 17–19]. Предполагается, что эти гены помогают кишечной палочке колонизировать кишечник человека и предлагается рассматривать их, как приспособительный фактор, при наличии которого побочным эффектом является вирулентность [18–20]. В то же время, при снижении резистентности организма, даже непатогенные *E. coli* становятся патогенами, выходя за пределы своего биотопа и вызывая аутоинфекционные и экзотестинальные эшерихиозы [21–26]. Патогенные свойства *E. coli* обнаруживали при дисбиозах на фоне хронической соматической патологии у детей разного возраста [27–30].

ЦЕЛЬ

Оценить частоту встречаемости патогенных *E. coli* по результатам серотипирования и молекулярнобиологического исследования чистых культур, выделенных в ходе исследования на дисбиоз у детей с хроническим гастроуденитом и коморбидными заболеваниями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 48 детей в возрасте от 9 до 17 лет. У всех пациентов морфологическим методом был верифицирован диагноз хронический гастроуденит. В зависимости от наличия коморбидной патологии, пациенты были разделены на группы:

- дети с хроническим гастроуденитом без сопутствующих заболеваний — ХГД (22 человека);
- дети с хроническим гастроуденитом и атопическим дерматитом — ХГД+АтД (19 человек);
- дети с хроническим гастроуденитом и бронхиальной астмой — ХГД+БА (7 человек).

Исследование на дисбиоз проводилось по ОСТ 91500.11.0004–2003. На первом этапе серотипирование выделенных 48 штаммов *E. coli* с типичными свойствами выполняли с помощью агглютинирующих эшерихиозных сывороток (Biomed, Russia). На втором этапе выделенные штаммы от всех пациентов были исследованы с помощью ПЦР. Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры *E. coli* с использованием комплекта реагентов «Рибо-преп» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Выявляли специфические геномные последовательности ЕРЕС, STEC, EA_gEC, ETEC, NFEC, DAEC, EIEC и рецепторов к гемину методом ПЦР-РВ с использованием праймеров и реагентов, изготовленных компанией BioBeagle (Санкт-Петербург, Россия), и анализатора CFX 96 (BioRad, США).

Результаты обработаны методами параметрической и непараметрической статистики с помощью программ: SPSS 20 версии для статистического анализа и MS Office Excel 2007.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее выраженные дисбиотические состояния отмечались преимущественно у детей с ХГД, только у которых выявлялись гемолитические эшерихии (ХГД — 8%; ХГД+АтД — 0% и ХГД+БА — 0%; $p>0,05$), условно-патогенные энтеробактерии и стафилококки; однако различия между группами не

Таблица 1

Выявленные методом ПЦР гены патогенности *E. coli* при дисбиозе у детей

Ген	Праймер	Выявлено, штаммов
<i>eaeA</i>	eae5'-CACACGAATAAACTGACTAAAATG-3' eae5'-AAAAACGCTGACCCGCACCTAAAT-3'	1
<i>bfpA</i>	bfp f- 5'-TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTT-3' bfp r'-5'-TTTTGTTTGTGTATCTTTGTAA-3'	4
<i>east1</i>	East1F-5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3' East1R- 5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3'	4
<i>aggA</i>	aggA-5'-AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC-3' aggA5' ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC-3'	1
<i>chuA</i>	chuA-F:TATGATGGTCAGCGTTATCGAC chuA-R: CATAGCCAGGTTGTTTGCTGTA	1
<i>afa</i>	afa f- 5'-CAGCAAAGTGAATACTCTC-3' afa r-5'-CAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG-3'	2

были статистически значимыми. В ходе серотипирования всех выделенных 48 штаммов *E. coli* с типичными свойствами не удалось доказать наличие патогенных. В то же время, при молекулярно-биологическом исследовании из 48 изученных штаммов *E. coli* 10 изолятов обладала генами патогенности основных патогрупп: DAEC — 2 штамма, EAEC — 4, EPEC — 4 штамма. Кроме того у 1 штамма выявлен ген, кодирующий рецептор к гемину. Результаты представлены в таблице 1.

Таким образом, только методом ПЦР удалось выявить 11 патогенных штаммов *E. coli* (23,9% от числа исследованных), некоторые штаммы содержали несколько генов патогенности. Данные результаты подтверждают необходимость ПЦР-диагностики для адекватной оценки клинических состояний, сопровождающихся дисбиозами [28–30]. *E. coli* с указанными генами были выделены у детей из группы с ХГД (6 штаммов) и 5 — из группы детей с АтД (см таблицу 2). У детей с ХГД и сопутствующей БА не выявлено штаммов, имеющих гены патогенности.

Известно, что для пациентов с бронхиальной астмой характерно снижение бактериального разнообразия и титра кишечных бактерий [31], формирующееся в раннем детстве и способствующее нарушению иммунного ответа при БА. Учитывая отсутствие статистически значимых различий между группами с различной нозологией, считаем, что требуются дальнейшие изучения для подтверждения тезиса нозоспецифичности микробиоты при различных заболеваниях [32].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Детекция генов факторов патогенности эшерихий в том или ином формате должна быть внедрена в рутинные исследования для оценки этиологической значимости последних даже в тех случаях, когда мы имеем дело с нетипируемыми эшерихиями, но при этом практика клинициста указывает на вероятностную роль микроорганизмов в манифеста-

Таблица 2

Выявленные патовары и гены патогенности *E. coli* у детей с хроническим гастроуденитом и коморбидной патологией

Патовар	Ген	Диагноз/число наблюдений		
		ХГД (22)	АтД (19)	БА (7)
Степень дисбиоза		2,3	1,2,3	2,3
ЕАЕС (ЭАКП) — энтероагрегативные КП, обладающие способностью вызывать заболевание, как правило, у лиц с ослабленной сопротивляемостью к инфекции	<i>agg</i> отвечает за прикрепление фимбрий I типа к клеткам	2	1	0
	<i>East</i> кодирует продукцию термостабильного энтеротоксина	0	1	0
ДАЕС(ДАКП) — диффузно-адгезивные кишечные палочки, характеризующиеся наличием гена <i>afa</i>	<i>afa</i> кодирует продукцию афимбриальных адгезинов	2	0	0
ЕРЕС(ЭПКП) — энтеропатогенные кишечные палочки и АТЕС	<i>bfpA</i> кодирует пили А, которые участвуют в прикреплении бактерий к энтероцитам	2	1	0
ЕНЕС(ЭГКП) — энтерогеморрагические кишечные палочки, вызывающие заболевания, похожие на дизентерию Григорьева-Шига		0	1	0
Эшерихии, выделенные от пациентов с болезнью Крона-AIEC (Adherent-Invasive <i>E. coli</i>)	<i>chuA</i> ген, кодирующий продукцию белка, участвующего в транспорте гема у <i>E. coli</i> O157: H7	1	0	0

ции некоторых заболеваний. Наш опыт говорит о необходимости более тесного сотрудничества микробиологов и клиницистов в разработке алгоритмов диагностики ОКИ и разработке новых подходов к изучению микробиоты кишечника.

ЛИТЕРАТУРА

- Барышникова Н.В., Гурова М.М., Иванова И.И., Кузьмина Д.А., Мельникова И.Ю., Новикова В.П., Осипов Г.А., Петровский А.Н., Самсонова М.В., Суворов А.Н., Суворова М.А., Успенский Ю.П., Цех О.М., Червинец В.М., Шабалов А.М. Микробиота желудочно-кишечного тракта при хроническом гастрите. Под редакцией А.Н. Суворова, В.П. Новиковой, И.Ю. Мельниковой. Санкт-Петербург, 2014.
- Листопадова А.П., Бурцева Т.И., Уразгалиева И.А., Новикова В.П. Заболевания желудочно-кишечного тракта и синдром избыточного бактериального роста у детей. Медицина: теория и практика. 2018. Т. 3. № 1. С. 57.
- Бельмер С.В., Разумовский А.Ю., Хавкин А.И., Алхасов А.Б., Бехтерева М.К., Волюнец Г.В., Воронин В.А., Воронцова Л.В., Воронцова Л.В., Гасилина Т.В., Голованев М.А., Гончар Н.В., Гуревич А.И., Дронов А.Ф., Ермоленко К.Д., Залихин Д.В., Иванов Д.О., Ионов А.Л., Калинина Е.Ю., Комарова О.Н. и др. Болезни кишечника у детей. Москва, 2018. Том 1
- Новикова В.П., Комиссарова М.Ю., Юрьев В.В., Калинина Е.Ю., Абдул Саттар Ж. Морфологическое состояние двенадцатиперстной кишки у детей, перенесших острые кишечные инфекции с синдромом энтерита. Медлайн-экспресс. 2005. № 3 (179). С. 36–38.
- Новикова В.П., Цех О.М., Калинина Е.Ю., Оришак Е.А. Строение слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки и синдром избыточного бактериального роста при хроническом гастродуодените. Профилактическая и клиническая медицина. 2011. № 3 (40). С. 119–124.
- Оришак Е.А., Нилова Л.Ю., Авалуева Е.Б., Бойцов А.Г. Условно-патогенные микроорганизмы при дисбактериозе кишечника. Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2010. Т. 17. № 2. С. 24–27.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8:207–217. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004;2:123–140. doi: 10.1038/nrmicro818.
- Köhler C.D., Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int. J. Med. Microbiol.* 2011;301:642–647. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
- Kosek M., Bern C., Guerrant R.L. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bull. World Health Organ.* 2003;81:197–204.
- Бехтерева М.К., Ныркова О.И., Хорошева Т.С., Лукьянова А.М., Кветная А.С., Партина И.В., Гостевой В.В., Птичникова Н.Н. Эшерихиозы у детей. В сборнике: Современные подходы к диагностике, терапии и профилактике инфекционных заболеваний у детей Научные труды. Санкт-Петербург, 2012. С. 367–390.
- Nataro J.P., Kaper J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11:142–201.
- Leimbach A., Hacker J., Dobrindt U. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2013;358:3–32.
- Tenaillon O., Skurnik D., Picard B., Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010 Mar;8(3):207–17. doi: 10.1038/nrmicro2298.
- Baldy-Chudzik K., Bok E., Mazurek J. Well-known and new variants of pathogenic *Escherichia coli* as a consequence of the plastic genome. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Mar 17;69:345–61.
- Ewa Bok., Justyna Mazurek, Andrzej Myc, Michał Stosik, Magdalena Wojciech, Katarzyna Baldy-Chudzik. Comparison of Commensal *Escherichia coli* Isolates from Adults and Young Children in Lubuskie Province, Poland: Virulence Potential, Phylogeny and Antimicrobial Resistance *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Apr; 15(4): 617.
- Starčič E.M., Žgur-Bertok D. Virulence potential for extraintestinal infections among commensal *Escherichia coli* isolated from healthy humans—The Trojan horse within our gut. *FEMS Microbiol. Lett.* 2015;362 doi: 10.1093/femsle/fnu061.
- Nowrouzian F.L., Adlerberth I., Wold A.E. Enhanced persistence in the colonic microbiota of *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2: Role of virulence factors and adherence to colonic cells. *Microbes Infect.* 2006;8:834–840. doi: 10.1016/j.micinf.2005.10.011.
- Nowrouzian F.L., Wold A.E., Adlerberth I. *Escherichia coli* strains belonging to phylogenetic group B2 have superior capacity to persist in the intestinal microflora of infants. *J. Infect. Dis.* 2005;191:1078–1083. doi: 10.1086/427996
- Le Gall T., Clermont O., Gouriou S., Picard B., Nassif X., Denamur E., Tenaillon O. Extraintestinal virulence is a coincidental by-product of commensalism in B2 phylogenetic group *Escherichia coli* strains. *Mol. Biol. Evol.* 2007;24:2373–2384. doi: 10.1093/molbev/msm172.
- Caugant D.A., Levin B.R., Selander R.K. Genetic diversity and temporal variation in the *E. coli* population of a human host. *Genetics*. 1981;98:467–490.
- Al-Mayahie S.M.G., Al-Khafajy A.A.M., Dosh N.A.S., Al-Rekabi A.R.K., Al-Atabie A.G.N. Phylogenetic grouping of dominant fecal *Escherichia coli* isolates from healthy males and females in Al-Kut/Wasit Province/Iraq. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2015;6 doi: 10.4172/2155–9597.1000215.
- Ostblom A., Adlerberth I., Wold A.E., Nowrouzian F.L. Pathogenicity island markers, virulence determinants *malX* and *usp*, and the capacity of *Escherichia coli* to persist in infants' commensal microbiotas. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77:2303–2308. doi: 10.1128/AEM.02405–10.[
- Johnson J.R., Oswald E., O'Bryan T.T., Kuskowski M.A., Spanjaard L. Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 2002;185:774–784. doi: 10.1086/339343.
- Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.* 2000;181:261–272. doi: 10.1086/315217.
- Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J., Denamur E. The link between

- phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 1999;67:546–553.
27. Orishak E.A., Nilova L.Ju., Kosyakova K.G., Listopadova A.P., Novikova V.P., Oganessian E.G. *E. coli* in children with dysbiosis. Abstract supplement for NeuroGASTRO 2018 Congress 29 August –2 september 2018, Amsterdam, Netherlands, <https://www.fnm2018.org/scientific-programme/online-program.html#/details/abstract/2146>.
28. Оришак Е.А., Нилова Л.Ю., Оганесян Э.Г., Косякова К.Г., Немытько ЮА., Торопова Е.В., Каменева О.А., Мельникова Г.С. Серотиповой состав и патогруппы штаммов *Escherichia Coli*, выделенных от детей с дисбиозами. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Под редакцией профессора, доктора медицинских наук А.Ю. Поповой Москва, 16–17 ноября 2017 года. С. 441.
29. Оришак Е.А., Нилова Л.Ю., Косякова К.Г., Листопадова А.П., Новикова В.П., Оганесян Э.Г. Диареогенные *Escherichia coli*, выделенные при диагностике дисбиоза у детей с хроническими заболеваниями. Проблемы медицинской микологии. Т. 20. № 2. С. 100.
30. Нилова Л.Ю., Оришак Е.А., Новикова В.П., Листопадова А.П., Оганесян Э.Г. Кишечный микробиоценоз у детей с хроническими заболеваниями. Проблемы медицинской микологии. Т. 20. № 2. С. 99.
31. Новикова В.П., Листопадова А.П., Косенкова Т.В., Павлова С.Е., Демченкова О.А. Кишечная микробиота у детей с бронхиальной астмой. Профилактическая и клиническая медицина. 2017. № 4 (65). С. 30–34.
32. Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Новикова В.П., Гриневич В.Б., Федосова Н.Ф., Цех О.М., Токарева Е.В., Земскова Е.А. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Санкт-Петербург, 2013.