

МИКРОБИОЛОГИЯ

© ЛЯМИН А.В., 2020

Лямин А.В.

РЕДКИЕ ВИДЫ В СТРУКТУРЕ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПОРЯДКА АСТИНОМУСЕТАLES, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 443099, Самара, Россия

Приведены данные о структуре кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales* и редких видах, выделенных и идентифицированных с использованием различных методов. В исследование включены штаммы нетуберкулезных микобактерий (НТМ), выделенные из клинического материала при обследовании на туберкулез в период с 2016 по 2019 годы. Общее количество образцов, с признаками роста НТМ, составило 316 проб. Первичное выделение на средах Левенштейна-Йенсена, Финн II, MGIT и идентификация НТМ методом ДНК-гибридизации. Все штаммы, которые не идентифицированы до вида и культуры, определённые как микроорганизмы с высоким содержанием G+C (High GC GR+) реидентифицированы с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®). Методом ДНК-гибридизации успешно идентифицировано до вида 188 штаммов, выделенных НТМ, что составило 59,5% от всех выделенных культур. Среди выделенных видов преобладали представители медленно растущих НТМ (*M. avium complex*, *M. gordonae*, *M. kansasii*), которые составили в совокупности 67,0% от всех идентифицированных до вида штаммов НТМ. Среди культур, для которых методом ДНК-гибридизации не удалось провести приемлемую идентификацию оказались преимущественно НТМ, среди которых доминировали *M. gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*. Ряд НТМ представлены редкими видами: *M. iranicum* и *M. pseudoshottsii*. Среди данной группы микроорганизмов выделены другие кислотоустойчивые аэробные актиномицеты, в том числе имеющие потенциальное клиническое значение: *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp., *Rhodococcus* spp., *Nocardia* spp. При идентификации культур, с высоким содержанием G+C выявлено наибольшее количество микробных ассоциаций, в том числе состоящих из двух видов НТМ (*M. monacense* + *M. flavescens*, *M. avium* + *M. kansasii*), ассоциации *M. gordonae* со стафилококками. В эту же группу попали редкие виды НТМ: *M. fredericbergense*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum*, представители родов *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*.

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии; кислотоустойчивые актиномицеты; редкие виды.

Для цитирования: Лямин А.В. Редкие виды в структуре кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales* выделенных из клинического материала. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (2): 111-115.

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-2-111-115>

Lyamin A.V.

RARE SPECIES IN THE STRUCTURE OF ACID-RESISTANT MEMBERS OF THE ORDER ACTINOMYCETALES ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Samara State Medical University, 43099, Samara, Russia

The article presents data on the structure of acid-resistant members of the order *Actinomycetales* and rare species that have been isolated and identified using various methods. The study included strains of non-tuberculous mycobacteria (NTM) isolated from clinical material during examination for tuberculosis in the period from 2016 to 2019. The total number of samples with signs of NTMs growth that were included in the study was 316 samples. Primary isolation on Levenshtein-Jensen, Finn II, and MGIT media and NTMs identification by DNA-hybridization. All strains that were not identified prior to the species and culture, identified as microorganisms with a high G+C content (High GC GR+) were re-identified using a MALDI-ToF Microflex LT mass spectrometer (Bruker®). By the method of DNA-hybridization, 188 strains isolated by NTM were successfully identified to form 58.5% of all selected cultures. Among the selected species, representatives of slowly growing NTMs (*M. avium complex*, *M. gordonae*, *M. kansasii*) predominated, which amounted to 67.0% of all NTM strains identified to the species. Among the cultures for which DNA hybridization failed to carry out acceptable identification, predominantly NTMs were found, among which *M. gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii* dominated. A number of NTMs were represented by rare species: *M. iranicum* and *M. pseudoshottsii*. Among this group of microorganisms, other acid-resistant aerobic actinomycetes were isolated, including those of potential clinical significance: *Gordonia* spp., *Tsukamurella* spp., *Rhodococcus* spp., *Nocardia* spp. When identifying cultures containing high concentrations of G+C, the maximum number of microbial associations was revealed, including those consisting of two types of NTMs (*M. monacense* + *M. flavescens*, *M. avium* + *M. kansasii*), as well as associations of *M. gordonae* with staphylococci. The same group included rare NTM species: *M. fredericbergense*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum*, as well as representatives of the genera *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*.

Key words: non-tuberculous mycobacteria; acid-resistant actinomycetes; rare species.

For citation: Lyamin A.V. Rare species in the structure of acid-resistant members of the order *Actinomycetales* isolated from clinical material. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (2): 111-115. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-111-115>

For correspondence: Lyamin Artem Viktorovich, MD, Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology; e-mail: avlyamin@rambler.ru

Information about authors:

Lyamin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5905-1895>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 02.12.2019
Accepted 09.12.2019

Введение. Кислотоустойчивые аэробные актиномицеты – разнообразная группа микроорганизмов, особенностью которых является строение клеточной стенки, обеспечивающее устойчивость к различным факторам окружающей среды. С точки зрения клинической микробиологии наибольший интерес среди них вызывают представители родов *Nocardia* spp., *Gordonia* spp., *Rhodococcus* spp., *Tsukamurella* spp. и нетуберкулезные микобактерии (НТМ) [1,2]. Данная группа микроорганизмов практически не попадает в поле деятельности врачей-бактериологов, за исключением НТМ, выделение и идентификация которых проводится в микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы. В отношении представителей других родов из порядка *Actinomycetales* алгоритмы лабораторной диагностики практически не разработаны, но диагностика микобактериозов на сегодняшний день становится всё более доступной. Микобактериозы – группа заболеваний различной локализации, этиологическим фактором развития которых являются НТМ. Интерес к данной группе заболеваний возрастает с каждым годом, что обусловлено увеличением количества пациентов с факторами риска по развитию патологических процессов, вызванных НТМ [3]. Исторически сложилось так, что диагностикой микобактериозов в России занимаются в микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы. Среди методов видовой идентификации НТМ, которые рекомендованы ВОЗ широко используется метод ДНК-гибридизации, предложенный компанией «Hain Lifescience» (Германия). Данный метод позволяет проводить идентификацию наиболее часто выделяемых из клинического материала видов НТМ, представителей микобактерий из туберкулезного комплекса (МТВс). При использовании двух ДНК-стрипов возможна идентификация 28 видов НТМ [4]. Известно значительно большее количество видов НТМ, по данным некоторых авторов до 200, среди которых для более чем 50 видов описана этиологическая роль в развитии патологических состояний у человека [5]. Возникает вопрос о необходимости оценки распространённости видов НТМ в клиническом материале, идентификация которых невозможна при использовании метода ДНК-гибридизации.

Использование метода ДНК-гибридизации исключает идентификацию других представителей порядка *Actinomycetales* за исключением НТМ. При проведении исследования с использованием тест-системы «Hain Lifescience» возможно определение микроорганизмов, которые условно относятся к группе грамположительных микроорганизмов с высоким содержанием гуанина и цитозина (Г+Ц) в геноме, для основной массы представителей кислотоустойчивых аэробных актиномицет данный признак является стабильным и может быть использован в качестве условного скрининга при работе с первичными посевами для отбора культур для дальнейшей идентификации.

В последние десятилетия в рутинной микробиологической практике стал широко использоваться метод идентификации микроорганизмов, основанный на MALDI-ToF масс-спектрометрии, который позволяет идентифицировать типичные и редкие виды из порядка *Actinomycetales*, включая НТМ. Библиотеки различных масс-спектрометров содержат данные, позволяющие достаточно точно проводить видовую идентификацию более 160 различных представителей рода *Mycobacterium* [6].

Цель работы - оценка распространённости и описание структуры редких видов кислотоустойчивых актиномицет, выделенных из клинического материала, видовой идентификация которых невозможна при использовании метода ДНК-гибридизации.

Материал и методы. В исследование включены штаммы НТМ, выделенные из клинического материала при обследовании на туберкулез в период с 2016 по 2019 годы. Общее количество образцов, с признаками роста НТМ, которые были включены в исследование составило 316 проб. Первичное выделение на средах Левентштейна-Йенсена, Финн II, MGIT и идентификация НТМ методом ДНК-гибридизации проводилась на базе бактериологической лаборатории ГБУЗ «Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н. В. Постникова». Все штаммы, не идентифицированные до вида и культуры, определенные как микроорганизмы с высоким содержанием Г+Ц (High GC GR+) реидентифицированы на базе микробиологического отдела КДЛ клиник ФГБОУ ВО «СамГМУ» Минздрава России с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT (Bruker®). Для идентификации использован метод экстракции бактериальных белков муравьиной кислотой. Если видовую идентификацию не удалось провести напрямую из пробирки с плотной яичной питательной средой, или из пробирки с жидкой питательной средой MGIT, культура пересевалась на 5% кровяной агар и универсальную хромогенную среду (BioRad). Посевы инкубировались в течение 7 сут при температуре 37° С, в случае отсутствия роста на первом этапе культивирования, посевы дополнительно инкубировали при 28° С в течение 14 сут. Идентификацию всех выросших микроорганизмов проводили с использованием MALDI-ToF масс-спектрометра Microflex LT ((Bruker®) методом прямого нанесения или расширенного нанесения с муравьиной кислотой.

Результаты. Методом ДНК-гибридизации успешно идентифицировано до вида 188 штаммов, выделенных НТМ, что составило 59,5% от всех выделенных культур. Среди выделенных видов преобладали представители медленно растущих НТМ (*M. avium* complex, *M. goodii*, *M. kansasii*), которые составили в совокупности 67,0% от всех идентифицированных до вида штаммов НТМ. Среди быстрорастущих НТМ доминирующим видом была *M. fortuitum* (21,8% от общего количества

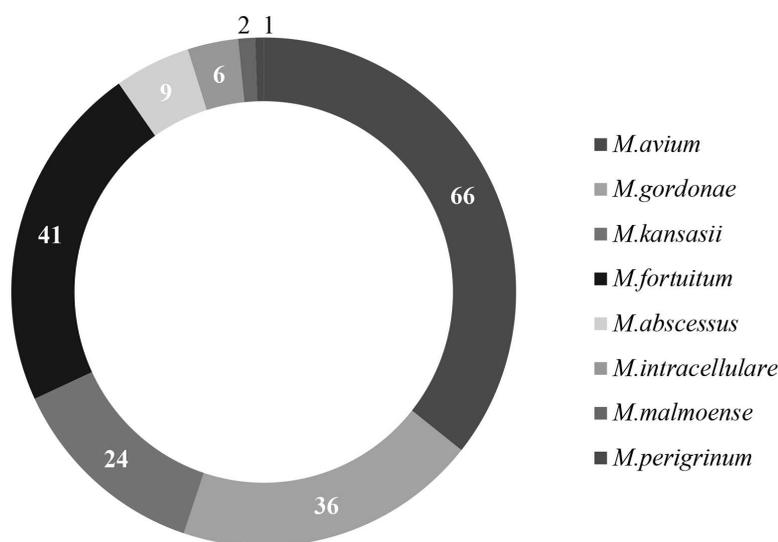


Рис. 1. Спектр нетуберкулёзных микобактерий, идентифицированных до вида с использованием метода ДНК-гибридизации (абсолютные значения).

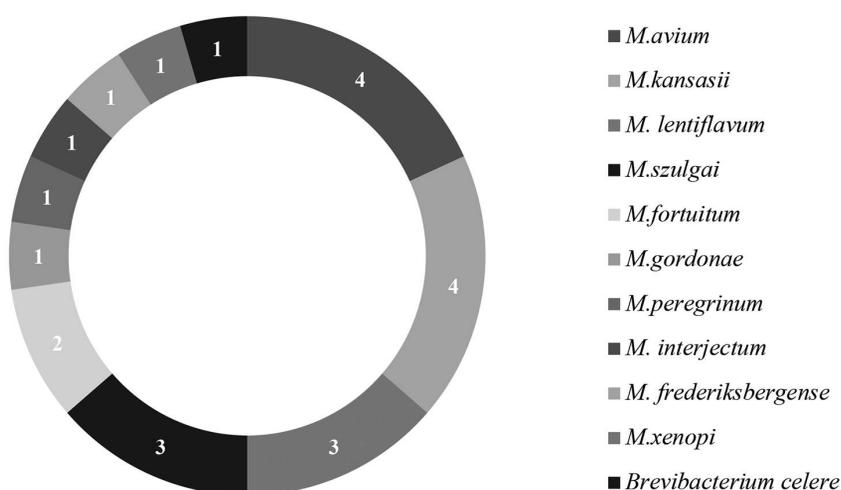


Рис. 2. Спектр микроорганизмов, первично идентифицированных до рода *Mycobacterium* (абсолютные значения).

идентифицированных до вида НТМ). Остальные виды НТМ представлены единичными штаммами (рис. 1).

Общее количество образцов, из которых культуры удалось идентифицировать до рода составило 22 (7% от всех образцов, включенных в исследование). Для 67 образцов (21,2% от всех образцов, включенных в исследование) не удалось провести идентификацию выделенных культур с использованием метода ДНК-гибридизации. Для 39 штаммов (12,3% от всех образцов) идентифицированы грамположительные микроорганизмы с высоким содержанием Г+Ц.

При реидентификации штаммов, отнесённых к роду *Mycobacterium* методом MALDI ToF масс-спектрометрии для всех штаммов определена видовая принадлежность. 1 штамм оказался представителем другого рода – *Brevibacterium celere*. Преобладающими видами в данной группе оказались медленно растущие

НТМ: *M. kansasii*, *M. avium* (в совокупности 36,4%). Кроме одного штамма, идентифицированного как представитель рода *Brevibacterium*, в данной группе идентифицирован 1 штамм НТМ, который не мог быть идентифицирован до вида с использованием тест-системы Hain Lifescience – *M. frederiksbergense* (рис. 2).

Из 67 образцов, для которых не удалось провести приемлемую идентификацию выделено и идентифицировано 68 штаммов микроорганизмов. В данной группе микроорганизмов выявлено значительное разнообразие (рис. 3).

Доминировали представители рода *Mycobacterium*, они составили 70,6% от всех выделенных микроорганизмов, первичная идентификация которых с использованием метода ДНК-гибридизации не дала результатов. Среди НТМ выделены: 14 штаммов *M. gordonae*, по 11 штаммов *M. avium* и *M. kansasii*, 6 штаммов *M. fortuitum*,

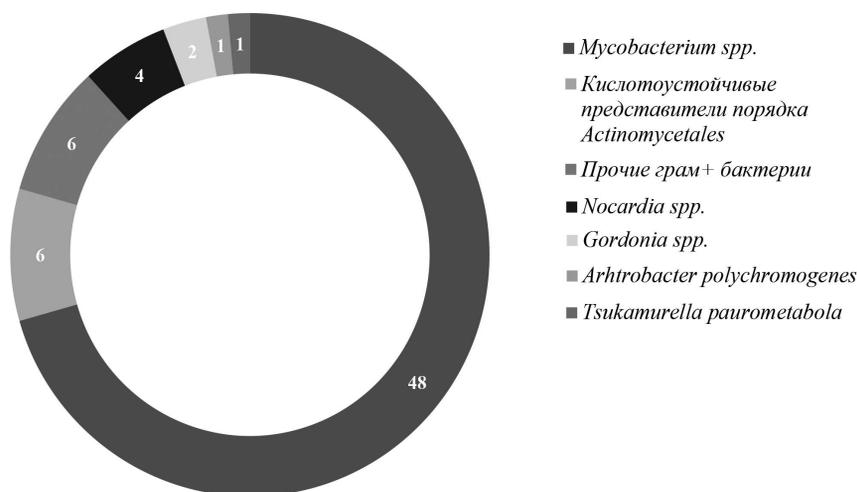


Рис. 3. Спектр микрофлоры не идентифицированной с использованием метода ДНК-гибридизации по группам (абсолютные значения).

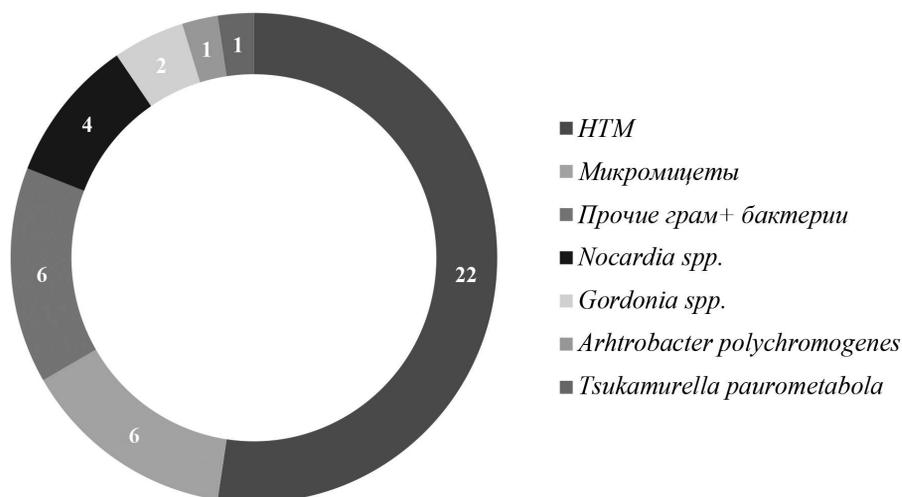


Рис. 4. Спектр микрофлоры, идентифицированной как грамположительные микроорганизмы, с высоким содержанием Г+Ц (абсолютные значения).

по 1 штамму *M. abscessus*, *M. bovis*, *M. chimaera/intracellulare*, *M. iranicum*, *M. pseudoshottsii*, *M. peregrinum*.

Второй по численности группой микроорганизмов, которые не были идентифицированы на первом этапе исследования оказались грамположительные палочки – представители родов *Corynebacterium* и *Bacillus*, которые составили 11,8%. Идентифицировано 3 штамма *Corynebacterium amycolatum*, по 1 штамму *Corynebacterium kroppenstedii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus tojavensis*, *Bacillus oleoroniis*, *Paenibacillus lactis*.

В данной группе микроорганизмов кроме НТМ оказались и другие кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales*. Идентифицировано 3 штамма *Gordonia rubripertincta* и по 1 штамму *Tsukamurella paurometabola*, *Rhodococcus equi*, *Streptomyces phaeochromogenes*.

Кроме бактерий в группе неидентифицированных микроорганизмов оказались 4 штамма грибов, два из которых не удалось идентифицировать с помощью

масс-спектрометрии до вида: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Aspergillus spp.*, *Ulocladium spp.*, *Trichosporon asahii*.

Единственная микробная ассоциация, выявленная в данной группе микроорганизмов представлена *M. fortuitum* и *S. phaeochromogenes*.

В 39 образцах при проведении исследования методом ДНК-гибридизации получен результат свидетельствующий о принадлежности выделенной культуры к группе грамположительных микроорганизмов с высоким содержанием Г+Ц. Из образцов данной группы выделено и идентифицировано 42 штамма бактерий и грибов. Спектр выделенных микроорганизмов представлена на (рис. 4). В одном случае рост культуры при использовании описанного в исследовании метода отсутствовал, в 4 случаях выделена ассоциация, состоящая из 2 микроорганизмов.

В спектре НТМ преобладали медленно растущие виды. Идентифицировано: *M. gordonae* – 5 штаммов, *M. avium* и *M. chimaera/intracellulare* по 3 штамма, *M. kansasii* и *M. abscessus* по 2 штамма. Остальные виды НТМ идентифицированы по одному штамму: *M. fredericbergense*, *M. monacense*, *M. flavescens*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum*. Среди кислотоустойчивых представителей порядка *Actinomycetales* кроме НТМ выделены: 3 штамма *Nocardia farcinica*, по 1 штамму *Gordonia rubripertincta*, *Gordonia sputi*, *Nocardia brevicatena*, *Tsukamurella paurometabola*.

Грибы представлены в основном *Candida albicans* (4 штамма), по 1 штамму *Magnusiomyces capitatus*, *Penicillium chrysogenum*.

Остальные микроорганизмы представлены грамположительными бактериями: 2 штамма *Kocuria marina*, по 1 штамму *Arhthrobacter polychromogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Corynebacterium amycolatum*.

Обсуждение. Анализируя полученные результаты можно выявить определённые закономерности, связанные с ограничением использования метода ДНК-гибридизации в отношении некоторых видов НТМ. Данным методом идентифицировано около 60% штаммов. Структура идентифицированных микобактерий совпадает данными других исследований [2, 7]. Преобладают медленно растущие НТМ, среди которых лидируют представители *M. avium* complex, *M. gordonae*, *M. kansasii*. Среди быстро растущих НТМ преобладают *M. fortuitum*.

Используемая в исследовании тест-система исключает идентификацию микобактерий, виды которых в неё не включены. По нашим результатам при её использовании не удалось провести видовую идентификацию и

для тех видов, которые должны были быть идентифицированы. Из 22 образцов, в которых микобактерии идентифицированы до рода в 20 с использованием метода масс-спектрометрии определены виды, которые входят в перечень тест-системы. При этом один вид оказался не относящимся к роду *Mycobacterium*.

Среди культур, для которых методом ДНК-гибридизации не удалось провести приемлемую идентификацию оказались преимущественно НТМ, среди которых доминировали *M. gordonae*, *M. avium*, *M. kansasii*. Ряд НТМ представлен редкими видами: *M. iranicum*, *M. pseudoshottsii*. Важно то, что среди данной группы микроорганизмов выделены другие кислотоустойчивые аэробные актиномицеты, в том числе имеющие потенциальное клиническое значение: *Gordonia rubipertincta*, *Tsukamurella paurometabola*, *Rhodococcus equi* [8, 9].

Такие результаты могут быть обусловлены несколькими причинами: значительной вариабельностью внутри и между отдельными видами НТМ, что может приводить к неточной идентификации с использованием метода ДНК-гибридизации; практическим ограничением возможности разделения микст-культур и микробных ассоциаций в условиях микробиологических лабораторий противотуберкулёзной службы; отсутствием возможности выделения «прихотливых», труднокультивируемых и других микроорганизмов в рамках проведённого исследования, которые могли затруднять идентификацию.

Интересны результаты идентификации культур, содержащих высокие концентрации Г+Ц. Среди данной группы выявлено максимальное количество микробных ассоциаций, в том числе состоящих из двух видов НТМ (*M. monacense* + *M. flavescens*, *M. avium* + *M. kansasii*), ассоциации *M. gordonae* со стафилококками. В эту же группу попали редкие виды НТМ: *M. fredericbergense*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. bohemicum*, *M. septicum* и представители родов *Nocardia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*.

Заключение. Кислотоустойчивые представители порядка *Actinomycetales*, в том числе и нетуберкулёзные микобактерии представляют разнообразную группу микроорганизмов, имеющих ряд сходств и различий, способных значительно затруднять идентификацию указанных патогенов до вида. Использование методов, основанных на ДНК-гибридизации, с одной стороны, позволяет достаточно точно идентифицировать часть наиболее часто встречающихся видов НТМ, с другой стороны, имеет значительные ограничения идентификации в отношении редких видов. Отсутствие результатов по видовой идентификации части видов, которые включены в тест-систему требует проведения дополнительных исследований и поиска причин полученных результатов идентификации. MALDI-ToF масс-спектрометрия является важным методом, позволяющим проводить идентификацию до вида для большинства видов представителей порядка *Actinomycetales*. Необходимы алгоритмы, позволяющие стандартизировать методы их вы-

деления из клинического материала и рекомендации по интерпретации полученных результатов и оценке клинического значения выделенных культур.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-6, 8,9 см. REFERENCES)

1. Чучалин А.Г. Респираторная медицина: в 2 т. (Т. 1). М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
2. Майорова А.А., Степаншина В.Н., Коробова О.В., Шемякин, И.Г., Лазовская А.Л., Ильина Е.А. Видовая идентификация микобактерий нетуберкулёзного комплекса методом амплификации и секвенирования генов 16S рРНК. *Журнал молекулярной генетики, микробиологии, вирусологии*. 2004; 3: 11-20.
7. Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю., Устинова В.В., Черноусова Л.Н. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулёзных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GeoType *Mycobacterium* CM /AS (Hain Lifescience, Германия). *Туберкулез и болезни легких*. 2017; 5: 54-9.

REFERENCES

1. Chuchalin A.G. *Respiratory medicine* [Respiratornaya meditsina. T.2]. Moscow: GEOTAR - Media; 2007. (in Russian)
2. Maiyorova A.A., Stepanshina V.N., Korobova O.V., Shemyakin I.G., Lazovskaya A.L., Il'ina E.A. Specific identification of mycobacteria of a non-tuberculosis complex by amplification and sequencing of 16S rRNA genes. *Zhurnal molekulyarnoy genetiki, mikrobiologii, virusologii*. 2004; 3: 11-20. (in Russian)
3. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. *Thorax*. 2016; 71: 1-22.
4. Springer B, Stockman L., Tescher K. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method. *J. Clin. Microbiol*. 1996; 34: 296-303.
5. Daley C.L., Griffith C.L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis*. 2010; 14(6): 665-71.
6. Rodriguez-Temporal D., Perez-Risco D., Struzka E.A., Mas M., Alcaide F. Evaluation of Two Protein Extraction Protocols Based on Freezing and Mechanical Disruption for Identifying Nontuberculous Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry from Liquid and Solid Cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2018; 56(4): e01548-17.
7. Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Larionova E.E., Andrievskaya I.Ju., Ustinova V.V., Chernousova L.N. Monitoring of species diversity of nontuberculous mycobacteria in different areas using Geo-Type *Mycobacterium* CM / AS DNA strips (Hain Lifescience, Germany). *Tuberkulez i bolezni legkikh*. 2017; 5: 54-9. (in Russian)
8. McNeil M.M., Brown J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin. Microbiol. Rev*. 1994; 7(3): 357-417.
9. Safaei S., Fatahi-Bafghi M., Pouresmaeil O. Role of *Tsukamurella* species in human infections: first literature review. *New Microbes New Infect*. 2017; 22: 6-12.

Поступила 02.12.19

Принята к печати 09.12.19