

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ РОССИИ

© 2021 г. ¹Т. С. Коменкова, ¹Е. А. Зайцева, ²А. М. Шадрин

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований
Российской академии наук», г. Пушкино

Введение: Наиболее типичным возбудителем инфекций мочевыводящих путей (ИМП) является *Escherichia coli*, однако в Приморском крае России среди детей и новорожденных наиболее распространенным возбудителем ИМП является *Enterococcus faecalis*.

Цель: Генотипирование и тестирование наличия генов факторов патогенности у изолятов *E. faecalis*, выделенных у детей при ИМП в Приморском крае Дальневосточного региона России.

Методы: Представлены результаты детальной характеристики 42 клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных в период с 2013 по 2017 год при ИМП из мочи у детей в возрасте до 16 лет. Филогенетическое разнообразие штаммов было определено с помощью метода multilocus sequence typing (MLST). В изолятах методом полимеразной цепной реакции было протестировано наличие шести генов факторов патогенности (*cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*).

Результаты: Среди *E. faecalis* встречаемость генов патогенности *cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE* и *esp* составила 50,0, 80,95, 100, 100, 76,2 и 71,4 % соответственно. Определено одиннадцать вариантов сочетания изучаемых генов, среди которых наиболее распространены (*aggA*, *cylA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*) и (*aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*). Среди уропатогенных *E. faecalis* выявлено четырнадцать сиквенс-типов (ST6, ST16, ST21, ST25, ST40, ST41, ST64, ST116, ST133, ST151, ST179, ST480, ST537, ST774) с преобладанием ST179, ST774, ST6.

Выводы: Выявленное разнообразие сиквенс-типов указывает на генетическую неоднородность уропатогенных энтерококков, выделенных в Приморском крае. Наличие большого числа генов патогенности и их комбинаций способствует преобладанию *E. faecalis* в регионе как клинически значимого этиологического агента ИМП у детей. Выявление высоковирулентных сиквенс-типов, таких как *E. faecalis* ST6, ST179 и ST774, подчеркивает важность проведения дальнейших исследований для определения структуры популяции энтерококков.

Ключевые слова: *Enterococcus faecalis*, генетическая вариабельность, MLST, гены патогенности, инфекция мочевыводящих путей

GENETIC DIVERSITY OF *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATES FROM CHILDREN WITH URINARY TRACT INFECTION IN PRIMORSKY KRAI OF RUSSIA

¹T. S. Komenkova, ¹E. A. Zaitseva, ²A. M. Shadrin

¹Pacific State Medical University, Vladivostok; ²Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Background: *Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections (UTI). However, *Enterococcus faecalis* has been shown to be the most common causative agent of UTI among children and newborns in Primorsky Krai of Russia warranting further research.

Aim: To study the occurrence of pathogenicity factor genes in the *E. faecalis* isolates from children with UTI in the Primorsky Krai of the Russian Far East.

Methods: Forty-two *E. faecalis* clinical isolates from children under the age of 16 with UTI identified in 2013-2017 were studied. Phylogenetic diversity of the strains was assessed by the multilocus sequence typing. Six genes, namely, *cylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp* were tested in the isolates by polymerase chain reaction.

Results: *CylA*, *aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE* and *esp* genes occurred in 50.0 %, 80.95 %, 100 %, 100 %, 76.2 % and 71.4 % of the isolates, respectively. Eleven different gene variants were detected for the combination of pathogenicity factor genes. The most common gene variants were (*aggA*, *cylA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*) and (*aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*). Among the uropathogenic *E. faecalis*. Fourteen sequence-types were identified (ST6, ST16, ST21, ST25, ST40, ST41, ST64, ST116, ST133, ST151, ST179, ST480, ST537, ST774), with ST179, ST774, ST6 being the most common.

Conclusions: The identified diversity of sequence-types indicates the genetic heterogeneity of uropathogenic enterococci isolated in the Primorsky Krai. The detection of a large amount of pathogenicity factors and their combinations causes the predominance of *E. faecalis* in the region as a clinically relevant etiological agent of UTI among children. The identification of highly virulent sequence types such as *E. faecalis* ST6, ST179 and ST774 warrants further research to determine the population structure of enterococci.

Key words: *Enterococcus faecalis*, genetic diversity, MLST, pathogenicity genes, urinary tract infection

Библиографическая ссылка:

Коменкова Т. С., Зайцева Е. А., Шадрин А. М. Генетическая вариабельность *Enterococcus faecalis*, выделенных от детей с инфекцией мочевыводящих путей в Приморском крае России // Экология человека. 2021. № 12. С. 49–55.

For citing:

Komenkova T. S., Zaitseva E. A., Shadrin A. M. Genetic Diversity of *Enterococcus faecalis* Isolates from Children with Urinary Tract Infection in Primorsky Krai of Russia. *Ekologiya cheloveka (Human Ecology)*. 2021, 12, pp. 49-55.

Введение

Энтерококки составляют неотъемлемую часть кишечной микрофлоры многих беспозвоночных, птиц и млекопитающих, включая человека [27]. Роль энтерококков заключается в поддержании микробного гомеостаза, стимуляции иммунной модуляции и предотвращении развития инфекций патогенными бактериями и вирусами [4]. С другой стороны, энтерококки, в частности *Enterococcus faecalis*, все чаще занимают лидирующую позицию в этиологии различных заболеваний, в том числе инфекций мочевыводящих путей (ИМП) [1–3]. Так, в Приморском крае, по данным Краевой детской клинической больницы № 1 (Владивосток) за 2007–2015 годы, в отделении новорожденных *E. faecalis* имел первостепенное значение в развитии ИМП, выявляясь в диапазоне от 30,8 до 74,5 % случаев, с тенденцией роста в 2015 году [3].

Рост заболеваемости энтерококковыми инфекциями связывают с различными факторами патогенности, в том числе с генами вирулентности, которые могут инициировать инфекционный процесс [11]. Цитолизин (Cyl) — токсин белковой природы, обладающий цитолитической (в отношении прокариотических и эукариотических клеток), гемолитической и бактерицидной активностью [4]. Многочисленные исследования доказали наличие связи между экспрессией цитолизина и повышенной тяжестью инфекции, вызванной *E. faecalis* [9, 10].

Группа гидролитических ферментов, включающая гиалуронидазу (Hyl), желатиназу (GelE) и сериновую протеазу (SprE), также увеличивает вирулентность энтерококков. Данные протеазы участвуют в инвазии и транслокации *E. faecalis*, а также в распространении их токсинов через ткань хозяина [16].

Поверхностно-опосредованная белковая адгезия к тканям хозяина приводит к энтерококковой колонизации и последующему образованию биопленки, воспалению и развитию инфекции. Примерами поверхностно-экспонированных маркеров вирулентности *E. faecalis* являются капсульные полисахариды, гликолипиды, коллаген-связывающий белок (Ace), пили, ассоциированные с развитием эндокардита и биопленки (Ebp), агрегационные вещества (AS, Agg) и др. [18, 10, 29]. Известно, что энтерококковый поверхностный белок (Esp) участвует в клеточной адгезии, колонизации и персистенции в мочевых путях, уклонении от иммунной системы [18]. Белок агрегации (Agg) обеспечивает адгезию *E. faecalis* к различным клеткам хозяина, в том числе клеткам почечных канальцев и энтероцитов [10].

Энтерококки известны своей способностью обмениваться генетической информацией посредством горизонтального переноса генов, благодаря чему может происходить усиление их вирулентности [11]. Кроме того, предполагается, что горизонтальный перенос генов играет ключевую роль в формировании энтерококковых геномов, бактериальной функциональности и филогении *E. faecalis* [9]. Структура популяции *E. faecalis* включает в себя множество сиквент-типов

(ST) и клональных комплексов (CC). Клональные комплексы CC2, CC9, CC16, CC30, CC40 и CC87 относятся к CC высокого риска, поскольку они в основном включают в себя изоляты, вызывающие инфекцию у госпитализированных пациентов, а также участвуют в распространении устойчивости к противомикробным препаратам [7, 14].

Однако данных о генетическом разнообразии популяции уропатогенных энтерококков на территории России недостаточно для понимания целостной картины их вклада в этиопатогенез ИМП. Таким образом, очевидна необходимость проведения глубоких исследований популяции *E. faecalis* с помощью современных методов.

Целью данной работы являлось генотипирование и тестирование наличия генов факторов патогенности у изолятов *Enterococcus faecalis*, выделенных у детей при инфекциях мочевыводящих путей в Приморском крае Дальневосточного региона России.

Методы

Исследование было одобрено Междисциплинарным комитетом по этике Тихоокеанского государственного медицинского университета (Протокол № 4 от 26 декабря 2016 г. и Протокол № 3 от 20 ноября 2017 г.). Информированное согласие на участие в исследовании было получено от родителей детей или их законных опекунов.

Изоляты *E. faecalis* (n = 42) были выделены в период с 2013 по 2017 год в краевой детской клинической больнице № 1 г. Владивостока из мочи у детей в возрасте от трех дней до шестнадцати лет с инфекциями мочевыводящих путей. Штаммы уропатогенных фекальных энтерококков были охарактеризованы нами ранее с помощью микробиологических методов [2].

Бактериальную ДНК у *E. faecalis* (n = 42) выделяли с помощью набора «ДНК-экспресс» (Литех, Москва).

Тестирование генов факторов патогенности энтерококков (n = 42) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), применяя ранее разработанные наборы праймеров (табл. 1), синтезированные

Таблица 1
Праймеры для тестирования генов факторов патогенности *E. faecalis* и параметры полимеразной цепной реакции

Ген; размер фрагмента (bp)	Последовательность ДНК	Температура отжига	Ссылка
<i>cylA</i> ; 517	TGGATGATAGTGATAGGAAGT TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	57 °C	[5]
<i>aggA</i> ; 1553	AAGAAAAAGTAGACCAAC AACGGCAAGACAAGTAAATA	52 °C	[5]
<i>efaA</i> ; 705	GACAGACCCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGCTGTAGTA	52 °C	[5]
<i>eep</i> ; 937	GAGCGGGTATTTTAGTTCGT TACTCCAGCATTGGATGCT	58 °C	[5]
<i>esp</i> ; 933	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	62 °C	[5]
<i>gelE</i> ; 419	ACCCCGTATCATTTGGTTT ACGCATTGCTTTTCCATC	56 °C	[22]

компаний «Евроген» (Москва), проводили ПЦР в соответствии с рекомендованными параметрами на амплификаторе Mastercycler proS (Eppendorf). Скорость нагрева и охлаждения проб была уменьшена до 50 %. Продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле, содержащем 1 мкг/мл бромистого этидия, в ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы E-Box VX5/20M.

Для генотипирования изолятов использовали метод мультислокусного типирования (MLST) [19]. ПЦР-амплификацию локусов проводили в соответствии с рекомендациями, опубликованными на сайте базы данных <http://efaecalis.mlst.net/misc/info.asp>. Продукты ПЦР очищали методом электрофореза в агарозном геле и с помощью набора «Cleanup mini» (Евроген, Москва). Построение филогенетических дендрограмм проводили с помощью сервиса Interactive Tree of Life (iTOL) [12]. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в международную базу данных «*Enterococcus faecalis* MLST Databases» (<https://pubmlst.org/efaecalis/>).

Результаты

Описанная коллекция *E. faecalis* была проанализирована с помощью ПЦР на присутствие генов, кодирующих факторы патогенности (*aggA*, *esp*, *efaA*, *eep*, *cylA*, *gelE*). Все изоляты энтерококков содержали более двух из шести тестируемых генов факторов патогенности. У одного изолята (2,4 %) выявили два гена, кодирующих факторы патогенности, у трех (7,2 %) — три гена, у четырнадцати (33,3 %) — четыре гена, у десяти (23,8 %) — пять генов факторов патогенности и еще у четырнадцати (33,3 %) изолятов — все тестируемые гены исследуемых факторов патогенности (табл. 2).

Среди исследуемых культур *E. faecalis* частота встречаемости генов *cylA* (цитоллизин), *aggA* (вещество агрегации), *efaA* (белок, связанный с адгезией),

Таблица 2
Комбинация генов факторов патогенности, у уропатогенных *E. faecalis*, выделенных из мочи от детей с инфекцией мочевых путей

Номер генов-рианта	Комбинация генов факторов патогенности	Сиквенс-тип (Частота встречаемости, n)
1	<i>aggA</i> , <i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i>	ST25 (1); ST116 (1); ST179 (11); ST537 (1)
2	<i>aggA</i> , <i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i>	ST179 (1); ST64 (1)
3	<i>aggA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i>	ST774 (2); ST6 (5)
4	<i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i>	ST40 (2); ST151 (1)
5	<i>aggA</i> , <i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i>	ST16 (1); ST133 (1)
6	<i>aggA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i>	ST41 (1); ST25 (1); ST774 (3)
7	<i>aggA</i> , <i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>esp</i>	ST16 (2)
8	<i>aggA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>esp</i>	ST774 (1); ST480 (1)
9	<i>efaA</i> , <i>eep</i>	ST21 (1)
10	<i>cylA</i> , <i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>gelE</i> , <i>esp</i>	ST179 (1)
11	<i>efaA</i> , <i>eep</i> , <i>esp</i>	ST21 (3)

Таблица 3

Идентификация генов, кодирующих факторы патогенности у уропатогенных *E. faecalis*, выделенных от детей с инфекцией мочевых путей

Номер штамма	id	Год изоляции	Ген факторов патогенности						Общее число	Сиквенс-тип
			<i>aggA</i>	<i>esp</i>	<i>cylA</i>	<i>efaA</i>	<i>eep</i>	<i>gelE</i>		
PRV054	1780	2013	+	—	—	+	+	+	4	ST6
PRN030	1779	2015	+	—	—	+	+	+	4	ST6
PRN033	1926	2015	+	—	—	+	+	+	4	ST6
PR198	2099	2016	+	—	—	+	+	+	4	ST6
PRV158	1936	2016	+	—	—	+	+	+	4	ST6
PR050	1781	2013	+	+	+	+	+	—	5	ST16
PR212	1945	2016	+	+	+	+	+	—	5	ST16
PRV092	1782	2016	+	—	+	+	+	—	4	ST16
PRV082	1783	2016	—	—	—	+	+	—	2	ST21
PRV044	1927	2013	—	+	—	+	+	—	3	ST21
PRN095	1928	2016	—	+	—	+	+	—	3	ST21
PRV118	1931	2016	—	+	—	+	+	—	3	ST21
PRU35	1939	2015	+	+	—	+	+	+	5	ST25
PR048	1933	2013	+	+	+	+	+	+	6	ST25
PRA038	1785	2013	—	+	—	+	+	+	4	ST40
PR055	1784	2013	—	+	—	+	+	+	4	ST40
PRV049	1786	2013	+	+	—	+	+	+	5	ST41
PRV102	1929	2016	+	—	+	+	+	+	5	ST64
PR042	1787	2013	+	+	+	+	+	+	6	ST116
PR293	1943	2017	+	—	+	+	+	—	4	ST133
PR036	1938	2015	—	+	—	+	+	+	4	ST151
PRU047	1788	2013	+	—	+	+	+	+	5	ST179
PR043	1940	2013	—	+	+	+	+	+	5	ST179
PRV052	1789	2013	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PRV100	1791	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PRV105	1790	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PRV103	1930	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PRV086	1941	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR 278	1942	2017	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR 370	1944	2017	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR233	1946	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR243	1947	2017	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR247	1948	2017	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR251	1949	2017	+	+	+	+	+	+	6	ST179
PR215	1937	2016	+	+	—	+	+	—	4	ST480
PR230	1932	2016	+	+	+	+	+	+	6	ST537
PR051	1792	2013	+	—	—	+	+	+	4	ST774
PRA029	1795	2015	+	—	—	+	+	+	4	ST774
PR040	1794	2013	+	+	—	+	+	—	4	ST774
PRA081	1793	2016	+	+	—	+	+	+	5	ST774
PRL079	1934	2016	+	+	—	+	+	+	5	ST774
PRV080	1935	2016	+	+	—	+	+	+	5	ST774

Примечание. id — международный идентификационный номер, присвоенный штамму *E. faecalis*, в международной базе данных «*Enterococcus faecalis* MLST Databases» (<https://pubmlst.org/efaecalis/>)

eep (усилитель экспрессии феромона), *gelE* (желатиназа) и *esp* (поверхностный белок) составляла 50,0, 80,95, 100, 100, 76,2 и 71,4 % соответственно. Стоит отметить, что два гена, кодирующих факторы патогенности — *efaA* и *eep*, выявлялись у всех исследуемых уропатогенных *E. faecalis*. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что продукты генов *efaA* и *eep* необходимы *E. faecalis* при взаимодействии с эукариотическим организмом на определенных этапах инфекционного процесса.

Известно, что количество детектируемых генов факторов патогенности коррелирует с вирулентностью штаммов [8]. Частота встречаемости генов факторов патогенности у дальневосточных клинических изолятов, выделенных из мочи у детей, выше, чем в коллекциях клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных из мочи, описанных другими исследователями. Так, например, гены *efaA*, *eep*, *aggA*, *cylA*, *gelE* встречались в 3 раза чаще, чем в коллекции из Кувейта [26], и в 2 раза чаще, чем в бразильских изолятах [5]. Для генов *gelE*, *esp*, *efaA*, *eep* частота детекции была в 1,5 раза выше, чем для изолятов, описанных в Чили [17]. Интересно, что частота встречаемости генов *cylA*, *esp* и *gelE* была сопоставима с частотой встречаемости, описанной для штаммов энтерококков, выделенных в Okayama University Hospital (Япония) [21].

Результаты ПЦР-анализа выявили одиннадцать вариантов сочетания генов, кодирующих факторы патогенности у штаммов *E. faecalis*, выделенных из мочи у детей (табл. 3). Из приведенных данных видно, что самыми распространенными геновариантами являются первый (*aggA*, *cylA*, *efaA*, *eep*, *gelE*, *esp*) ($n = 14$; 33,3 %) и третий (*aggA*, *efaA*, *eep*, *gelE*) ($n = 7$; 16,7 %).

По результатам мультилокусного типирования 42 протестированных *E. faecalis* принадлежали к четырнадцати (ST6, ST16, ST21, ST25, ST40, ST41, ST64, ST116, ST133, ST151, ST179, ST480, ST537, ST774) сиквенс-типам (рисунок).

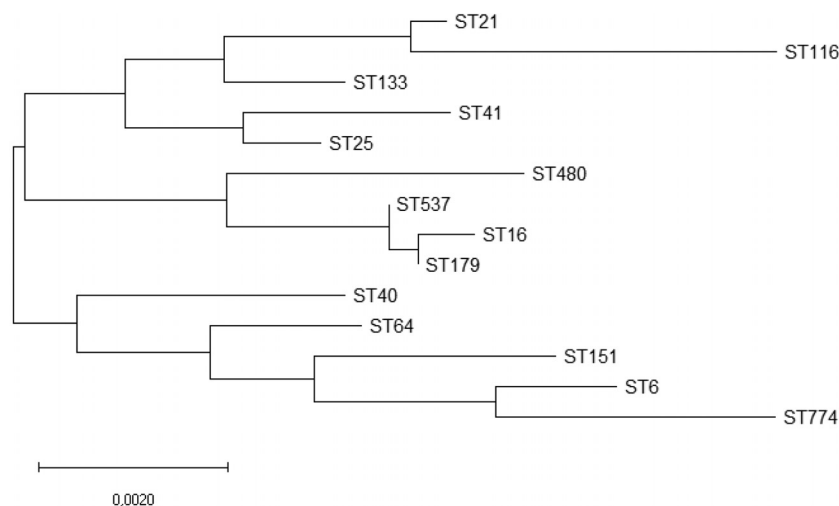
Среди *E. faecalis*, выделенных из мочи детей в Приморском крае, наиболее часто выявлялся ST179, который включал тринадцать штаммов. Реже встречались ST774 ($n = 6$), ST6 ($n = 5$), ST21 ($n = 4$), ST16 ($n = 3$), ST25 ($n = 2$) и ST40 ($n = 2$). Для ST41, ST64, ST116, ST133, ST151, ST480, ST537 было идентифицировано по одному штамму.

Штаммы *E. faecalis* внутри некоторых сиквенс-типов (ST16, ST21, ST25, ST179 и ST774) демонстрировали различные комбинации изучаемых генов факторов патогенности (см. табл. 2, 3).

E. faecalis ST16 сиквенс-типа имели два различных геноварианта: (*aggA*, *cylA*, *efaA*, *eep*, *esp*) ($n = 2$) и (*aggA*, *cylA*, *efaA*, *eep*) ($n = 1$). Энтерококки ST21 характеризовались минимальным набором генов патогенности, штаммы данного сиквенс-типа несли два (*efaA*, *eep*) ($n = 1$) или три (*efaA*, *eep*, *esp*) ($n = 3$) исследуемых гена. Для ST25 отмечено два варианта комбинации генов патогенности: 1) с максимальным числом исследуемых генов — первый геновариант ($n = 1$); и 2) шестой геновариант, отличающийся от первого варианта отсутствием *cylA* гена ($n = 1$) (см. табл. 2, 3).

Сиквенс-типу ST179 соответствовало тринадцать *E. faecalis* с тремя разными (первым, вторым и десятым) генотипами. Штаммы ST179 содержали максимальное количество исследованных генов факторов патогенности (первый геновариант ($n = 11$)), за исключением *E. faecalis* PRV047, в котором отсутствовал ген *esp* (второй геновариант) и *E. faecalis* PR043, в котором отсутствовал *aggA* ген (десятый геновариант) (см. табл. 2, 3).

К сиквенс-типу ST774 относилось шесть штаммов *E. faecalis* с тремя (третий ($n = 2$), шестой ($n = 3$) и восьмой ($n = 1$)) генотипами. *E. faecalis* PRL079, *E. faecalis* PRV080 и *E. faecalis* PRA081 обладали наибольшим количеством (пятью из шести) генов факторов патогенности (6 геновариант). Генотипы штаммов *E. faecalis* PRA029 и *E. faecalis* PR051 (3 геновариант), в отличие от 6 геноварианта не обладали геном *esp*. Штамм *E. faecalis* PR040 содержал



Дендрограмма, отображающая филогенетическое сходство штаммов *E. faecalis*, изолированных в Приморском крае

ген *esp*, однако был ПЦР-негативен по гену, кодирующему желатиназу (8 геновариант) (см. табл. 2, 3).

Обсуждение

Характеристика 42 штаммов *E. faecalis*, выделенных из мочи детей в Приморском крае с использованием MLST, является первой попыткой описания генетической структуры популяции этого вида в России. Полученные результаты были сопоставлены с базой данных MLST [12], содержащей данные о более чем 2 200 штаммах *E. faecalis*. Среди штаммов *E. faecalis*, выявленных в Приморском крае, были идентифицированы наиболее распространённые в мире сиквенс-типы — ST6 (113 (5,7 %) загрузок в базу данных), ST16 (65 (3,3 %) загрузок в базу данных), ST21 (69 (3,5 %) загрузок в базу данных) и ST40 (60 (3,0 %) загрузок в базу данных) [12].

Так, ST6 был обнаружен в 12 странах мира: Испании, США, Португалии, Польше, Норвегии, Кубе, Нидерландах, Франции, Нигерии, Японии, Испании, Малайзии [12]. Штаммы *E. faecalis* ST6 заслуживают особого внимания, поскольку данный сиквенс-тип обычно встречается среди нозокомиальных изолятов и представляет собой адаптировавшийся к госпитальной среде клональный комплекс CC2 [19, 28]. Однако в Нигерии ST6 был выделен из фекалий животных (свиней) [12], а в Норвегии из фекалий здорового младенца [23]. По данным литературы известно, что *E. faecalis* CC2 обладают чувствительностью к ванкомицину, редко несут ген поверхностного белка энтерококка (*esp*), но проявляют высокую устойчивость к аминогликозидам [15]. Все исследованные нами штаммы *E. faecalis* ST6, выделенные в Приморском крае, не несли ген *esp*, были чувствительны к ванкомицину, но устойчивы к аминогликозидам (данные не показаны).

В исследовании Kawalec M. с соавт. среди клинических изолятов *E. faecalis*, выделенных в Польше, сиквенс-тип ST40 являлся наиболее частым [13]. Ранее ST40 не относился к адаптированным клиническим изолятам, так как был обнаружен только у трех штаммов энтерококков, выделенных от животного в Нидерландах, от госпитализированного пациента и от здорового добровольца из Испании [12]. Это позволило авторам предположить, что адаптированный клинический ST40 возник в Польше или соседних странах [13]. На сегодняшний день циркуляция данного сиквенс-типа наблюдается по всей Европе [12, 24]. В других странах (Куба, Бразилия, Нигерия, США) ST40 выделяется спорадически и, возможно, является результатом завоза [12]. Интересно, что в граничащем с Приморским краем Китае данный сиквенс-тип также был выявлен у энтерококков, изолированных при ИМП [29].

В недавнем исследовании коллекции *E. faecalis* ST40 было обнаружено, что гены *gelE*, *fsrB* и *cps* несли все штаммы энтерококков данного сиквенс-типа, а для *asc-10*, *cylM* и *esp* частота детекции варьировала от 16,7 до 78,6 %. Кроме того, не было обнаружено каких-либо расхождений между

присутствием отдельных маркеров (*gelE* и *cylM*) и их экспрессией [30]. Приморские штаммы *E. faecalis* ST40 (id 1784; 1785) не несли *cylA*, и один штамм обладал желатиназо-негативным фенотипом в присутствии гена *gelE*. Однако из-за малого количества изолятов ST40 (n = 2) в данном исследовании очень трудно делать однозначные выводы о геномной изменчивости энтерококков внутри данного сиквенс-типа при распространении на другие территории.

Считается, что ST21 не имеет особого значения для больничной среды, так как часто обнаруживается у энтерококков, изолированных из еды, окружающей среды и от животных [12, 14]. Выявление штаммов *E. faecalis* ST21 среди госпитализированных пациентов предполагает, что они обладают свойствами, способствующими колонизации тканей человека [7]. Так, в исследовании Kuch A. с соавт. около 30 % клинических штаммов энтерококков ST21 сиквенс-типа обладали множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), которая обычно обнаруживалась среди основных эпидемических штаммов [14], а в Польше данный сиквенс-тип включал три изолята ванкомицин-резистентных энтерококков [13]. Штаммы *E. faecalis* ST21 сиквенс-типа, выделенные на территории Приморского края, не обладали МЛУ, были чувствительны к ванкомицину (данные не показаны) и характеризовались минимальным набором изучаемых генов патогенности, что может указывать на роль других генов в инициации ИМП либо на снижение резистентности макроорганизма, благодаря чему авирулентный штамм оказался способным вызвать инфекционный процесс.

На основе кластерного анализа сиквенс-типы ST179, ST16 и ST537 объединены в клональный комплекс CC16. Считается, что энтерококки, относящиеся к CC16, хорошо адаптированы к условиям больничной среды, способны приобретать экзогенные гены посредством рекомбинации и могут нести детерминанты устойчивости к ванкомицину (*vanA* или *vanB*), а также конъюгативные плазмиды и транспозоны, участвующие в передаче генов устойчивости к антибактериальным препаратам и вирулентности [6]. В Приморском крае CC16 оказался наиболее распространенным клональным комплексом, на который приходилось 40,5 % изучаемых *E. faecalis*. Интересно, что сиквенс-типы, входящие в CC16, чаще распространены в азиатских странах (Китай [29], Корея [12], Япония [25], Малайзия [28], Саудовская Аравия [6]) и реже выявляются в Америке [12, 20] и странах Европы [12].

Несмотря на близкое филогенетическое расположение, штаммы энтерококков ST16, ST179 и ST537, выделенные в Приморском крае, относились к разным геновариантам — 1, 2, 5, 7 и 10 (см. табл. 2). Генетическая вариабельность среди сиквенс-типов CC16 также была обнаружена другими учеными. Так, в Китае среди изолятов энтерококков, выделенных из мочи, ген *aggA* чаще детектировался у ST16, а присутствие *gelE* было ассоциировано с ST179 [29].

Обращает на себя внимание ST774 ($n = 6$), который часто встречался в Приморском крае. В настоящее время в мире зафиксирован только один случай выявления *E. faecalis* ST774 от госпитализированного пациента в Венгрии [12]. В нашем исследовании уропатогенные штаммы *E. faecalis* ST774 сиквенс-типа содержали от 4 до 5 генов факторов патогенности. При этом штамм *E. faecalis* PRAs081 был выделен из мочи от пациента с летальным исходом.

Среди *E. faecalis*, выделенных на территории Приморского края, 38 из 42 содержали четыре гена и более, кодирующих факторы патогенности, что намного выше описанных другими группами исследователей [5, 17, 26]. Наличие различных комбинаций генов вирулентности подтверждает, что уропатогенность энтерококков — это полидетерминированная характеристика, зависящая от множества, а не отдельных факторов [1]. Развитие инфекционного процесса требует взаимодействия разнообразных генов, ответственных за секрецию и регуляцию экспрессии факторов вирулентности [26]. По-видимому, наличие большого числа генов патогенности и их комбинаций способствует селекции высокопатогенных штаммов энтерококков, что дает им преимущество при развитии инфекционного процесса и делает *E. faecalis* одним из преобладающих уропатогенов в Приморском крае.

Известно, что *E. faecalis* заселяют кишечник большинства видов теплокровных животных и способны выживать при попадании в почву или водоемы [9]. На распространение и циркуляцию *E. faecalis* также влияет их способность заселять пищеварительный тракт птиц [9]. Филогенетическое разнообразие энтерококков, охарактеризованных в данной работе, не выявило наличия на территории Приморского края единого «сверхпатогенного» штамма *E. faecalis*, однако может указывать на наличие неблагоприятной экологической обстановки, способствующей сохранению и циркуляции штаммов *E. faecalis*, обладающих большим набором факторов патогенности и способных вызывать ИМП. Выявленное разнообразие (как редко, так и широко встречаемых в мире) сиквенс-типов указывает на генетическую неоднородность энтерококков, выделенных в Приморском крае. Возможно, близость стран Азиатско-Тихоокеанского региона и большой туристический проход способствуют формированию региональных особенностей в распространении сиквенс-типов среди мочевых изолятов энтерококков и селекции высоковирулентных штаммов *E. faecalis*.

Таким образом, полученные результаты показывают штаммоспецифический полиморфизм спектра генов, кодирующих факторы адгезии и инвазии у уропатогенных *E. faecalis*, выделенных у детей в Приморском крае.

Заключение

Мультилокусное типирование 42 штаммов *E. faecalis*, выделенных в Приморском крае, впервые представило данные о генетической структуре популяции этого вида в России. Высокая генетическая вариабельность среди уропатогенных штаммов

энтерококков в данном исследовании дает некоторую информацию о локальном распространении, генетическом родстве и вирулентном потенциале *E. faecalis* на юге Дальнего Востока. Выявление высоковирулентных сиквенс-типов, таких как *E. faecalis* ST6, ST179 и ST774, подчеркивает важность определения структуры популяции энтерококков в различных географических районах для понимания влияния социально-демографических факторов на клональное разнообразие энтерококков и, следовательно, на возникновение и передачу вирулентных свойств.

Суммируя полученные результаты, можно заключить, что для детального понимания этиопатогенеза инфекций мочевыводящих путей необходимо дальнейшее, более обширное исследование популяции *E. faecalis* в Приморском крае и других регионах России.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-315-90036.

Авторство

Коменкова Т. С. — получение, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Зайцева Е. А. — анализ и интерпретация данных, написание статьи, окончательное утверждение присланной в редакцию рукописи; Шадрин А. М. — разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов

Коменкова Татьяна Сергеевна — ORCID 0000-0001-5841-0369; SPIN 1830-1879

Зайцева Елена Александровна — ORCID 0000-0002-2625-8275; SPIN 4617-8685

Шадрин Андрей Михайлович — ORCID 0000-0002-2957-4003; SPIN 9202-3636

Список литературы / References

1. Вялкова А. А., Гриценко В. А., Гордиенко Л. М. Инфекция мочевой системы у детей — новые решения старой проблемы // Нефрология. 2010. Т. 14. № 4. С. 63–76.

Vyalkova A. A., Gritsenko V. A., Gordienko L. M. Urinary tract infection in children - new ways of solving an old problem. *Nefrologiya* [Nephrology]. 2010, 14 (4), pp. 63-76. [In Russian]

2. Зайцева Е. А., Крукович Е. В., Мельникова Е. А., Лучанинова В. Н., Коменкова Т. С., Вайсера Н. С. Роль факторов патогенности *Enterococcus faecalis* в развитии пиелонефрита у детей // Тихоокеанский медицинский журнал. 2017. № 2 (68). С. 58–60.

Zaitseva E. A., Krukovich E. V., Melnikova E. A., Luchaninova V. N., Komenkova T. S., Vaisero N. S. The role of pathogenicity factors of *Enterococcus faecalis* in the development of pyelonephritis in children. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal* [Pacific Medical Journal]. 2017, 2 (68), pp. 58-60. [In Russian]

3. Мельникова Е. А., Зайцева Е. А., Лучанинова В. Н., Крукович Е. В., Коменкова Т. С., Феоктистова Ю. В. Дифференцированные подходы к лечению инфекции мочевой системы у детей с учетом этиологического фактора *Enterococcus faecalis* // Тихоокеанский медицинский журнал. 2019. № 4 (78). С. 60–65.

Melnikova E. A., Zaitseva E. A., Luchaninova V. N., Krukovich E. V., Komenkova T. S., Feoktistova Yu. V. Differentiated approaches to the treatment of urinary tract infection in children taking into account the etiological factor *Enterococcus faecalis*. *Tikhookeanskii meditsinskii zhurnal* [Pacific Medical Journal]. 2019, 4 (78), pp. 60-65. [In Russian]

4. Ben Braïek O., Smaoui S. Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *Biomed Res Int*. 2019, 2019, pp. 1-13.

5. Bittencourt E. M., Suzart S. Occurrence of virulence-associated genes in clinical *Enterococcus faecalis* strains isolated in Londrina, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*. 2004, 53, pp. 1069-1073.

6. Farman M., Yasir M., Al-Hindi R. R., et al. Genomic analysis of multidrug-resistant clinical *Enterococcus faecalis* isolates for antimicrobial resistance genes and virulence factors from the western region of Saudi Arabia. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019, 8 (55), pp. 1-11.

7. Freitas A. R., Novais C., Ruiz-Garbajosa P., Coque T. M., Peixe L. Clonal expansion within clonal complex 2 and spread of vancomycin-resistant plasmids among different genetic lineages of *Enterococcus faecalis* from Portugal. *J Antimicrob Chemother*. 2009, 63 (6), pp. 1104-1111.

8. Freitas A. R., Tedim A. P., Novais C., Lanza V. F., Peixe L. Comparative genomics of global *optrA*-carrying *Enterococcus faecalis* uncovers a common chromosomal hotspot for *optrA* acquisition within a diversity of core and accessory genomes. *Microb Genom*. 2020, 6 (6), pp. 1-17.

9. Gilmore M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N. Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. *Massachusetts Eye and Ear Infirmary*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

10. Hållgren A., Claesson C., Saeedi B., Monstein H. J., Hanberger H., Nilsson L. E. Molecular detection of aggregation substance, enterococcal surface protein, and cytolysin genes and in vitro adhesion to urinary catheters of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* of clinical origin. *Int J Med Microbiol*. 2009, 299 (5), pp. 323-332.

11. Hashem Y. A., Yassin A. S., Amin M. A. Molecular characterization of *Enterococcus* spp. clinical isolates from Cairo, Egypt. *Indian J Med Microbiol*. 2015, 33, pp. 80-86.

12. Jolley K. A., Bray J.E., Maiden M. C. J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018, 3, pp. 124.

13. Kawalec M., Pietras Z., Daniłowicz E., et al. Clonal structure of *Enterococcus faecalis* isolated from Polish hospitals: characterization of epidemic clones. *J Clin Microbiol*. 2007, 45 (1), pp. 147-153.

14. Kuch A., Willems R. J., Werner G., et al. Insight into antimicrobial susceptibility and population structure of contemporary human *Enterococcus faecalis* isolates from Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2012, 67 (3), pp. 551-558.

15. Mato R., Almeida F., Pires R., Rodrigues P., Ferreira T., Santos-Sanches I. Assessment of high-level gentamicin and glycopeptide-resistant *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* clonal structure in a Portuguese hospital over a 3-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009, 28 (7), pp. 855-859.

16. Nayak M. *Enterococcus faecalis*: An Enigma in Root Canal Infections. *International Research Journal of Pharmaceutical and Biosciences*. 2016, 3 (1), pp. 12-21

17. Padilla E. C., Núñez A. M., Padilla G. A., Lobos G. O. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile [Virulence genes and bacteriocins

in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule Region, Chile]. *Rev Chilena Infectol*. 2012, 29 (1), pp. 55-61.

18. Paganelli F. L., Willems R. J., Leavis H. L. Optimizing future treatment of enterococcal infections: attacking the biofilm? *Trends Microbiol*. 2012, 20 (1), pp. 40-49.

19. Ruiz-Garbajosa P., Marc J. M., Bonten D. et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecalis* Reveals Hospital-Adapted Genetic Complexes in a Background of High Rates of Recombination. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44 (6), pp. 2220-2228.

20. Schell C. M., Tedim A. P., Rodríguez-Baños M., et al. Detection of β -Lactamase-Producing *Enterococcus faecalis* and Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates in Human Invasive Infections in the Public Hospital of Tandil, Argentina. *Pathogens*. 2020, 9 (2), pp. 1-11.

21. Seno Y., Kariyama R., Mitsuhashi R., Monden K., Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama*. 2005, 59 (3), pp. 79-87.

22. Soares R. O., Fedi A. C., Reiter K. C., et al. Correlation between biofilm formation and *gelE*, *esp*, and *agg* genes in *Enterococcus* spp. *Clinical isolates. Virulence*. 2014, 1 (5), pp. 634-637.

23. Solheim M., Aakra A., Snipen L. G., Brede D. A., Nes I. F. Comparative genomics of *Enterococcus faecalis* from healthy Norwegian infants. *BMC Genomics*. 2009, 10, [1-11]

24. Song X., Sun J., Mikalsen T., Roberts A. P., Sundsfjord A. Characterisation of the plasmidome within *Enterococcus faecalis* isolated from marginal periodontitis patients in Norway. *PLoS One*. 2013, 8 (4), pp. 1-7.

25. Todokoro D., Eguchi H., Suzuki T., et al. Genetic diversity and persistent colonization of *Enterococcus faecalis* on ocular surfaces. *Jpn J Ophthalmol*. 2018, 62 (6), pp. 699-705.

26. Udo E. E., Al-Sweih N. Frequency of virulence-associated genes in *Enterococcus faecalis* isolated in Kuwait hospitals. *Med Princ Pract*. 2011, 20 (3), pp. 259-264.

27. Van Tyne D., Gilmore M. S. Friend turned foe: evolution of enterococcal virulence and antibiotic resistance. *Annu Rev Microbiol*. 2014, 68, pp. 337-356.

28. Weng P. L., Ramli R., Shamsudin M. N., Cheah Y. K., Hamat R. A. High genetic diversity of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* clinical isolates by pulsed-field gel electrophoresis and multilocus sequence typing from a hospital in Malaysia. *Biomed Res Int*. 2013, pp. 1-6.

29. Zheng J. X., Bai B., Lin Z. W., et al. Characterization of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* isolates derived from urinary tract infections in China. *J Med Microbiol*. 2018, 67 (1), pp. 60-67.

30. Zischka M., Künne C. T., Blom J., et al. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics*. 2015, 16 (175), pp. 1-20

Контактная информация:

Зайцева Елена Александровна — доктор медицинских наук, доцент, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, ведущий научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Тихоокеанского государственного университета, г. Владивосток

Адрес: 690000, Приморский край, г. Владивосток, пр-т Острякова, д. 2

E-mail: elza200707@mail.ru