

Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Зайцева М.А., Артеменко К.Л., Кауфман А.С.

## ВЫБОР АНТИБИОТИКА В МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»  
Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург, Российская Федерация

*Изучена эффективность использования тест-системы “Выбор антибиотика” для выращивания максимально возможного количества бактерий из патологического материала при остром цистите. По результатам метагеномного анализа установлено, что тест-система позволяет поддерживать рост практически всех бактерий, выявленных в моче, в том числе относящихся к “пока не культивируемым”. Проведено сравнение результатов стандартного определения чувствительности бактерий к антибиотикам и эффективного лекарственного препарата по результатам использования тест-системы “Выбор антибиотика”. Показано, что тест-система позволяет без выделения чистой культуры выбрать антибиотик в течение 6–20 ч.*

**Ключевые слова:** выбор антибиотика; экспресс-диагностика; метагеномный анализ; пока не культивируемые бактерии; инфекции мочевыделительной системы.

**Для цитирования:** Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Зайцева М.А., Артеменко К.Л., Кауфман А.С. Выбор антибиотика в микробиологическом исследовании инфекций мочевыделительной системы. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (2): 114-116.

DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-2-114-116.

*Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamian T.A., Zaslavskaja N.V., Vikina D.S., Zaitseva M.A., Artemenko K.M., Kaufman A.S.*

### CHOOSING ANTIBIOTIC IN MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF INFECTIONS OF URINARY EXCRETION SYSTEM

The I.P. Pavlov first St. Petersburg state medical university of Minzdrav of Russia, 197022 St. Petersburg, Russia

*The effectiveness of application of test-system “Choice of antibiotic” was evaluated as a tool for incubation of maximal amount of bacteria from pathological material under acute cystitis. The results of meta-genome analysis established that test-system permits supporting growth of practically all bacteria detected in urine, including ones relating to “uncultivated for the present”. The comparison of results of standard detection of sensitivity of bacteria to antibiotics and identification of effective pharmaceutical according the results of application of test-system “Choice of antibiotic” as well was implemented. It is demonstrated that test-system permits choosing antibiotic during 6-20 hours without isolation of pure strain.*

**Key words:** choice of antibiotic; express-diagnostic; meta-genome analysis; uncultivated for the present bacteria; infections of urinary excretion system

**For citation:** Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamian T.A., Zaslavskaja N.V., Vikina D.S., Zaitseva M.A., Artemenko K.M., Kaufman A.S. Choosing antibiotic in microbiological analysis of infections of urinary excretion system. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2016; 61 (2): 114-116. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-2-114-116.

**For correspondence:** Tetz V.V., doctor of medical sciences, professor, head of chair of microbiology, virology and immunology, e-mail: vtetzv@yahoo.com

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Financing.** *The study had no sponsor support.*

Received 27.05.15

Accepted 15.12.15

Эффективность лечения инфекций мочевыделительной системы в значительной степени зависит от правильного выбора антимикробных препаратов. Выделение и идентификация возбудителя и оценка его чувствительности к антибиотикам занимают 3–4 дня, при этом нет полной уверенности, что изолирован и изучен именно возбудитель данного патологического процесса и в очаге инфекции нет других бактерий. Метагеномный анализ состава микрофлоры различных материалов показал, что классические методы бактериологии

не позволяют выделить и идентифицировать все микробы, находящиеся в изучаемом объекте. Такие бактерии, гены которых можно выявить, а методы выделения чистых культур еще не разработаны, получили название “пока не культивируемые”. Такие бактерии обнаружены и среди патогенных микроорганизмов [1, 2].

Для повышения эффективности лабораторной диагностики необходимо иметь экспресс-метод исследования, который позволяет в течение одного дня обнаружить как можно больше микробов, находящихся в патологическом материале и найти антибиотики, эффективно на них действующие.

Цель работы – изучение нового подхода в микробиологическом исследовании, позволяющего одновременно получать

Для корреспонденции: Тец Виктор Вениаминович, ст. науч. сотрудник, E-mail: vtetzv@yahoo.com

рост максимально возможного количества разных бактерий из очага поражения и данные об эффективности действия на них антибиотиков.

**Материал и методы.** Материал для исследования моча (больная 45 лет, диагноз острый цистит). Время между забором материала и включением его в исследование не превышало 24 ч, условия хранения: 4°C.

Питательные среды: Уриселект 4 (Bio-Rad, Франция), элективный солевой агар, цетримидный агар (Биомедиа, СПб), *Candida brillians* (Oxoid, Великобритания), (Биомедиа, СПб).

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

Тест-система «Выбор Антибиотика» (ТСВА) для диагностики, культивирования бактерий и оценки действия на них антибиотиков (амоксциллин/клавуланат, азитромицин, цефтриаксон, левофлоксацин, доксициклин, ципрофлоксацин, триметоприм/сульфаметоксазол, фосфомицин, фуразидин, гентамицин) (Новые Антибиотики, Россия).

**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, используя зубактериальные праймеры 27F-534R, фланкирующие гипервариабельный участок гена 16S рРНК.

27F: '5-AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG-3'

534R: '5-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'

Используемая в работе пара олигонуклеотидных праймеров специфична консервативным участкам гена 16S рРНК и применяется в метагеномных исследованиях для выявления бактериального разнообразия различных сообществ [3]. Метагеномное секвенирование фрагмента гена 16S рРНК произведено на пиросеквенаторе Roche/454 GenomeSequencer FLX Titanium. Максимальная длина полученных последовательностей составила 507 нуклеотидов, химерные последовательности и последовательности короче 300 нуклеотидов не включены в анализ.

**Анализ разнообразия и таксономического состава.** Каждая полученная в ходе пиросеквенирования последовательность идентифицирована путем сравнения с последовательностями баз данных GenBank и EzTaxon, используя алгоритмы BLASTN поиска и попарное сравнение [4]. 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 CompleteLinkageClustering, 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 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. Репре-

зентативные последовательности кластеров таксономически классифицировали. Классификация видов на всех этапах работы произведена на основе генотипического подхода в соответствии с «Международным кодексом номенклатуры бактерий» (ICNB). В случае, если репрезентативная последовательность имела гомологию более 97% с последовательностью валидированного микроорганизма, кластер относили к соответствующему виду.

**Результаты и обсуждение.** В ходе стандартного микробиологического исследования из мочи изолирована кишечная палочка, давно известная как один из возбудителей заболеваний мочевыделительной системы.

В результате метагеномного исследования исходной мочи и бактерий, выросших в контроле на ТСВА, установлено значительное видовое разнообразие бактерий. При этом выявлены бактерии 4 видов, 3 родов, входящих в 1 семейство *Enterobacteriales* (см. таблицу). Это свидетельствует о высокой эффективности ТСВА для обеспечения роста всего разнообразия микробов, которые встречаются в патологическом материале.

В результате проведенных исследований установлено почти 100% совпадение видов микроорганизмов, обнаруженных в патологическом материале и выросших на ТСВА.

Большинство бактерий, обнаруженных в пробе мочи при метагеномном анализе, ранее описаны как возбудители болезней растений и, позже, человека. Возбудителями оппортунистических инфекций считаются *E. cloacae*, *E. hormaechei* [5–10]. Бактерии рода *Shigella* привычно воспринимаются как возбудители кишечных инфекций. Вместе с тем представители этого рода могут быть и причиной заболеваний мочевой системы [11].

Все штаммы, кроме *E. coli*, 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 различного происхождения. В микробиологии уже давно достигнуто понимание, что большая часть бактерий, входящих в микробиоту и вызывающих заболевания человека, относятся к «пока не культивируемым бактериям». Такие 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. hormaechei* и *E. cloacae* почти всегда устойчивы к ампициллину и цефалоспорином [9–12]. Для шигелл также показано распространение устойчивости к антибиотикам [13].

Частично преодолеть эту проблему можно при использовании ТСВА. Хотя она не позволяет оценить уровень чув-

**Микроорганизмы, выявленные при метагеномном анализе и посеве мочи на ТСВА**

Таксон	Метагеномный анализ	ТСВА
Семейство	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Род	<i>Escherichia</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>
Вид	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Shigella spp</i>	<i>Shigella spp</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>

ствительности к антибиотикам отдельных бактерий, но дает возможность выбрать препарат, который в концентрации, создаваемой в очаге поражения, способен блокировать рост всех микроорганизмов, имеющихся в патологическом материале данного больного. Для этого на ТСВА на среду с антибиотиками засеяли раневое отделяемое. В присутствии каждого антибиотика в разных лунках мы регистрировали совместный рост культивируемых и «пока не культивируемых бактерий», находящихся в раневом отделяемом. Отсутствие роста бактерий через 6 ч (предварительный результат) и 20–24 ч (окончательный) позволило выбрать antimicrobные препараты, предотвращающие рост всех бактерий, находящихся в патологическом материале.

По данным стандартного бактериологического анализа изолированный штамм *E. coli* чувствителен ко всем испытанным препаратам (ампициллину, ампициллин/клавуланату, цефтазидиму, цефотаксиму, цефоперазолу, цефепиму, меропинему, имипенему, ципрофлоксацину, амикацину, гентамицину). По результатам роста микроорганизмов из патологического материала на среде с антибиотиками в тест-системе, эффективными против всех бактерий, как культивируемых, так и «пока не культивируемых», являлись левофлоксацин, доксициклин, триметоприм/сульфаметоксазол, фуразидин, гентамицин. Количество эффективных препаратов, действующих на все микробы, содержащиеся в патологическом материале и способные расти на ТСВА, меньше, чем выбранные для изолированного штамма *E. coli*.

Полученные результаты свидетельствуют, что существующие микробиологические технологии пока не позволяют изолировать и изучать все бактерии, находящиеся в патологическом материале при инфекциях мочевыделительной системы. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных лабораторных методов следует считать обнаружение ранее не изучавшихся «пока не культивируемых бактерий». Чаще всего такие бактерии дают рост при совместном выращивании в составе смешанных сообществ, где в среду выделяются определенные факторы, без которых каждый вид по отдельности расти не способен [14, 15].

Можно предполагать, что патологический процесс вызван не только тем микробом или микробами, которые удалось выделить и идентифицировать общепринятыми, стандартными методами. «Пока не культивируемые бактерии» в настоящее время не выявляются стандартными методами, что значительно снижает ценность существующего лабораторного исследования. Полученные результаты указывают также на значительную условность подбора антибиотиков на основании стандартных подходов по выделению чистой культуры и определения чувствительности к антибиотикам.

Использование ТСВА в выборе антибиотика при инфекции мочевыделительной системы позволило в течение 6–20 ч вырастить в составе смешанных сообществ бактерии, которые по данным метагеномного анализа соответствовали микроорганизмам, выделенным из материала, полученного от больного, и определить эффективные препараты.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

#### ЛИТЕРАТУРА (pp. 1–7, 9–13 см. REFERENCES)

8. Фельдблюм И.В., Захарова Ю.А., Деменко С.Г. Сравнительная оценка различных подходов к изучению заболеваемости гнойно-септическими инфекциями среди родильниц в акушерских стационарах. *Медицинский альманах*. 2011; (5): 209–12.

14. Тец В.В., Тец Г.В., Викина Д.С., Вечерковская М.Ф., Харламова В.В. Неизвестные возбудители заболеваний в микрофлоре ротовой полости человека, актуальные для оториноларингологии. *Вестник оториноларингологии*. 2014; (1): 33–6.
15. Тец Г.В., Викина Д.С., Вечерковская М.Ф., Доморад А.А., Харламова В.В., Тец В.В. Новые подходы к изучению условно патогенных бактерий микрофлоры ротовой полости человека. *Стоматология*. 2013; (1): 14–6.

Поступила 27.05.15

#### REFERENCES

1. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34 (4): 415–25.
2. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133–41.
3. Petrosino J.F., Highlander S., Luna R.A., Gibbs R.A., Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* 2009; 55 (5): 856–66.
4. Schloss P., Westcott S.L., Ryabin T., Hall J.R., Hartmann M., Hollister E.B. et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (23): 7537–41.
5. Cruz A.T., Cazacu A.C., Allen C.H. *Pantoea agglomerans*, a plant pathogen causing human Disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (6): 1989–92.
6. Mezzatesta M.L., Gona F., Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012; 7 (7): 887–902.
7. Fraser S.L., Sinave S.P., Mileno M.D. *Enterobacter* Infections: Practice Essentials, Background, Pathophysiology. Available at: <http://www.emedicine.medscape.com/article/216845-overview> (accessed 13 Mar 2014).
8. Fel'dblyum I.V., Zakharova Yu.A., Demenko S.G. Comparative evaluation of different approaches to the study of the incidence of septic infections among women in childbirth in maternity hospitals. *Meditsinskiy al'manakh*. 2011; (5): 209–12. (in Russian)
9. O'Hara S.M., Steigerwalt A.G., Hill B.C., Farmer J.J., Fanning G.R., Brenner D.J. *Enterobacter hormaechei*, a new species of the family Enterobacteriaceae formerly known as enteric group 75. *J. Clin. Microbiol.* 1989; 27 (9): 2046–9.
10. Garazzino S., Aprato A., Maiello A., Masse A., Biasibetti A., De Rossa F.J. 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): 1459–61.
11. Papasian S.J., Enna-Kifer S., Garrison B. Symptomatic *Shigella sonnei* urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33 (8): 2222–3.
12. John G.J.Jr., Sharbaugh R.G., Bannister E.R. *Enterobacter cloacae*: bacteremia, epidemiology, and antibiotic resistance. *Rev. Infect. Dis.* 1982; 4 (1): 13–28.
13. DeLappe N., O'Halloran F., Fanning S. Corbett-Feeney G., Cheasty T., Cormican M. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Shigella sonnei* isolates from Western Ireland, an area of low incidence of infection. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 1919–24.
14. Tets V.V., Tets G.V., Vikina D.S., Veчерkovskaya M.F., Kharlamova V.V. Unknown pathogens in the microflora of the human oral cavity, pressing for otorhinolaryngology. *Vestnik otorinolaringologii*. 2014; (1): 33–6. (in Russian)
15. Tets G.V., Vikina D.S., Veчерkovskaya M.F., Domorad A.A., Kharlamova V.V., Tets V.V. New approaches to the study of opportunistic bacteria flora of the mouth of man. *Stomatologiya*. 2013; (1): 14–6. (in Russian)

Received 27.05.15