

2  
НОМЕР

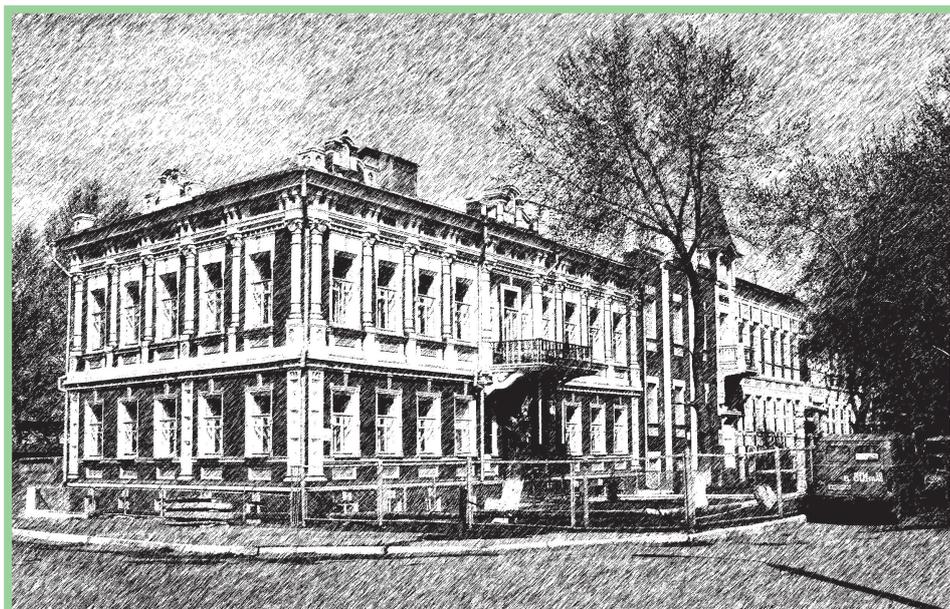


ISSN 2304-9081

Электронный журнал  
On-line версия журнала на сайте  
<http://www.elmag.uran.ru>

# БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2016

**УЧРЕДИТЕЛИ**

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН  
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Е.А. Щуплова, С.Б. Фадеев, 2016

УДК 617-022:616-018:576.851

*Е.А. Щуплова, С.Б. Фадеев*

**ИЗУЧЕНИЕ ВИДОВОГО СОСТАВА МИКРОФЛОРЫ ОЧАГОВ  
ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
РАЗНЫХ МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ**

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

*Цель.* Изучить видовой состав микрофлоры очагов гнойно-воспалительных процессов с помощью стандартных бактериологических методов исследования и с использованием метагеномного анализа.

*Материалы и методы.* В исследовании использовали бактериологический метод и метагеномный анализ патологического материала, полученного от больных с гнойными ранами.

*Результаты.* С использованием бактериологического метода установлено, что чаще из очагов гнойно-воспалительных процессов высевался *S. aureus*, а при метагеномном анализе патологического материала обнаружено преобладание ДНК представителей семейств *Clostridiaceae* и *Enterobacteriaceae*.

*Заключение.* Использование стандартного бактериологического подхода и метагеномного секвенирования позволяет более полно охарактеризовать видовой состав микрофлоры очагов гнойно-воспалительных процессов.

*Ключевые слова:* бактериологический метод, метагеномный анализ, микрофлора очагов гнойно-воспалительных заболеваний.

---

---

*E.A. Shchuplova, S.B. Fadeev*

**THE STUDY OF SPECIES COMPOSITION OF MICROFLORA FOCAL INFLAMMATORY PROCESSES USING DIFFERENT METHODOLOGICAL APPROACHES**

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

*Objective.* The study of species composition of microflora focal of inflammatory processes using standard bacteriological methods of research and the use of metagenomic analysis.

*Materials and methods.* The study used the bacteriological method and metagenomic analysis of pathological material obtained by for patients with purulent wounds.

*Results.* Using a bacteriological method found that most of the centers of inflammatory processes seeded *S.aureus*, and in metagenomic analysis of the prevalence of pathological material found DNA representatives *Clostridiaceae* and *Enterobacteriaceae* families.

*Conclusion.* Using the standard bacteriological and metagenomic sequencing approach allows for a more complete characterization of the species composition of microflora foci of inflammatory processes.

*Keywords:* bacteriological method, metagenomic analysis, microflora foci of inflammatory diseases.

## **Введение**

Хирургические инфекции занимают одно из значимых мест в структуре инфекционно-воспалительной патологии [1]. Оценивая спектр возбудителей хирургической инфекции, нельзя ни отметить, что последние этиологически нередко являются полимикробными [2]. Доля микробных ассоциаций при гнойно-септических инфекциях составляет от 12 до 96%, а сами ассоциации микроорганизмов в гнойном очаге могут включать до 14 видов бактерий [3]. Симбиотические взаимоотношения в бактериальных ассоциациях могут приводить к усилению патогенного и персистентного потенциалов бактериальных агентов, что может отражаться в изменении клиники заболевания (более тяжелое и осложненное его течение) и снижении эффективности проводимой антибактериальной терапии [4].

Существующие бактериологические методы выделения чистых культур микроорганизмов в сумме позволяют определить лишь небольшую долю от общего состава микробиоты, а выявление всех генов бактерий-ассоциантов, находящихся в очаге гнойно-воспалительной инфекции, возможно лишь при использовании современных генетических методов исследования.

Цель данной работы – изучить видовой состав микрофлоры очагов гнойно-воспалительных процессов с помощью стандартных бактериологических методов исследования и с использованием метагеномного анализа.

## **Материалы и методы**

Материал для бактериологического и генетического исследований брали у больных с гнойными ранами при поступлении в отделение гнойно-септической хирургии 1-й муниципальной городской клинической больницы скорой помощи г. Оренбурга. Забор патологического материала (гной, некротические ткани) со дна раны производили в асептических условиях (использовали аспирационный способ или взятие биоптата), после чего высевали на 5% кровяной агар. Посевы инкубировали при 37°C в течение 24-48 ч, затем у выделенных чистых культур микроорганизмов изучали морфологию с помощью окраски мазков по Граму [5], а для определения видовой принадлежности бактерий использовали диагностические биохимические тест-системы MikroLaTest (“Lachema”, Чехия).

Генетическое исследование патологического материала проводили на базе Центра коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» в

ИКВС УрО РАН. Из исследуемых проб, взятых от больных с гнойными ранами и флегмонозной формы рожии голени выделяли ДНК по следующей методике. К 100 мкл исследуемого образца (гной) добавляли 500 мкл лизирующего TES буфера и 10 мкл протеиназы К, затем инкубировали при 60°C в течение 30 мин. После инкубации в исследуемые пробы вносили 100 мкл 10% раствора SDS и вновь инкубировали при 65°C в течение 15 мин. Затем к образцам добавляли 800 мкл смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) вручную встряхивали в течение 5 мин и центрифугировали (14 500 об/мин в течение 5 мин). Далее к надосадочной жидкости добавляли 350 мкл смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1) и при таком же режиме центрифугировали. Затем в надосадочную жидкость вносили 30 мкл ацетата аммония и 450 мкл холодного абсолютного спирта. Исследуемые образцы ДНК оставляли в холодильнике при -20°C в течение 10 ч. После этого пробы промывали три раза холодным 70%-ным этанолом при 4°C в течение 10 мин, подсушивали выделенные ДНК и добавляли 30 мкл воды Milli-Q. Для выявления бактериального разнообразия различных сообществ в исследуемых образцах проводили метагеномное секвенирование выделенных ДНК по 16S рибосоме с помощью секвенатора II-поколения MiSeq (Illumina, США).

Полученные результаты при бактериологическом методе исследования статистически обрабатывали с вычислением средней арифметической ошибки в процентном соотношении от общего числа исследуемых штаммов [6]. При метагеномном секвенировании каждая полученная последовательность была идентифицирована путем сравнения с последовательностями баз данных GenBank и Rdp с использованием алгоритмов BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide) поиска и попарного сравнения. Полученные последовательности выравнивали и проводили кластерный анализ с помощью программы USEARCH v8.0.1623\_win32,-cluster\_otus command. В каждом образце при кластерном анализе было выделено в среднем 110 OTU (Operational taxonomic unit – операционная таксономическая единица), в расчетах учитывали  $size \geq 5$  и статистически обрабатывали в процентном соотношении от общих значений size.

### **Результаты и обсуждение**

Бактериологическим методом было выделено 90 штаммов микроорганизмов. Видовой состав возбудителей очагов гнойно-воспалительных про-

цессов представлен в таблице.

*Таблица.* Видовой состав возбудителей очагов гнойно-воспалительных заболеваний, выделенных бактериологическим методом

Вид возбудителя	Частота встречаемости (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	50,3
<i>S. intermedius</i>	10,3
<i>S. epidermidis</i>	8,5
<i>S. haemolyticus</i>	3,7
<i>S. hominis</i>	1,8
<i>Streptococcus pyogenes</i>	14,8
<i>S. mutans</i>	2,5
<i>S. agalactiae</i>	0,7
<i>Escherichia coli</i>	3,8
<i>Proteus mirabilis</i>	1,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,65
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,1
<i>Candida albicans</i>	0,25

По этим данным видно, что чаще всего из очагов хирургической инфекции выделялись коагулазопозитивные стафилококки (60,6%), преимущественно *Staphylococcus aureus*. Коагулазонегативные стафилококки (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus* и др.) составили 14% от всего спектра возбудителей. Стрептококки по частоте выявления заняли второе место (18%), среди них доминировал *Streptococcus pyogenes*. Роль представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Providencia spp.*, *Proteus spp.* и др.) была менее заметна – всего 5,7%. При изучении исследуемых образцов были обнаружены грибы рода *Candida*, в основном, вид *Candida albicans*, что составило 0,25% от всего пула возбудителей.

В результате метагеномного секвенирования по 16S рибосоме произведенного на секвенаторе II-поколения MiSeq (Illumina, США) в исследуемых образцах, полученных от больных с гнойными ранами, обнаружили ДНК 15 видов различных микроорганизмов (рис. 1). Причем в 97,5% случаев были выделены ДНК облигатных анаэробов – представителей семейства

*Clostridiaceae*. В большом количестве в 82,1% обнаружили ДНК *C. perfringens*, ДНК *C. sordellii* выявили в 9,35% случаев от всех количеств ДНК микроорганизмов, а ДНК *C. baratii* обнаружена в 5,6% случаев.

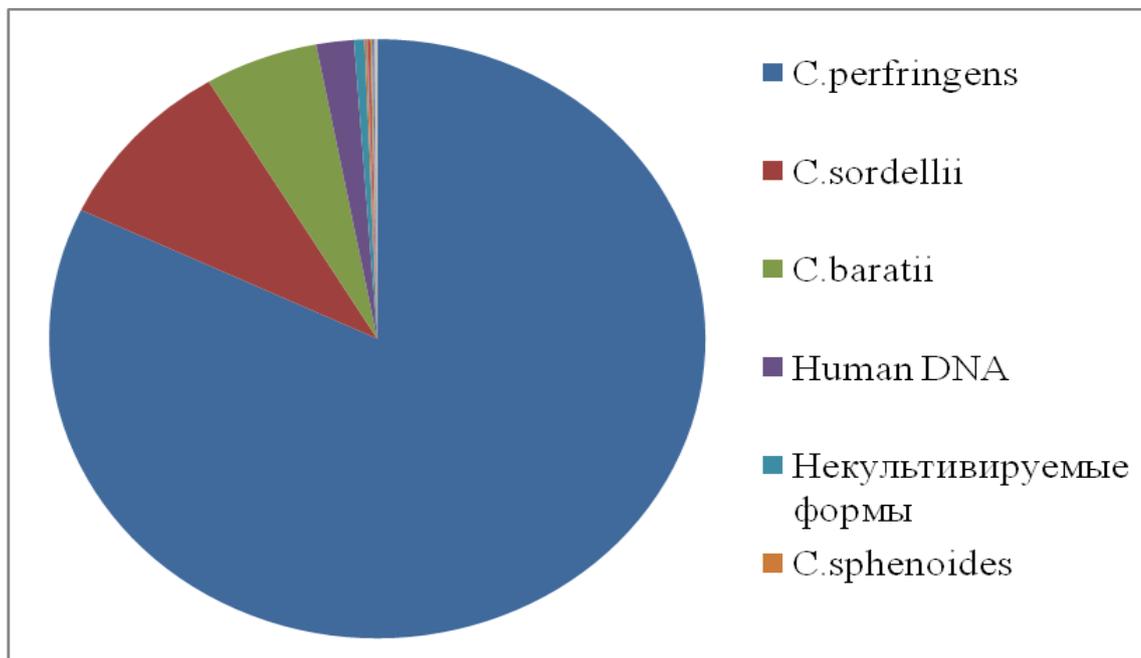


Рис. 1. Спектр возбудителей очага гнойной раны.

Необходимо отметить, что высокий процент (1,85) прибор выдал значения ДНК человека. В 0,52% случаев были обнаружены ДНК некультивируемых форм микроорганизмов. Остальные ДНК микроорганизмов обнаружены в диапазоне от 0,1% (*C. sphenoides*) до 0,02% (*S. caprae*).

Выявление клостридиальной микрофлоры в очагах гнойных ран при клинической картине, не характерной для анаэробной хирургической инфекции, по-видимому, может указывать на роль *C. perfringens* и других анаэробов в инициации гнойно-воспалительного процесса без развития клиники газовой гангрены. Последнее может быть связано с подавлением клостридий другими, прежде всего аэробными патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. Ведущая роль анаэробных микроорганизмов, которые не обнаруживались классическими бактериологическими методами, была показана при деструктивном аппендиците и перитоните [7].

При метагеномном анализе пробы, полученной от больного с флегмонозной формой рожи голени было выделено ДНК 9 различных микроорганизмов (рис. 2). В данном образце обнаружили преобладание ДНК факультативно-анаэробных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, что составило 93,64% от всего спектра возбудителей очага инфекции. Первостепенное

место занял вид *E. coli*, удельный вес которого составил 93,4 %.

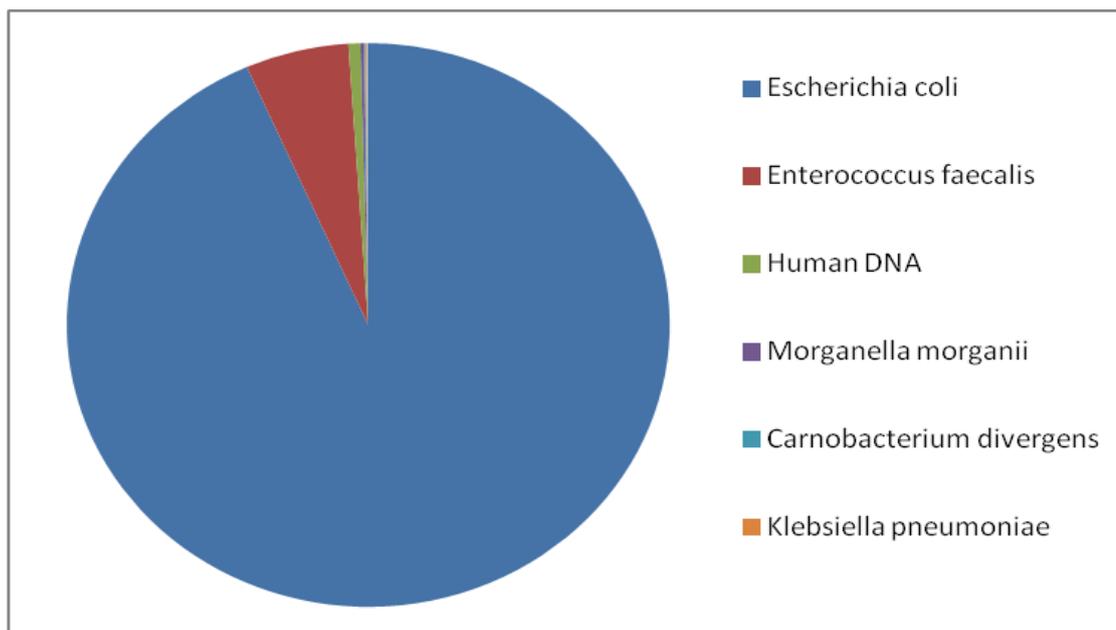


Рис. 2. Спектр возбудителей очага флегмонозной формы рожги голени.

На втором месте оказался вид – *Enterococcus faecalis*, что составило 5,55% от всего спектра ДНК возбудителей очага инфекции. Также как и в первом образце, но меньше в 3 раза, пришлось на долю ДНК человека (0,64%). Необходимо отметить, что 0,18% пришлось на долю ДНК *Morganella morganii*. Удельный вес ДНК остальных видов, в том числе и некультивируемые формы бактерий, был низким: от 0,08% (*Carnobacterium divergens*) до 0,02% (*S.warneri*) от всего спектра ДНК возбудителей очага инфекции.

Обнаружение энтеробактерий и энтерококков при обследовании пациентов с осложненными формами рожистого воспаления, вероятно, свидетельствует о вытеснении этими микроорганизмами иницирующей стрептококковой микрофлоры, что было ранее показано при динамическом бактериологическом обследовании больных с этой патологией [4].

### **Заключение**

Используемые лабораторные микробиологические методы исследования пока не позволяют изолировать и изучить все бактерии, находящиеся в очаге хирургической инфекции. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных бактериологических методов следует считать широкое распространение пока некультивируемых форм бактерий. Чаще всего такие бактерии дают рост при совместном выращивании в составе смешанных со-

обществ, где бактерии предоставляют друг другу определенные факторы, без которых каждые по отдельности расти неспособны [8].

Полученные результаты исследования показали, что с использованием бактериологического метода из очагов гнойно-воспалительных процессов чаще высеивался *S. aureus*. При метагеномном анализе исследуемых проб было обнаружено разнообразие видов микроорганизмов, способных вызывать гнойно-воспалительные процессы, в том числе и некультивируемые формы бактерий. Но среди выявленных генов микроорганизмов преобладали ДНК представителей семейств *Clostridiaceae* и *Enterobacteriaceae*. С одной стороны, идентификация возбудителей очагов гнойно-воспалительных процессов с использованием генетического метода, по сравнению с бактериологическим, сокращается в длительности обработки результатов, а прибор выдает гораздо большее количество (разнообразие) видов микроорганизмов и их ассоциаций. Но, с другой стороны, 100% идентификацию всех возбудителей очагов гнойно-воспалительных процессов прибор не обеспечивает, так как остается часть неизвестных (некультивируемых) форм бактерий.

Таким образом, полученные результаты указывают на перспективы разработок новых диагностических алгоритмов при идентификации микроорганизмов, а также подходов к изучению межмикробных взаимоотношений бактерий-ассоциантов, включая некультивируемые формы микроорганизмов, в очагах гнойно-воспалительных процессах, что может быть использовано для совершенствования схем профилактики и лечения хирургических инфекций.

**(Благодарность.** Авторы выражают благодарность и искреннюю признательность сотрудникам и заведующему Центром коллективного пользования «Персистенция микроорганизмов» в ИКВС УрО РАН к.м.н. Плотникову А.О., а также д.т.н. Хлопко Ю.А. за помощь в проведении метагеномного анализа патологического материала.)

## ЛИТЕРАТУРА

1. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации / Под ред. В.С. Савельева. - М.: БОРГЕС, 2009. 91 с.
2. Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin. Microbiol. Rev. 2001. 14(2): 244-269.
3. Митрофанова Н. Н., Мельников В. Л. Особенности микробных ассоциаций при гнойно-септических инфекциях в отделении раневой инфекции многопрофильного стационара. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2013. 3 (27): 154–163.
4. Тарасенко В.С., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. Хирургическая инфекция мягких тканей (клинико-микробиологический аспект). Екатеринбург: УрО РАН, 2015. 180 с.
5. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. М: Медицина, 1989. 464 с.

6. Ланг Т.А., Сесик М. Как описывать статистику в медицине. Аннотированное руководство для авторов, редакторов и рецензентов / Пер. с англ. под ред. В.П. Леонова.- М.: Практическая медицина, 2011.
7. Бойко Н.Б., Осипов Г.А., Белобородова Н.В., Курчавов В.А. Сравнительное хромато-масс-спектрометрическое исследование состава химических маркеров микроорганизмов в крови и перитонеальном экссудате брюшной полости при гангренозно-перфоративном аппендиците. Инфекции в хирургии. 2009. 2.: 58-62.
8. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Оценка микробного состава мокроты при внебольничной пневмонии. Практическая пульмонология. 2015. 2: 62-64.

*Поступила 06.05.2016*

*(Контактная информация: Щуплова Елена Алексеевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17, e-mail: Khanina83@yandex.ru)*

---

---

## LITERATURA

1. Hirurgicheskie infekcii kozhi i m'jagkih tkanej. Rossijskie nacional'nye rekomendacii / Pod red. V.S. Savel'eva. - M.: BORGES, 2009. 91 s.
2. Bowler P.G., Duerden B.I., Armstrong D.G. Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin. Microbiol. Rev. 2001. 14(2):. 244-269.
3. Mitrofanova N.N., Mel'nikov V.L. Osobennosti microbnyh associacij pri gnojno-septicheskih infekcijah v otdelenii ranevoj infekcii mnogoprofil'nogo stacionara. Izvestija vysshih uchebnyh zavedenij. Povolzhskij region. Medicinskie nauki. 2013.3 (27):. 154-163.
4. Tarasenko V.S., Fadeev S.B., Buharin O.V. Hirurgicheskaja infekcija m'jagkih tkanej (kliniko-mikrobiologicheskij aspekt). Ekaterinburg: UrO RAN, 2015. 180 s.
5. Spravochnik po mikrobiologicheskim i virusologicheskim metodam issledovanija / Pod red. M.O. Birgera. M: Medicina, 1989. 464 s.
6. Lang T.A., Sesik M. Kak opisivat' statistiku v medicine. Annotirovannoe rukovodstvo dlja avtorov, redaktorov i recenzentov / Per. s angl. pod red. V.P. Leonova.- M.: Prakticheskaja medicina, 2011.
7. Bojko N.B., Osipov G.A., Beloborodova N.V., Kurchavov V.A. Sravnitel'noe hromato-mass-spektrometricheskoe issledovanie sostava himicheskikh markerov mikroorganizmov v krovi i peritoneal'nom ykssudate brushnoj polosti pri gangrenozno-perforativnom appendicite. Infekcii v hirurgii. 2009.2.: 58-62.
8. Tec G.V., Tec V.V., Voroshilova T.M. Ocenka mikrobnogo sostava mokroty pri vnebol'ничной пневмонии. Prakticheskaja pul'monologija. 2015. 2: 62-64.

### **Образец ссылки на статью:**

Щуплова Е.А., Фадеев С.Б. Изучение видового состава микрофлоры очагов гнойно-воспалительных процессов с использованием разных методических подходов. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2016. 2: 8с. [Электронный ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/EAS-2016-2.pdf>).