

# Микробный состав отделяемого ожоговой раны и эффективность его изучения при лабораторной диагностике

Г.В. Тец<sup>1</sup>, В.В. Тец<sup>1</sup>, Т.М. Ворошилова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС России, Санкт-Петербург, Россия

Выявление патогенных бактерий в патологическом материале и оценка их чувствительности 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 раневом отделяемом. Метагеномный анализ показал, что в патологическом материале содержатся различные бактерии, описанные как возбудители гнойно-воспалительных заболеваний, но плохо поддающиеся культивированию стандартными методами. Полученные данные свидетельствуют, что при гнойно-воспалительных заболеваниях смешанные инфекции могут быть распространены значительно шире, чем принято считать. При этом в патологический процесс могут вовлекаться бактерии, для которых роль факторов патогенности и чувствительности к антибиотикам остаются практически не изученными.

**Ключевые слова:** метагеном, гнойно-воспалительные заболевания, пока не культивируемые бактерии

## The microbial composition of burn wound discharge and efficiency of its study for lab diagnostics

G.V. Tetz<sup>1</sup>, V.V. Tetz<sup>1</sup>, T.M. Voroshilova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> First Pavlov State Medical University of Saint-Petersburg, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup> The Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, St. Petersburg, Russia

Detection of pathogenic bacteria in the pathological material and evaluation of their sensitivity are the major factors determining treatment strategy and the choice of antimicrobial therapy. This work has showed that the routine laboratory techniques could detect only a fraction of bacteria in the wound discharge. Metagenomic analysis has shown that the material contained various pathological bacteria known as causative agents of purulent-inflammatory diseases, which are poorly amenable to cultivation by standard methods. The data obtained suggest that the chronic inflammatory diseases of mixed infections can be spread much wider than commonly believed. At the same time in the pathological process may be involved the bacteria, which pathogenicity factors and sensitivity to antibiotics have remained virtually unexplored.

**Keywords:** metagenome, purulent-inflammatory diseases, currently unculturable bacteria

### Введение

Бактерии, связанные с организмом человека, вновь стали объектом пристального внимания после получения результатов генетического изучения микрофлоры (микробиоты). Анализ микробиоты показал, что большая ее часть неизвестна и существующие методы выделения чистых культур бактерий в сумме позволяют получить лишь небольшую часть от общего состава микробиоты [1]. Такие бактерии, гены которых можно выявить, а методы выделения чистых культур еще не найдены, получили название пока не культивируемых. Пока не культивируемые бактерии обнаружены и среди патогенных бактерий [2, 3]. Поскольку именно человек является экологической нишей для большинства патогенных и условно-патогенных бактерий, вызывающих его болезни, очевидно, что список возбудителей является неполным даже при тех заболеваниях, где микробная природа давно известна. Целью настоящей

работы было изучение микробного состава отделяемого из раны больного с ожогом стандартными методами лабораторного исследования и с использованием метагеномной технологии.

### Материал и методы

*Материал для исследования* — раневое отделяемое (больной 36 лет, диагноз — ожог 2-й степени, площадь ожога — 7%). Время между взятием материала и включением его в исследование не превышало 24 ч с хранением при +4 °С.

*Питательные среды:* агары Шедлера, Колумбийский и Эндо (Oxoid, Великобритания), элективный солевой агар (Биомедиа, СПб).

*Определение биохимической активности микроорганизмов* проводили с помощью системы Vitek 2 (bioMérieux, Франция).

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

Аmplification была проведена с использованием бактериальных праймеров 27F (‘5-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3’)-534R и (‘5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3’), фланкирующих гипервариабельный участок гена, кодирующего 16S рРНК.

Используемая в работе пара олигонуклеотидных праймеров специфична консервативным участкам гена 16SpРНК 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, химерные последовательности и последовательности короче 300 нуклеотидов не были включены в анализ.

*Анализ разнообразия и таксономического состава.* Каждая полученная в ходе пиросеквенирования последовательность была иденти-

фицирована путем сравнения с последовательностями баз данных GenBank и EzTaxon, используя алгоритмы поиска BLASTN и попарное сравнение [5]. Для определения видового разнообразия, таксономического состава и сравнения сообществ применяли программу Pyrosequencing pipeline (<http://pyro.sme.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 филогенов (OTU) 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, — используя 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 DereplicateRequest — 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 (ICNB). В случае если репрезентативная последовательность имела гомологию более 97% с последовательностью валидированного микроорганизма, кластер относили к соответствующему виду.

## Результаты

Стандартное лабораторное бактериологическое исследование выявило в патологическом материале грамотрицательную палочку *Klebsiella oxytoca*, чувствительную к основным антибиотикам (цефалоспорином, меропинему, аминогликозидам и фторхинолонам). Штамм был устойчив к ампициллину, но чувствителен к ампициллин/клавулановой кислоте, что указывает на продукцию им бета-лактамаз(-ы).

В результате метагеномного анализа установлено значительное видовое разнообразие бактерий в раневом отделяемом. В его составе выявлены бактерии, принадлежащие к семейству *Entero-*

**Таблица 1.** Метагеномный анализ раневого отделяемого

Таксономическая единица	Наименование
Семейство	<i>Enterobacteriaceae</i>
Род	<i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Pantoea</i>
Вид	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter asburiae</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter hormaechei</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i>

*bacteriaceae* — 3 родам и 8 видам. В патологическом материале были представлены грамотрицательные бактерии (табл. 1).

Большинство бактерий, обнаруженных при метагеномном анализе, описаны как возбудители болезней растений и людей. Возбудителями оппортунистических инфекций считаются *E. aerogenes*, *P. agglomerans*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. cloacae*, *E. cancerogenus*, *E. asburiae* [6–12]. Все эти штаммы не были получены в виде чистых культур в ходе выделения и идентификации возбудителя, проведенных стандартными лабораторными методами. Исходя из имеющихся данных, такая ситуация имеет место в большинстве исследований патологического материала. Отсутствие роста бактерий на питательной среде и наличие в материале указывает на невозможность культивировать большую часть бактерий, в том числе возбудителей болезни на питательных средах. Такие пока не культивируемые бактерии тем не менее принимают участие в развитии патологического процесса, и их присутствие необходимо учитывать при выборе антимикробной терапии. Отсутствие чистых культур большинства пока не культивируемых бактерий не позволяет провести оценку их чувствительности к антибиотикам. Вместе с тем известно, что *E. aerogenes* обладают мультирезистентностью к бета-лактамам и фторхинолонам [12], а *E. hormaechei* почти всегда устойчивы к ампициллину и цефалоспорином [8, 11]. Много данных об устойчивости *K. pneumoniae* к различным антибиотикам. Очень распространена устойчивость у бактерий данного вида, когда они являются возбудителями внутрибольничных инфекций [13].

Существующие лабораторные 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. Результаты такого анализа значительно снижают реальную ценность существующего лабораторного исследования, основанного на представлении, сложившихся в микробиологии в 30–40-х годах прошлого века. Можно предполагать, что патологический процесс вызван не тем микробом или микробами, которые удалось выделить и идентифицировать. Полученные результаты указывают также на условность результатов выбора антибиотиков для терапии.

Таким образом, полученные данные указывают на более широкое распространение смешанных инфекций при гнойно-воспалительных процессах и на необходимость пересмотра существующих методов лабораторной диагностики и выбора антибиотиков.

## Литература

1. Grice E.A., Segre J.A. The human microbiome: our second genome // *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012. 13. P. 151–170.
2. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance // *Nat. Rev. Microbiol.* 2013. 11. P. 133–141.
3. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2010. 34. P. 415–425.
4. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification // *Clin. Chem.* 2009. 55(5). P. 856–866.
5. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for de-

- scribing and comparing microbial communities // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. 75(23). P. 7537–7541.
6. Фельдблюм И.В., Захарова Ю.А., Демченко С.Г. Сравнительная оценка различных подходов к изучению заболеваемости гнойно-септическими инфекциями среди родильниц в акушерских стационарах // *Мед. альманах.* 2011. 5. С. 209–212.
  7. Cruz A.T., Cazacu A.C., Allen C.H. *Pantoea* agglomerans, a plant pathogen causing human disease // *J. Clin. Microbiol.* 2007. 45(6). P. 1989–1992.
  8. Garazzino S., Aprato A., Maiello A. et al. Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: case report and review of the literature // *J. Clin. Microbiol.* 2005. 43(3). P. 1459–1461.
  9. Koth K., Boniface J., Chance E.A., Hanes M.C. *Enterobacter asburiae* and *Aeromonas hydrophila*: soft tissue infection requiring debridement // *Orthopedics.* 2012. 35(6). e996–999. doi: 10.3928/01477447-20120525-52.
  10. Mezzatesta M.L., Gona F., Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance // *Future Microbiol.* 2012. 7(7). P. 887–902. doi: 10.2217/fmb.12.61.
  11. O'Hara S.M., Steigerwalt A.G., Hill B.C. et al. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family *Enterobacteriaceae* formerly known as enteric group 75 // *J. Clin. Microbiol.* 1989. 27(9). P. 2046–2049.
  12. Thiolas A., Bollet C., La Scola B. et al. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. 49(4). P. 1354–1358.
  13. Sanchez G.V., Master R.N., Clark R.B. et al. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010 // *Emerg. Infect. Dis.* 2013. 19(1). P. 133–136. doi: 10.3201/eid1901.120310.

#### Сведения об авторах

**Тец Виктор Вениаминович** — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

E-mail: vtetzv@yahoo.com

**Тец Георгий Викторович** — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии НИЦа ПСПбГМУ им. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

E-mail: georgetets@gmail.com

**Ворошилова Татьяна Михайловна** — заведующая лабораторией бактериологических исследований отдела лабораторной диагностики ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург

———— \* ————