



Оценка микробного состава мокроты при внебольничной пневмонии

Г.В. Тец, В.В. Тец, Т.М. Ворошилова

Выявление патогенных бактерий и оценка их чувствительности в патологическом материале являются важнейшими факторами, определяющими стратегию лечения и выбора антимикробной терапии. В результате проведенного исследования установлено, что стандартные лабораторные методы диагностики позволяют выявить только часть бактерий, находящихся в мокроте, полученной от больного внебольничной пневмонией. Метагеномный анализ показал, что в патологическом материале кроме бактерий, выявленных при бактериологическом исследовании, содержатся различные неродственные бактерии, описанные как возбудители заболеваний дыхательной системы, но плохо поддающиеся культивированию стандартными методами. Полученные данные указывают на то, что при внебольничной пневмонии пока не культивируемые бактерии могут иметь значительную более широкую распространенность, чем принято считать в настоящее время. При этом в патологический процесс могут вовлекаться бактерии, роль факторов патогенности и чувствительность к антибиотикам которых остаются практически не изученными.

Ключевые слова: метагеном, внебольничная пневмония, пока не культивируемые бактерии.

Введение

Бактерии, связанные с организмом человека, вновь стали объектом пристального внимания после получения результатов генетического изучения микрофлоры (микробиоты). Анализ генов микробиоты показал, что большая ее часть остается неизвестной. Существующие методы выделения чистых культур бактерий в сумме позволяют определить лишь небольшую долю от общего состава микробиоты [1]. Такие бактерии, гены которых можно выявить, а методы выделения чистых культур еще не найдены, получили название “пока не культивируемые”. Пока не культивируемые бактерии обнаружены и среди патогенных бактерий [2, 3]. Поскольку именно организм человека служит экологической нишей для большинства патогенных и условно-патогенных бактерий, которые вызывают его болезни, очевидно, что список возбудителей является неполным даже для тех заболеваний, микробная

природа которых давно известна. Целью работы было изучение микробного состава мокроты больного внебольничной пневмонией с помощью стандартных методов лабораторного исследования и с использованием метагеномной технологии.

Материал и методы

Материал для исследования – мокрота больного внебольничной пневмонией. Время между забором материала и включением его в исследование не превышало 24 ч с хранением при 4°C.

Питательные среды: Уриселект 4 (Bio-Rad, Франция), колумбийский и шоколадный агары (bioMerieux, Франция).

Определение биохимической активности микроорганизмов проводилось с помощью системы Vitek 2 (bioMerieux, Франция).

Выделение ДНК

Выделение ДНК из патологического материала и выросших на среде бактерий проводили при помощи стандартного набора “ДНК-сорб-В” (Россия) согласно имеющемуся протоколу.

Аmplификацию проводили с использованием эубактериальных праймеров 27F и 534R, фланкирующих гипервариабельный участок гена 16S рибосомной рибонуклеиновой кислоты (рРНК):

27F: '5-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3'

534R: '5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Используемая в работе пара олигонуклеотидных праймеров специфична для консервативных

Георгий Викторович Тец – канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории иммунологии Научно-исследовательского центра Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Виктор Вениаминович Тец – профессор, зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

Татьяна Михайловна Ворошилова – зав. лабораторией бактериологических исследований отдела лабораторной диагностики ФГБУ “Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова” МЧС России, Санкт-Петербург.



участков гена *16S* рРНК и применяется в метагеномных исследованиях для выявления бактериального разнообразия различных сообществ [4]. Метагеномное секвенирование фрагмента гена *16S* рРНК произведено на пиросеквенаторе Roche 454 Genome Sequencer FLX Titanium. Максимальная длина полученных последовательностей составила 507 нуклеотидов, и химерные последовательности, последовательности короче 300 нуклеотидов не были включены в анализ.

Анализ разнообразия и таксономического состава

Каждая полученная в ходе пиросеквенирования последовательность была идентифицирована путем сравнения с последовательностями баз данных GenBank и EzTaxon с использованием алгоритмов BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) поиска и попарного сравнения [5]. Для идентификации применяли следующие пороги сходства (x – сходство): виды ($x \geq 97\%$), роды ($97 > x \geq 94\%$), семейства ($94 > x \geq 90\%$), порядки ($90 > x \geq 85\%$), классы ($85 > x \geq 80\%$), отряд ($80 > x \geq 75\%$). Для определения видового разнообразия таксономического состава и сравнения сообществ применяли программу Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.cme.msu.edu>). Полученные последовательности выравнивали и проводили кластерный анализ с помощью программы Complete Linkage Clustering, входящей в состав Pyrosequencing pipeline. Кластеризацию осуществляли на разных уровнях, характеризующихся различными расстояниями между кластерами (от 0 до 0,25; с шагом 0,01). Выделение филотипов (OTU – operational taxonomic unit – операционная таксономическая единица) проводили при кластерном расстоянии 0,03; оценку таксономической сложности сообществ – при уровнях различий, соответствующих следующим таксонам: вид – 0,03; род – 0,05; семейство – 0,1; использовали программу Rarefaction (Pyrosequencing pipeline). Для характеристики таксономического состава сообществ был проведен кластерный анализ с параметром расстояния 0,25. Далее для каждого кластера с помощью программы Dereplicate Request определяли нуклеотидную последовательность, соответствующую центру кластера, имеющую минимальную сумму квадратов расстояний до других входящих в кластер последовательностей. Репрезентативные последовательности кластеров таксономически классифицировали. Классификация видов на всех этапах работы произведена на основе генотипического подхода в соответствии с международным кодом номенклатуры бактерий (International Code of Nomenclature of Bacteria).

Выявленные микроорганизмы

Идентифицированные таксоны	Названия
Порядок	<i>Bacillales</i> <i>Pseudomonadales</i> <i>Clostridiales</i> <i>Actinomycetales</i> <i>Lactobacillales</i> <i>Burkholderiales</i> <i>Sphingomonadales</i>
Семейство	<i>Staphylococcaceae</i> <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Streptococcaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Alcaligenaceae</i> <i>Carnobacteriaceae</i> <i>Sphingomonadaceae</i> <i>Oxalobacteraceae</i>
Род	<i>Staphylococcus</i> <i>Lactobacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Achromobacter</i> <i>Granulicatella</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Herbaspirillum</i> <i>Streptococcus</i>
Вид	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Pseudomonas</i> sp.* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Achromobacter insolitus</i> <i>Achromobacter xylosoxidans</i> <i>Achromobacter</i> sp.* <i>Granulicatella adiacens</i> <i>Achromobacter denitrificans</i> <i>Corynebacterium striatum</i>
* Вид точно не определен.	

В случае, если репрезентативная последовательность имела гомологию более 97% с последовательностью валидированного микроорганизма, кластер относили к соответствующему виду.

Результаты и обсуждение

Стандартная микробиологическая диагностика позволила выделить из мокроты больного и идентифицировать бактерии *P. aeruginosa*. Бактерии этого вида входят в число известных и широко распространенных возбудителей заболеваний дыхательной системы и наиболее часто встречаются у больных внебольничной пневмонией и муковисцидозом. В ходе метагеномного исследования того же самого образца мокроты обнаружено значительное видовое разнообразие бактерий. Выявлены бактерии, относящиеся к 7 разным порядкам и 8 семействам (таблица). По количеству последовательностей в патологическом материале преобладали бактерии двух порядков: *Pseudomonadales* и *Burkholderiales*, представленность которых составила 88,3 и 8,5% соответственно.

В материале выявлены бактерии родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Streptococcus* и *Herbaspirillum*. Эти бактерии удалось



идентифицировать только до рода, и их вид не определен с достаточной точностью на основании существующей базы данных. Кроме того, в мокроте обнаружены бактерии этих же родов, для которых был идентифицирован вид: *Pseudomonas aeruginosa*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Achromobacter denitrificans*, *Granulicatella adiacens*, *Corynebacterium striatum*. Большая часть из идентифицированных генетическим путем бактерий относится к малоизученным микроорганизмам. Некоторые из них, как, например, *Herbaspirillum*, больше известны в качестве представителей микрофлоры почвы или в связи с растениями [6]. Вместе с тем некоторые из этих бактерий обнаружены и при заболеваниях дыхательной системы. Так, *Achromobacter xylosoxidans* и *Achromobacter denitrificans* описаны у больных пневмонией и муковисцидозом, бактерии рода *Sphingomonas* sp. выделялись при внебольничной пневмонии, при внутрибольничной пневмонии выявлены *Granulicatella adiacens* и *Corynebacterium striatum* [7–11]. Таким образом, любая из бактерий, обнаруженных с помощью метагеномного анализа, не может быть исключена из списка возможных возбудителей указанного патологического процесса. Исходя из этого очень вероятно, что фактически у данного больного имеет место смешанная инфекция, в число возбудителей которой могут входить неродственные грамотрицательные палочки родов *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Sphingomonas*, *Herbaspirillum* и грамположительные кокки и палочки *Granulicatella* и *Corynebacterium*.

Сравнивая результаты изучения бактерий с использованием классических лабораторных методов и с помощью метагеномного анализа, можно заключить, что многие микроорганизмы не дают роста при стандартных лабораторных методах культивирования. Существующие микробиологические технологии пока не позволяют изолировать и изучить все бактерии, находящиеся в патологическом материале и, скорее всего, в очаге инфекции. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных лабораторных

методов следует считать широкое распространение пока не культивируемых бактерий. Чаще всего такие бактерии дают рост при совместном выращивании в составе смешанных сообществ, где бактерии предоставляют друг другу определенные факторы, без которых каждая по отдельности расти неспособна. Можно предполагать, что патологический процесс вызван не тем микробом или микробами, которые удалось выделить и идентифицировать. Результаты такого анализа значительно снижают реальную ценность существующего лабораторного исследования, основанного на представлениях, сложившихся в микробиологии в 1930–1940-х годах. Полученные данные указывают также на условность результатов дальнейшего подбора антибиотиков, поскольку контролируются не все бактерии, присутствующие в очаге инфекции.

Таким образом, было установлено, что при внебольничной пневмонии смешанные инфекции могут иметь значительно более широкую распространенность, чем считается в настоящее время. При этом в патологический процесс могут вовлекаться бактерии, роль факторов патогенности которых при заболеваниях дыхательной системы остается практически не изученной. Всё это указывает на необходимость пересмотра существующих методов лабораторной диагностики и подходов к выбору антибиотиков.

Список литературы

1. Grice E.A., Segre J.A. // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2012. V. 13. P. 151.
2. Oliver J.D. // FEMS Microbiol. Rev. 2010. V. 34. № 4. P. 415.
3. Lipkin W.I. // Nat. Rev. Microbiol. 2013. V. 11. № 2. P. 133.
4. Petrosino J.F. et al. // Clin. Chem. 2009. V. 55. № 5. P. 856.
5. Schloss P. et al. // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 23. P. 7537.
6. Suwantarant N. et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2015. V. 82. № 4. P. 331.
7. De Baets F. et al. // J. Cyst. Fibros. 2007. V. 6. № 1. P. 75.
8. Aundhakar S.C. et al. // Ann. Med. Health. Sci. Res. 2014. V. 4. Suppl. 1. P. S22.
9. Farr G., Pedram S. // Chest. 2013. V. 144. 4_MeetingAbstracts. P. 231A.
10. Liao C.H. et al. // Clin. Infect. Dis. 2004. V. 38. № 3. P. 452.
11. Tarr P.E. et al. // Transpl. Infect. Dis. 2003. V. 5. № 1. P. 53.