

göttingen minipigs in the Context of xenotransplantation: Detection and vertical transmission of hepatitis E virus. PLoS One. 2015, 14; 10 (10): e0139893. doi: 10.1371/journal.pone.0139893.

12. Rein D.B., Stevens G.A., Theaker J. et al. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. Hepatology 2012, 55: 988-997.
13. Tang Z-M., Wang S-L., Ying D. et al. The Bama miniature swine is susceptible to experimental HEV infection. Sci. Rep. 2016, 6:31813. doi:10.1038/srep31813.
14. Zhang J., Ge S.X., Huang G.Y. et al. Evaluation of antibody-based and nucleic acid-based assays for diagnosis of hepatitis E virus infection in a rhesus monkey model. J. Med. Virol. 2003, 71: 518-526.

Поступила 28.12.16

Контактная информация: Гуляев Станислав Анатольевич,  
142782, поселение Московский, поселок института полиомиелита,  
27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-19-07

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*М.А.Макарова, Л.В.Сужаева, Л.А.Кафтырева*

## **ДЕТИ РАННЕГО ВОЗРАСТА С ДИСБИОЗОМ КИШЕЧНИКА КАК НОСИТЕЛИ ЭНТЕРОАГГРЕГАТИВНЫХ *ESCHERICHIA COLI***

НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург

*Цель.* Изучение распространенности диареогенных *E. coli* энтероаггративной группы у детей с дисбиозом кишечника. *Материалы и методы.* Методом ПЦР были изучены факторы вирулентности у 511 штаммов *E. coli*, выделенных при бактериологическом исследовании проб фекалий 393 детей в возрасте до 2 лет. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом, интерпретация результатов — согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г. *Результаты.* Идентифицированы 23 штамма энтероаггративных *E. coli* (EAggEC). Все штаммы содержали ген *aaf*, кодирующий агрегативно-адгезивные фимбрии и четыре других гена (*aggR*, *ast*, *aap*, *aatA*) в различных комбинациях, кодирующие факторы вирулентности EAggEC. 19 штаммов (87%) были нечувствительны к антимикробным препаратам. Резистентность к цефалоспорином расширенного спектра была обусловлена продукцией бета-лактамазой расширенного спектра (БЛРС) генетического семейства СТХ-М и цефалоспоринозой AmpC. *Заключение.* Результаты исследования показали, что 6 % детей с дисбиозами кишечника являются носителями EAggEC, что свидетельствует о необходимости детекции штаммов EAggEC — новой группы диареогенных *E. coli* не только у пациентов с диарейным синдромом, но и при дисбиозе кишечника.

Журн. микробиол., 2017, № 4, С. 54—58

Ключевые слова: энтероаггративные *Escherichia coli* (EAggEC), факторы вирулентности, резистентность к антимикробным препаратам, дети

*М.А.Макарова, Л.В.Сужаева, Л.А.Кафтырева*

## **YOUNG AGE CHILDREN WITH INTESTINE DYSBIOSIS AS CARRIERS OF ENTEROAGGREGATIVE *ESCHERICHIA COLI***

Pasteur St. Petersburg Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia

*Aim.* Study the prevalence of diarrhea-genic *E. coli* of the enteroaggregative group in children with intestine dysbiosis. *Materials and methods.* PCR method was used to study virulence factors in 511 strains of *E. coli* isolated during bacteriologic study of feces samples from 393 children aged

less than 2 years. Sensitivity to antibiotics was determined by disc-diffusion method, results interpretation — according to clinical recommendations Determination of sensitivity of microorganisms to antimicrobial preparations, 2015. *Results.* 23 enteroaggregative *E. coli* strains were identified (EAggEC). All the strains had aaf gene coding aggregative-adhesion fimbriae and 4 other genes (aggR, ast, aap, aatA) in various combinations coding virulence factors EAggEC. 19 strains (87%) were not sensitive to antimicrobial preparations. Resistance to extended spectrum cephalosporins was determined by the production of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) of CTX-M genetic family and AmpC cephalosporinase. *Conclusion.* Results of the study have shown that 6% of children with intestine dysbiosis are EAggEC carriers, that gives evidence on the necessity of detection of EAggEC strains — a novel group of diarrhea-genic *E. coli* not only in patients with diarrhea syndrome, but also using intestine dysbiosis.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 4, P. 54—58

Key words: entero-aggregative *Escherichia coli* (EAggEC), virulence factors, resistance to antimicrobial preparations, children

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что патогенные для человека штаммы *E. coli* отличаются от типичных представителей нормальной микробиоты кишечника наличием генов вирулентности, которые определяют особенности патогенеза и клинических проявлений эшерихиозов. В настоящее время установлено, что *E. coli* — возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) подразделяются на шесть групп [7]. Представители каждой группы различаются по ключевым механизмам патогенеза и наличию специфических факторов вирулентности, делающих возможной их реализацию: энтеропатогенные (ЕРЕС), энтероинвазивные (ЕИЕС), энтеротоксигенные (ЕТЕС), энтерогеморрагические (ЕНЕС), энтероагрегативные (ЕАggЕС), диффузно-адгерентные (ДАЕС).

Энтероагрегативные *E. coli* (ЕАggЕС) как возбудители диарейных заболеваний являются новой, мало изученной группой диареогенных *E. coli* (ДЕС), способные вызывать персистирующие диареи, продолжающиеся более 14 дней. С середины 80-х годов эти возбудители выделены в отдельную группу в пределах ДЕС [6, 7, 8]. Эпидемиологические исследования, проведенные во многих странах, свидетельствуют о том, что ЕАggЕС являются возбудителями спорадических случаев ОКИ и групповых вспышек среди детей и взрослых. В крупных вспышках диарейных заболеваний, обусловленных ЕАggЕС, нередко факторами передачи являются контаминированные пищевые продукты и вода. ЕАggЕС часто становятся причиной ОКИ туристов, посещающих развивающиеся страны, детей и ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в развивающихся и развитых регионах мира [5, 6]; [Jun Yatsuyanagi et al., 2002; Koichi Tokuda et al., 2010; Thiago Azevedo Feitosa Ferro et al., 2012]. Обусловленные ими заболевания характеризовались легким, но длительным течением, что связано с выраженной адгезией и колонизацией эпителиальных клеток слизистой оболочки тонкого кишечника у лиц с ослабленным иммунитетом [Koichi Tokuda et al., 2010]. Популяция штаммов ЕАggЕС, выделенных в странах, где налажена их идентификация, характеризовалась широким набором маркеров вирулентности и резистентности к антимикробным препаратам (АМП). Показано, что штаммы ЕАggЕС содержат больше маркеров резистентности к АМП, по сравнению с другими ДЕС [4]. Значимость ЕАggЕС в этиологии ОКИ у детей в нашей стране продемонстрирована в нескольких работах: в Москве и Санкт-Петербурге применение ПЦР-диагностики показало, что у госпитализированных пациентов около 30% ОКИ эшерихиозной этиологии были обусловлены ЕАggЕС, при этом классическое бактериологическое исследование показало отрицательный результат [1, 3]. Получена достоверная

информация о распространенности DEC, включая EAggEC, при других заболеваниях желудочно-кишечного тракта, в частности, при дисбиотических состояниях [2]. В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования явилось изучение распространенности диареогенных *E.coli* энтероаггегативной группы у детей с дисбиозом кишечника.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено бактериологическое исследование проб фекалий 393 детей в возрасте до двух лет согласно отраслевому стандарту 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Выделение и идентификацию штаммов *E. coli* проводили общепринятыми методами. Для дальнейшего изучения методом случайной выборки были отобраны 511 штаммов. Принадлежность к патогруппам DEC определяли набором реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» (ЦНИИ эпидемиологии) методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием амплификатора CFX 96™ Real-Time System (Bio-Rad, США). Выявление генов вирулентности EAggEC (aaf, aggR, pet, ast, aap, aatA) и генов, кодирующих продукцию бета-лактамаз, проводили, используя специфические олигонуклеотидные праймеры (ЗАО «Евроген», Москва), в ПЦР в мультиплексном формате с последующей электрофоретической детекцией [4]; [Koichi Tokuda et al., 2010]. ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I — IV групп патогенности». Чувствительность к АМП: аминокеницилинам, цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС), карбапенемам, аминогликозидам, хинолонам, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу, тетрациклину определяли диско-диффузионным методом. Интерпретацию результатов проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» 2015 г.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При бактериологическом исследовании фекалий 393 детей в возрасте до 2 лет с диагнозом «дисбиоз кишечника» штаммы *E. coli* с типичными свойствами (подвижные, лактозоположительные) обнаружили в 77% проб. Из каждой пробы были отобраны по 1 — 2 колонии (всего 511) для детекции факторов вирулентности DEC. У 40 (10,2%) детей в геномах штаммов методом ПЦР-РВ с использованием набора реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» идентифицированы гены вирулентности, характерные для DEC (EPEC — 3,0%; EAggEC — 5,9%; DAEC — 1,3%). Гены вирулентности ETEC, EIEC и EHEC не были обнаружены. Детальному изучению были подвергнуты 23 штамма *E. coli*, идентифицированные как EAggEC, присутствующие в фекалиях детей в значительном количестве от  $10^5$  до  $10^9$  КОЕ/г. Идентифицировать серологическую группу выделенных EAggEC отечественным набором диагностических ОК-сывороток не удалось, так как штаммы не агглютинировались в ОК-сыворотках в реакции агглютинации, развернутой и на стекле. Штаммы имели различия по ферментации лактозы и сахарозы, подвижности и гемолитической активности. Более 90% были подвижные с типичными ферментативными свойствами.

Используя специфические олигонуклеотидные праймеры в мультиплексном формате ПЦР с последующей электрофоретической детекцией, мы выявили гены вирулентности EAggEC: aaf, aggR, aap, aatA, ast (табл.). Все штаммы имели основной ген aaf, кодирующий агрегативно-адгезивные фимбрии, и четыре других гена в различных комбинациях, которые кодируют факторы

вирулентности: *aggR* — активатор транскрипции, необходимый для экспрессии фимбрий (21 штамм — 91,3%), *aar* — секреторный белок дисперзин (21 штамм — 91,3%), *aatA* — эффлюксный белок (21 штамм — 91,3%), *ast* — термостабильный энтероагрегативный (EAST-1) токсин (6 штаммов — 26,3%). Ген *pet*, ответственный за продукцию термолабильного токсина в изучаемых штаммах, не был обнаружен.

Выявлены четыре комбинации генов вирулентности в штаммах EAggEC. В 23 штаммах EAggEC присутствовали от

одного (*aaf*) до пяти генов вирулентности. Большая часть штаммов (65,2%) содержала четыре гена при отсутствии гена, ответственного за продукцию EAST-1. Шесть штаммов (26,1%) содержали пять генов (*aaf*, *aggR*, *aar*, *aatA*, *ast*), в одном штамме (4,3%) присутствовали три гена (*aaf*, *aar*, *ast*).

Четыре штамма (17,4%) EAggEC характеризовались чувствительностью к 14 тестируемым АМП. Остальные 19 штаммов были нечувствительны к различным АМП (бета-лактамам, хлорамфениколу, ко-тримоксазолу, тетрациклину, налидиксовой кислоте, гентамицину и тобрамицину, но сохраняли чувствительность к карбапенемам, фторхинолонам и амикацину. Каждый второй штамм (56,5%) характеризовался множественной устойчивостью к АМП. Резистентность к ЦРС была обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) генетического семейства СТХ-М и продукцией *AmpC* — цефалоспорины. БЛРС продуцирующие штаммы характеризовались сочетанной резистентностью к ко-тримоксазолу, хлорамфениколу и тетрациклину.

*E. coli* являются представителями нормальной факультативно-анаэробной микрофлоры толстого кишечника человека и животных. Обоснование их этиологической значимости при ОКИ, даже при массивном выделении из проб фекалий, является сложной задачей и требует применения дополнительных критериев. В настоящее время рутинная лабораторная диагностика, основанная на определении принадлежности штаммов *E. coli* к серологической O-группе, не позволяет достоверно оценить этиологическую значимость их при ОКИ. Наши исследования показали, что 6,0% детей раннего возраста, страдающие «дисбиотическим состоянием кишечника», являются бактерионосителями EAggEC, которые находятся в фекалиях в значительном количестве —  $10^5$  —  $10^9$  КОЕ/г. Штаммы содержали комплекс генов вирулентности и по этой характеристике соответствовали EAggEC, циркулирующим в разных

Гены вирулентности штаммов EAggEC

Штаммы EAggEC	гены вирулентности					
	<i>aggR</i>	<i>aaf</i>	<i>aar</i>	<i>aatA</i>	<i>pet</i>	<i>ast</i>
1	+	+	+	+	—	—
2	+	+	+	+	—	+
3	+	+	+	+	—	—
4	+	+	+	+	—	+
5	+	+	+	+	—	—
6	+	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	—	—
8	+	+	+	+	—	—
9	—	+	—	—	—	—
10	+	+	+	+	—	+
11	+	+	+	+	—	+
12	+	+	+	+	—	—
13	—	+	+	—	—	+
14	+	+	+	+	—	—
15	+	+	+	+	—	—
16	+	+	+	+	—	—
17	+	+	+	+	—	—
18	+	+	+	+	—	—
19	+	+	+	+	—	—
20	+	+	+	+	—	—
21	+	+	+	+	—	—
22	+	+	+	+	—	—
23	+	+	+	+	—	—
Всего	21 (91,3%)	23 (100%)	21 (91,3%)	21 (91,3%)	0	6 (26,3%)

Примечание. + Ген присутствует в геноме штамма; — ген отсутствует в геноме штамма.

странах [4]; [Koichi Tokuda et al., 2010]. Выделенные нами подвижные, лактозоположительные штаммы EAggEC по существующим критериям оценки Отраслевого стандарта 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» расцениваются как представители нормальной факультативно-анаэробной микробиоты кишечника человека, а пациенты, являющиеся реальными источниками патогенных *E.coli*, резистентных к АМП, продуцирующих БЛРС, остаются вне поля зрения клиницистов, инфекционистов и эпидемиологов — не получают адекватной этиотропной терапии, эпидемиологи не проводят профилактические мероприятия по ограничению циркуляции данных возбудителей.

Идентификация EAggEC в настоящее время невозможна без детекции генов вирулентности. При проведении диагностических исследований классическим бактериологическим методом скрининг на носительство DEC не может быть проведен из-за отсутствия необходимого большого набора сывороток для типирования O- и H-антигенов, что, в свою очередь, связано с высокими экономическими и трудозатратами. В России разработаны тест-системы для ПЦР-диагностики DEC, включая EAggEC, но в рутинной лабораторной практике этот метод пока используется в ограниченном объеме [1, 3]. Методы с использованием некультуральных методик, такие как ПЦР, дают большие надежды на повышение чувствительности и достоверности диагностического исследования. Рутинные исследования, традиционно считающиеся «золотым стандартом», будут иметь решающее значение для определения чувствительности к АМП.

*Три штамма EAggEC, впервые выделенные в России, депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (№ В-7739, 7740, 7741).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Горелов А. В., Бондарева А. В., Подколзин А.Т. Клинико-эпидемиологическая характеристика энтероагрегативного эшерихиоза у детей. *Инфекционные болезни*. 2013, 11 (3): 22-26.
2. Оришак Е.А., Щеглов В.С., Бойцов А.Г. Обоснование расширения спектра выявляемых микроорганизмов при исследовании на дисбиоз кишечника. *Проблемы медицинской микологии*. 2013, 15 (3): 18-21.
3. Соколова Е. Д., Галтаева А. М., Замурий О. Ю., Дидиченко О. В., Соколова Ю. В., Муратова В. А., Лигорова О. Ю., Журавлева И. Н., Макарова М. А., Кафтырева Л. А. Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы. *Инфекция и иммунитет*. 2016, 6 (3): 225-231.
4. Aslani M. M., Alichani M. Y., Zavari A. et al. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int. J. Infect. Dis.* 2011, 15 (2): 136-139.
5. Geser N., Stephan R., Korczak B. M. et al. Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56: 1609-1612.
6. Knutton S., Shaw R., Phillips A. D. et al. Phenotypic and genetic analysis of diarrhea-associated *Escherichia coli* isolated from children in the United Kingdom. *J. Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2001, 33 (1): 32-40.
7. Nataro J. P., Kaper J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, 11 (1): 142-201.
8. Nataro J. P., Steiner T., Guerrant R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*. 1998, 4 (2): 251-261.

*Поступила 20.02.17*

Контактная информация: Макарова Мария Александровна, к.м.н., 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812) 232-48-83