

Шахматова Анна Александровна

бакалавр, лаборант-исследователь

Шитова Ирина Александровна

лаборант-исследователь, бакалавр

Антонова Елена Ивановна

д-р биол. наук, профессор, директор

Научно-исследовательский центр фундаментальных

и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный

педагогический университет имени И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-107071

МИКРОБИОМ РЕСПИРАТОРНОГО ТРАКТА ПРИ ОСТРЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Аннотация: статья посвящена изучению микробиома верхних дыхательных путей пациентов с острыми респираторными заболеваниями (ОРЗ). Проведена масс-спектрометрическая видовая идентификация консорциумов микроорганизмов с определением антибиотикочувствительности.

Ключевые слова: микробиом, респираторный тракт, времяпролетная масс-спектрометрия, антибиотикочувствительность.

Микробиом человека представляет собой совокупность микроорганизмов, которые заселяют организм [4] и включает в себя микробиом дыхательной системы, пищеварительного тракта, кожи, репродуктивной системы и т. д.

Благодаря появлению новых высокопроизводительных технологий на сегодняшний день проведение профилирования генома и микробиома респираторного тракта у людей с ОРЗ. Изучение взаимодействий микробиома организма человека актуально с позиции профилактики респираторных заболеваний [8]. Известно, что нормофлора верхних дыхательных путей играет важную роль в поддержании им-

мунного баланса респираторного тракта, обеспечивает устойчивость слизистых оболочек к более агрессивным атакам и препятствует заражению бактериями и другими возбудителями на поверхности кожи и слизистых оболочек. Однако, большинство микроорганизмов, входящих в состав нормофлоры, могут стать причиной различных заболеваний (хронический ринит, риносинусит, отит, аденоидные вегетации, тонзиллофарингит, ларингит, бронхиальная астма) при воздействии на организм неблагоприятных факторов. Анализируя современные эпидемиологические исследования, становится ясно, что частота рецидивирующих респираторных заболеваний у людей продолжает оставаться высокой уже более 40 лет, и составляет от 10% до 50% у людей среднего возраста. На сегодняшний день, главной задачей системы здравоохранения является поиск методов метагеномного анализа, которые помогли бы управлять микробиологическими факторами в микроэкологии респираторного тракта человека [1].

Целью нашего исследования является изучить таксономию микробиоты верхних дыхательных путей у здоровых людей, а также у людей с острыми респираторными заболеваниями, с последующим определением чувствительности выделенных консорциумов к антимикробным препаратам.

Для достижения цели поставлены следующие задачи:

- с применением культуральных методов выделить первичные клеточные линии микроорганизмов микробиома верхних дыхательных путей человека в норме и с респираторными заболеваниями с определением доминирующих видов микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии;
- провести конструирование микробных консорциумов с определением доминирующих видов микроорганизмов;
- определить антибиотикочувствительность консорциумов микроорганизмов у пациентов с ОРЗ в сравнении с контрольной группой.

Материалы и методы исследования. Для решения поставленных задач формировали две экспериментальные группы: 1 группа – условно здоровые люди (контроль); 2 группа – пациенты, болеющие ОРЗ.

Забор материала проводили свабами (АреxLab, Россия) в пробирку с транспортной средой STUART в период с января по март 2023 года (табл. 1).

Таблица 1

Количество проб и зона забора материала для исследований

Наименование показателя и количество проб	Зона забора материала (кол-во проб)		Итого (кол-во проб)
	Мазок из носа	Мазок из зева	
1 группа			214
забор №1	6	6	
2 группа			
забор №1	8	8	
забор №2	12	12	
забор №3	11	11	
забор №4	16	16	
забор №5	19	19	
забор №6	16	16	
забор №7	19	19	

Все работы выполнялись с соблюдением требований СанПИН и «Правил устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораторных условиях» [5]. Выделение и идентификация микроорганизмов проводилась согласно общепринятым методологическим подходам [6], а также согласно рекомендациям по выделению и идентификации некоторых возбудителей изданными Международной Ассоциацией Клинической Микробиологии и Антимикробной Химиотерапии (МАКМАХ) полуавтоматическими, автоматическими и высокотехнологичными методами.

Выделение микроорганизмов проводили культуральным методом, высевая бактериологический материал на плотные питательные среды. Для первичного посева был подобран комплекс сред:

- кровяной агар – питательная среда общего назначения;
- агар Сабуро – среда для культивирования грибов;
- тиогликолевая среда – жидкая питательная среда, предназначенная для накопления биомассы микроорганизмов;

– агар Эндо – среда предназначенная для культивирования микроорганизмов группы кишечной палочки.

Культивирование проводили в термостате (LabTech, США) при температуре 37°С в течение 18 часов. Подсчет образовавшихся колоний проводился методом посева на питательные среды (чашечный метод). Расчет среднего количества микроорганизмов [2] КОЕ (N) в 1 мл проводили по формуле:

$$K = a * b * c,$$

где: K – количество микроорганизмов, в 1 г КОЕ/мл;

a – среднее арифметическое число колоний в чашке;

b – степень разведения;

c – масса, объем, поверхность (г/мл).

Следующим этапом нашего исследования было проведение идентификации выделенных консорциумов микроорганизмов методом времяпролетной масс-спектрометрии на времяпролетном масс-спектрометре MALDI-TOF (Bruker, Германия). Проведение идентификации осуществлялось по стандартной методике компании производителя. Интерпретация результатов исследования проводилась в программе MBT Compass по полученным в ходе идентификации масс-спектрам, которые несут в себе информацию о молекулярной массе аналита и его структуре. В дальнейшем, опираясь на результаты, полученные в ходе времяпролетной масс-спектрометрии проводили повторное культивирование колоний микроорганизмов естественных консорциумов с подсадкой к ним микроорганизмов других консорциумов для конструирования консорциумов, с целью изучения взаимного влияния различных видов микроорганизмов, а также для последующего анализа антибиотикочувствительности микроорганизмов консорциумов в зависимости от видового состава.

Анализ антибиотикочувствительности выделенных консорциумов микроорганизмов диско-диффузионным методом [7].

Результаты исследования и обсуждение.

Анализ полученных данных первой группы (контроль)

По результатам данных времяпролетной масс-спектрометрии были идентифицированы следующие консорциумы микроорганизмов верхних дыхательных путей:

- 1) *Staphylococcus aureus* + *Lactobacillus sharpaе*;
- 2) *Streptococcus vestibularis* + *Lactobacillus mucosae*.

В данных консорциумах доминирующими видами являлись:

- *Staphylococcus aureus* (из консорциума 1);
- *Streptococcus vestibularis* (из консорциума 2).

По результатам видовой идентификации методом времяпролетной масс-спектрометрии патогенных видов микроорганизмов не обнаружено. Среди выделенных микроорганизмов отмечен условно-патогенный вид микроорганизма – *Staphylococcus aureus*, но его содержание не превышает норму (<10 КОЕ/мл).

По результатам повторного культивирования полученных естественных консорциумов между собой с целью конструирования консорциумов, а также подтверждения или опровержения доминирующей роли микроорганизмов, входящих в состав естественных консорциумов, выявлено:

- *Staphylococcus aureus* является доминирующим видом над *Lactobacillus mucosae* и *Lactobacillus sharpaе*, то есть подавляет их рост;
- *Streptococcus vestibularis* является доминирующим видом над *Lactobacillus sharpaе* и *Lactobacillus mucosae*, то есть подавляет их рост.

Анализ консорциумов группы пациентов второй группы

Проведя анализ 7 групп пациентов второй группы можно сделать вывод о том, что естественный консорциум в сравнении с моделями «микробиологического конструирования» всегда обладал доминирующими свойствами. Сравнительная характеристика естественного консорциума проводилась в сравнении с 45-ю сконструированными моделями микробиома (рис. 1). Так в частности:

- *Staphylococcus epidermidis* входит в состав консорциумов: 2 и 3 (группа 1), 1,3,4,5 (группа 2), 3 (группа 3), 1,5,7 (группа 4), 2,3,4 (группа 5), 2 и 7 (группа 6), 2,4 (группа 7) и составляет 30,3% от всех консорциумов микроорганизмов;

– *Staphylococcus aureus* входит в состав консорциумов: 5 (группа 1), 3 (группа 2), 3,5,6 (группа 4), 2 и 3 (группа 5), 3,4,7 (группа 6), 2,3,5 (группа 7) и составляет 26,7% от всех консорциумов;

– *Streptococcus vestibularis* входит в состав консорциумов: 2 (группа 1), 3 (группа 3), 4 и 5 (группа 5), 1 и 3 (группа 6) и составляет 10,7% от всех консорциумов микроорганизмов;

– *Streptococcus salivarius* входит в состав консорциумов: 1 (группа 2), 2 (группа 4 и 5), 6 (группа 6) и составляет 7,1% от всех консорциумов микроорганизмов;

– *Klebsiella oxytoca* входит в состав консорциумов: 1 (группа 1), консорциум 4 (группа 4), 6 и 7 (группа 7) и составляет 7,1% от всех консорциумов микроорганизмов;

– *Klebsiella pneumoniae* входит в состав консорциумов: 5 (группа 1) и 4 (группа 6) и составляет 3,5% от общего числа консорциумов микроорганизмов;

– *Rothia mucilaginosa* входит в состав консорциумов: 3 (группа 1), 4 (группа 2), 2 (группа 4), 2 и 8 (группа 6) и составляет 8,9% от общего числа микроорганизмов;

– *Neisseria subflava* входит в состав консорциумов: 4 (группа 1), 2 и 4 (группа 3), 8 (группа 7) и составляет 7,1% от общего числа микроорганизмов;

– *Neisseria flavescens* входит в состав консорциумов: 6 (группа 2), 1 и 4 (группа 3), 1 (группа 5 и 7) и составляет 8,9% от всех консорциумов микроорганизмов;

– *Neisseria mucosae* входит в состав консорциума 4 (группа 1), 1 и 8 (группа 7) и составляет 5,3% от общего числа консорциумов;

– *Klebsiella aerogenes* входит в состав консорциума 1 (группа 2), 5 (группа 6) и составляет 3,5% от общего числа микроорганизмов;

– *Haemophilus parainfluenzae* входит в состав консорциумов: 3 (группа 1), 4 (группа 3), 8 (группа 6) и составляет 5,3% от общего числа консорциумов;

– *Lactobacillus rhamnosus* входит в состав консорциумов: 6 (группа 6), 3 и 5 (группа 7) и составляет 5,3% от общего числа консорциумов;

– *Escherichia coli* входит в состав консорциумов: 5 (группа 1), 2 (группа 2) и составляет 3,5% от общего числа консорциумов.

Оставшиеся микроорганизмы, входящие в состав оставшихся 38 консорциумов представлены единичными случаями и составляют 2,1% и менее.

На основании полученных данных можно заключить, что в выделенных консорциумах микроорганизмов доминирующими видами являются: *Staphylococcus epidermidis* (30,3%) *Staphylococcus aureus* (26,7%), *Streptococcus vestibularis* (10,3%). Менее 10% составляют микроорганизмы: *Streptococcus salivarius*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Rothia mucilaginosa*, *Neisseria subflava*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria mucosae*, *Klebsiella aerogenes*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Escherichia coli*. Оставшиеся 138 микроорганизмов входящие в состав консорциумов составляют менее 2%.

Согласно диско-диффузионному методу определения антибиотикочувствительности микроорганизмов входящих в состав консорциумов, выявлена абсолютная чувствительность к антимикробным препаратам ряда фторхинолонов, оказывающим широкий спектр антимикробного действия в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, в отличие от других групп антимикробных препаратов (рис. 2.). Именно поэтому, группе данных препаратов следует отдавать предпочтение в назначении лечения острых респираторных заболеваний.

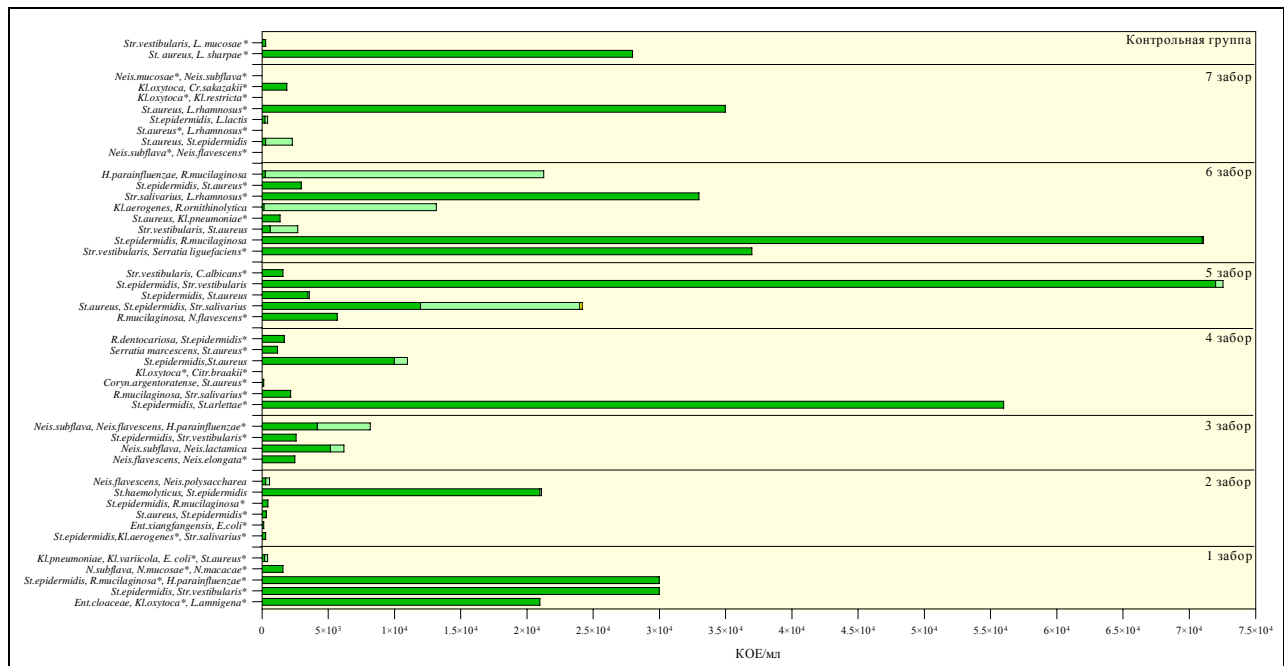


Рис.1. Количественное соотношение и доминирующая роль отдельных микроорганизмов в естественных консорциумах

Примечание: * обозначены микроорганизмы количество колониеобразующих единиц менее 10^2 ; Темно-зеленым цветом показаны доминирующие микроорганизмы в соответствующих естественных консорциумах; Светло-зеленым и желтым цветом показаны иные микроорганизмы, входящие в состав соответствующих естественных консорциумах.

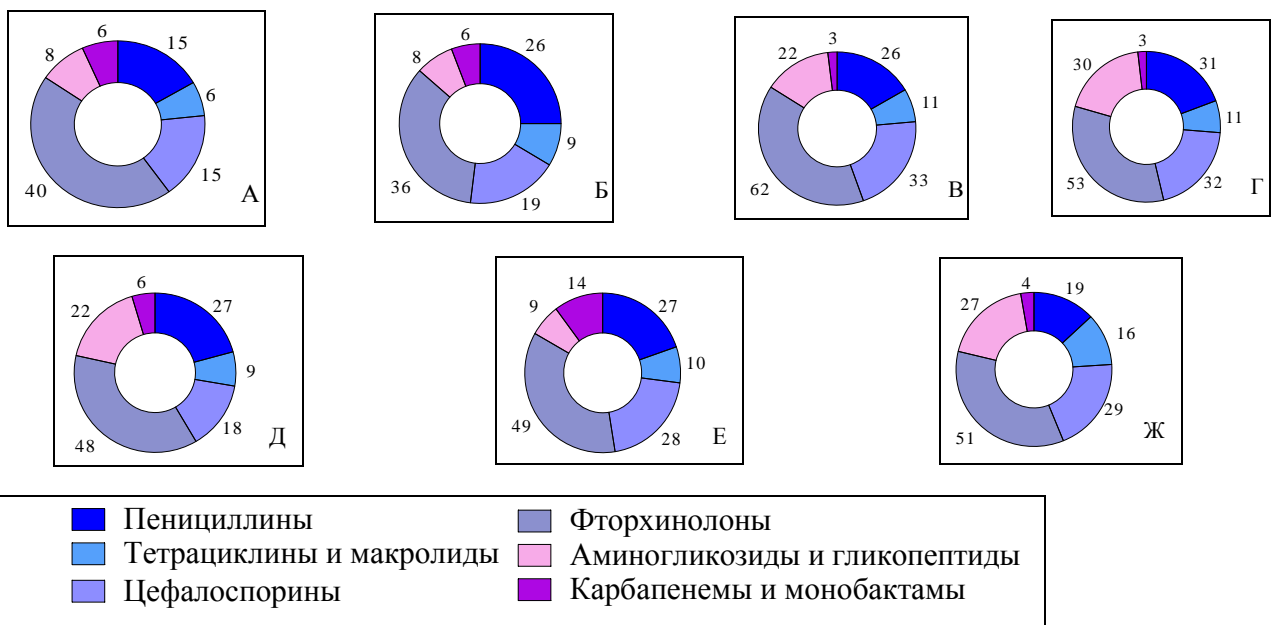


Рис. 2. Результаты антибиотикочувствительности выделенных из биологического материала (мазков из носа и зева) микроорганизмов у 7-ми групп пациентов второй группы

Примечание: А – забор №1; Б – забор №2; В – забор №3; Г – забор №4; Д – забор №5; Е – забор №6; Ж – забор №7.

Список литературы

1. Буслаев В.Ю. Анализ микробиоты лёгких и респираторного тракта человека при заболеваниях легочной системы (обзор) / В.Ю. Буслаев // Сибирский федеральный университет. Биология. – 2022. – Вып. 15 (3). – С. 396–421.
2. Красникова Л.В. Общая и пищевая микобиология. Ч. I. / Л.В. Красникова [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://lifelib.info/>
3. Семина Н.А. Методические рекомендации: определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890–04) / Н.А. Семина, Н.В. Сидоренко, С.П. Резван [и др.] // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2004. –Т. 6. №4. – 54 с.
4. Микробиота человеческого организма [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://servier.ru/mikrobiota-chelovecheskogo-organizma>
5. Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения с изменениями на 25 ноября 2020 года // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/9037002>
6. Приказ об унификации микробиологических методов исследования №535 // Электронный фонд правовых и нормативно-технических документов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/4202452931>
7. Рекомендации МАКМАХ // Российский микробиологический портал [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://microbius.ru/library/rekomendatsii->

makmah-opredelenie-chuvstvitelnosti-mikroorganizmov-k-antimikrobnym-preparatam-2021-novaya-versiya-2021-01

8. Кобзев Д.Ю. Роль микробиома дыхательных путей в респираторном здоровье / Д.Ю. Кобзев, Е.Н. Удовиченко, И.А. Перфилова [и др.] // Лечащий врач. – 2019. – №4. – С. 1–6.