

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Мануйлова Е.Б.<sup>1</sup>, Садеков Т.Ш.<sup>1</sup>, Мехтиев Э.Р.О.<sup>1</sup>, Затевалов А.М.<sup>1</sup>, Самойлова М.В.<sup>2</sup>,  
Миронов А.Ю.<sup>1,3</sup>

### МИКРОБИОМ-АССОЦИИРОВАННАЯ МЕТАБОЛОМИКА В КЛИНИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ТОНЗИЛЛИТА

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского»  
Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682, Москва, Россия

*Исследованы особенности функциональной активности микробиоценоза ротоглотки при тонзиллите методом микробиом-ассоциированной метаболомики. Построена модель предиктивной диагностики «Тонзиллит», проведена её валидация и после объединения обучающей и валидационной выборок построена модель «Тонзиллит 1.0». Установлено, что в дискриминантном уравнении модели «Тонзиллит» включены концентрации анаэробных микроорганизмов – пропионовая и масляная кислота, а в модели «Тонзиллит 1.0» включена еще и концентрация валериановой кислоты. Моделью «Тонзиллит», построенной на результатах биохимического анализа микрофлоры ротоглотки 40 пациентов, описывается уникальное соотношение концентраций пропионовой и масляной кислот в слюне (метаболический отпечаток тонзиллита), выраженный в виде диагностических коэффициентов (линейных уравнений), позволяющих с 95% прогностической точностью диагностировать тонзиллит. Прогностическая точность по валидационной выборке (30 человек) составляет 100%. Прогностическая точность модели «Тонзиллит 1.0» (70 человек) составляет 97,1%. Увеличение прогностической точности модели предиктивной диагностики тонзиллита происходит за счёт увеличения чувствительности с 90% в модели «Тонзиллит» до 95% в модели «Тонзиллит 1.0».*

*Увеличение численности групп способствует увеличению прогностической точности модели предиктивной диагностики тонзиллита, повышает статистическую значимость различий между группами «Тонзиллит» и группой сравнения. Модель предиктивной диагностики «Тонзиллит 1.0», может быть использована в клинической лабораторной диагностике тонзиллита по метаболитическим биомаркерам в слюне методом микробиом-ассоциированной метаболомики.*

*Ключевые слова:* тонзиллит; микробиота; микробиоценоз ротоглотки; ГЖХ; слюна; короткоцепочечные жирные кислоты; метаболомика; математическое моделирование; линейный дискриминантный анализ.

**Для цитирования:** Мануйлова Е.Б., Садеков Т.Ш., Мехтиев Э.Р.О., Затевалов А.М., Самойлова М.В., Миронов А.Ю. Микробиом-ассоциированная метаболомика в клинической лабораторной диагностике тонзиллита. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (9): 553-558. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-553-558>

**Для корреспонденции:** Мануйлова Екатерина Борисовна, мл. науч. сотр. лаб. дифтерийных инфекций; e-mail: k2205@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 01.07.2023

Принята к печати 05.07.2023

Опубликовано 08.09.2023

*Manuilova E.B.<sup>1</sup>, Sadekov T.Sh.<sup>1</sup>, Mehtiev E.R.O.<sup>1</sup>, Zatevalov A.M.<sup>1</sup>, Samoylova M.V.<sup>2</sup>,  
Mironov A.Yu.<sup>1,3</sup>*

### MICROBIOME-ASSOCIATED METABOLOMIC IN THE CLINICAL LABORATORY DIAGNOSIS OF TONSILLITIS

<sup>1</sup>G. N. Gabrichevsky Research Institute for epidemiology and microbiology, Rospotrebnadzor, 125212, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Federal scientific and clinical center for specialized types of medical care and medical technologies of the FMBA of Russia, 115682, Moscow, Russia

*The features of the functional activity of oropharyngeal microbiocenosis in tonsillitis were studied by the method of microbiome-associated metabolomic. A model of predictive diagnostics «Tonsillitis» was built, it was validated, and after combining the training and validation samples, the model «Tonsillitis 1.0» was built. It has been established that the concentrations of anaerobic microorganisms - propionic and butyric acid are included in the discriminant equation of the Tonsillitis model, and the concentration of valeric acid is also included in the Tonsillitis 1.0 model. The Tonsillitis model was built by the results of biochemical analysis of the oropharyngeal microflora of 40 patients, describes the unique ratio of the concentrations of propionic and butyric acids in saliva (the metabolic imprint of tonsillitis), expressed as diagnostic coefficients (linear equations), which allow diagnosing*

*tonsillitis with 95% predictive accuracy. The predictive accuracy for the validation sample (30 people) is 100%. The predictive accuracy of the Tonsillitis 1.0 model (70 people) is 97.1%. An increase in the predictive accuracy of the model for predictive diagnosis of tonsillitis occurs due to an increase in sensitivity from 90% in the Tonsillitis model to 95% in the Tonsillitis 1.0 model. An increase in the number of groups contributes to an increase in the predictive accuracy of the model for predictive diagnosis of tonsillitis, increases the statistical significance of differences between the Tonsillitis groups and the comparison group. The model of predictive diagnosis «Tonsillitis 1.0» can be used in clinical laboratory diagnosis of tonsillitis by metabolic biomarkers in saliva using microbiome-associated metabolomic.*

*Key words: tonsillitis; microbiota; oropharyngeal microbiocenosis; GLC; saliva; short chain fatty acids; metabolomics; math modeling; linear discriminant analysis.*

**For citation:** Manuylova E.B., Sadekov T.Sh., Mekhiev E.R.O., Zatevalov A.M., Samoylova M.V., Mironov A.Yu. Microbiome-associated metabolomic in the clinical laboratory diagnosis of tonsillitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika* (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2023; 68 (9): 553-558 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-9-553-558>

**For correspondence:** Manuylova E.B., junior researcher laboratory of diphtheria infections; e-mail: [k2205@mail.ru](mailto:k2205@mail.ru)

Information about authors:

Manuylova E.B., <https://orcid.org/0000-0002-4189-0455>;

Sadekov T. Sh. , <https://orcid.org/0000-0001-5337-0054>;

Mekhiev E.R.O. , <https://orcid.org/0000-0002-9942-2662>;

Zatevalov A.M. , <https://orcid.org/0000-0002-1460-4361>;

Samoylova M.V. , <https://orcid.org/0000-0001-6771-919X>;

Mironov A. Yu. , <https://orcid.org/0000-0002-8544-5230>;

**Acknowledgment.** The work was carried out within the framework of the industry program of Rosпотребнадзор.

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

Received 01.07.2023

Accepted 05.07.2023

Published 08.09.2023

**Введение.** Респираторные заболевания остаются наиболее распространёнными инфекционными заболеваниями, что формирует запрос на новые средства их диагностики и лечения. Одной из ведущих проблем оториноларингологии остается заболеваемость хроническим тонзиллитом. Это заболевание имеет невыраженную клиническую симптоматику при условии сохранения барьерных функций слизистой оболочки. При возникновении определённых условий возможно нарушение барьерной функции слизистой оболочки с высокой вероятностью формирования паратонзиллярных абсцессов [1]. Доказано, что при длительном хроническом тонзиллите возможно развитие артрита, ревматизма, нефрита, сепсиса [2].

Клиническая диагностика тонзиллита проводится с помощью пальпации лимфатических узлов, осмотра зева с помощью специальной подсветки, для уточнения клинического диагноза используются данные клинической лабораторной диагностики: общий анализ крови, общий анализ мочи, бактериологический анализ мазка из зева. Клинический диагноз зависит от фактора субъективности и квалификации врача, от выраженности клинических проявлений заболевания. Доказательная медицина позволяет установить более чёткие критерии хронического тонзиллита, основанные на метаболической реакции микробиоценоза ротоглотки, измеренные по соотношению концентраций короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в слюне [3, 4].

Для оценки сложной биологической системы, к которой относится многовидовая структура микробного сообщества ротоглотки, составляющая микробно-каневый комплекс слизистой оболочки, необходимы

методы многомерной статистики и математического моделирования. Высокая реакционность микробиоты предполагает сложный многоуровневый ответ, для распознавания которого эффективно применяются проекционные методы математического моделирования - линейный дискриминантный анализ [5]. Популярность линейного дискриминантного анализа обусловлена его высокой специфичностью и чувствительностью, что существенно повышает прогностическую точность. Важное значение имеет простота использования этого метода, поскольку данный алгоритм входит в большинство платных и бесплатных статистических пакетов, где расчёты и моделирование не требуют от исследователя навыков в программировании [6, 7].

Результатом математического моделирования по алгоритму линейного дискриминантного анализа являются классификационные уравнения, представляющие решающие правила, выраженные в линейных функциях, описывающих гиперплоскость, разделяющую дискриминантное пространство на области, принадлежащие к основной группе и группе сравнения [8]. Тестирование обучающей выборки на ошибки I и II рода позволяет выявить количество истинно-положительных, отрицательных и ложноположительных и ложноотрицательных случаев, а так же получить качественные характеристики модели. К основным качественным характеристикам относятся аналитические: прогностическая точность, специфичность и чувствительность, которые обычно имеют высокие показатели, характеризующие качество дискриминации в обучающей выборке. Результаты прогностической точности, полученные на других выборках,

могут быть значительно ниже, чем аналитическая точность, специфичность и чувствительность. Это следует учитывать, при использовании пилотных математических моделей линейного дискриминантного анализа для задач предиктивной диагностики [9].

Для проверки и повышения устойчивости математических моделей применяются валидационные мероприятия, сводящиеся к сравнению количества положительных и отрицательных результатов, предсказанных моделью, относительно диагнозов, поставленных другими (более точными методами). Результаты прогностической точности, полученные по валидационной выборке имеют более важное значение для использования математической модели в практике. Объединение валидационной выборки и обучающей выборки пилотной модели для расчёта новой модели, позволяет получить более устойчивую модель, даже если значения аналитической прогностической точности в результате будут ниже, чем у пилотной модели. Повышение численности групп в модели, через валидационные итерации имеют смысл до получения стабильных показателей прогностической точности, которые будут отражать истинное качество дискриминации модели [10,11].

Цель исследования - рассчитать метаболические биомаркеры тонзиллита методом микробиом-ассоциированной метаболомики по концентрациям короткоцепочечных жирных кислот в слюне.

**Материал и методы.** Для построения математической модели «Тонзиллит» использованы концентрации КЖК в слюне у пациентов амбулаторного приёма с диагнозом «Тонзиллит». Материал набирался на базах кафедры оториноларингологии МГМСУ им. А. И. Евдокимова, ГКБ № 70 им. Е. О. Мухина и НМИЦ Центрального научно-исследовательского института стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Для построения пилотной модели проведено исследование образцов слюны методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) у 40 пациентов в возрасте от 15 до 50 лет. Перед включением в исследование у каждого из участников исследования получено письменного информационного согласия об использовании результатов обследования в научных целях. В основную группу были включены 20 пациентов амбулаторного приёма с диагнозом «Тонзиллит», который установлен врачом-отоларингологом по результатам клиничко-физикального обследования. В группу сравнения включены 20 пациентов амбулаторного приёма КДЦ при ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского. Для валидации математической модели использованы концентрации КЖК в слюне у 30 пациентов, из которых 20 относились к основной группе и 10 к группе сравнения. Определение по группам для мероприятий по валидации моделей проводили так же, как и для обучающей выборки. Результирующая модель «Тонзиллит 1.0» обучена на объединённых выборках пилотной модели «Тонзиллит» и валидационной выборки. Общая численность групп составила 70 человек. Основная группа модели «Тонзиллит 1.0» составила 40 пациентов с тонзиллитом, группа сравнения 30 человек. Гендерные различия не учитывались.

Концентрации КЖК в слюне определялись методом ГЖХ на капиллярной колонке диаметром 0,3 мм, длиной 30 метров с неподвижной фазой FFPA, в изотермическом режиме термостата при 150 оС, с регистрацией сигнала на пламенно-ионизационном детекторе [8]. Для расчёта концентраций КЖК использован метод внутреннего стандарта с  $\alpha, \alpha$ -диметилмасляной кислотой. Пробоподготовка включает подкисление образца слюны 0,1N водным раствором HCl, осаждение белка 60% водным раствором HClO<sub>4</sub>, с последующим центрифугированием на 6000 об/мин. в течение 10 минут. Расчёт концентраций КЖК проведён с помощью программы, предоставленной производителем хроматографа «Кристалл 5000.2», по соотношению высот пиков компонентов, идентифицированных по времени удержания и высоты пика стандарта [10].

Результаты биохимических анализов микрофлоры ротоглотки для валидации модели по отдельным партиям собирали через сервис, обеспечивающий использование математических моделей для предиктивной диагностики, расположенный на сайте [www.gabr1ch.ru](http://www.gabr1ch.ru) и имеющий название «Инновационные проекты научно-исследовательских групп Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора».

Статистический анализ и математическое моделирование проведено методом линейного дискриминантного анализа с использованием одноименного блока в программе Statistica 10.0.

**Результаты.** Пилотная модель линейного дискриминантного анализа «Тонзиллит» построена на результатах биохимического анализа микрофлоры ротоглотки 40 пациентов, из них: 20 пациентов с подтверждённым диагнозом хронического тонзиллита и 20 пациентов группы сравнения. Для расчёта математической модели использованы следующие концентрации КЖК в слюне: уксусной (C2), пропионовой (C3), изомаляной (iC4), масляной (C4), изовалериановой (iC5), валериановой (C5), изокапроновой (iC6), капроновой (C6) кислот. Чтобы избежать влияния активности секреции слюнных желез на соотношение концентраций КЖК, в уравнения дискриминантного анализа взяты приведённые концентрации (отнесённые к общей сумме C2-C6, включая изомеры). Методом пошагового исключения компонентов с анализом сопряжённости построена модель, в которую включены концентрации пропионовой и масляной КЖК (C3 и C4). Для модели рассчитаны:

- Дискриминантная функция;
- Координаты центроидов основной группы (ОГ) и группы сравнения (ГС);
- Расстояния Махаланобиса и статистическая значимость разности групп;
- Классификационные функции;
- Факторная нагрузка на компоненты;
- Прогностическая точность модели, для элементов, задействованных в построении модели, специфичность и чувствительность.

Разделение групп представлено в классификационной матрице (табл. 1).

На валидационной серии результатов анализов

пациентов тестировали способность модели определять правильный диагноз - хронический тонзиллит. Результаты биохимического анализа микрофлоры ротоглотки подставлены в классификационные уравнения для определения принадлежности к группе. Из 30

пациентов - 20 человек имели установленный диагноз «Хронический тонзиллит» и 10 человек не имели этого заболевания и помещены в группу сравнения. Результаты распределения по группам данных валидации представлены в табл. 2.

Таблица 1

Классификационная матрица пилотной модели «Тонзиллит»

Группы, заданные для обучения модели	Корректно определены моделью, %	Количество образцов, определенных по группам моделью, ед.	
		Основная группа	Группа сравнения
Основная группа (чувствительность)	90	18	2
Группа сравнения (специфичность)	100	0	20
Суммарно (точность)	95	18	22

Таблица 2

Валидация пилотной модели «Тонзиллит»

Группы, заданные для обучения модели	Корректно определены моделью	Количество образцов, определенных по группам моделью	
		Основная группа	Группа сравнения
Основная группа (чувствительность)	100	20	0
Группа сравнения (специфичность)	100	0	10
Суммарно (точность)	100	20	10

Таблица 3

Внешние и внутренние прогностические характеристики пилотной модели «Тонзиллит»

Параметры	Качественные характеристики, %		Погрешность, %
	внутренняя	внешняя	
Чувствительность	90	100	10
Специфичность	100	100	0
Точность	95	100	5

Таблица 4

Классификационная матрица модели «Тонзиллит 1.0»

Группы, заданные для обучения модели	Корректно определены моделью	Количество образцов, определенных по группам моделью	
		Основная группа	Группа сравнения
Основная группа (чувствительность)	95	38	2
Группа сравнения (специфичность)	100	0	30
Суммарно (точность)	97,1	38	32

Погрешность, рассчитанная сравнением внутренних и внешних прогностических показателей представлена в табл. 3.

В результате использования классификационных уравнений пилотной модели корректно определены 100% пациентов. Погрешность чувствительности 10%, специфичности 0%, что составляет общую погрешность точности модели 5%. Уровни погрешности превышают 5%, что указывает на недостаточную устойчивость модели. Увеличение устойчивости модели можно достичь увеличением количества пациентов в группах с последующим перестроением модели.

Результаты биохимического анализа слюны пациентов пилотной модели и валидационные данные

объединены в количестве - 70 пациентов, из которых 40 с диагнозом «Хронический тонзиллит» отнесены в основную группу (ОГ), 30 - в группу сравнения (ГС).

Методом пошагового исключения компонентов с анализом сопряженности в построенную модель «Тонзиллит 1.0» включены пропионовая (C<sub>3</sub>), масляная (C<sub>4</sub>), валериановая (C<sub>5</sub>) КЖК. Результаты разделения групп представлены в классификационной матрице (табл. 4).

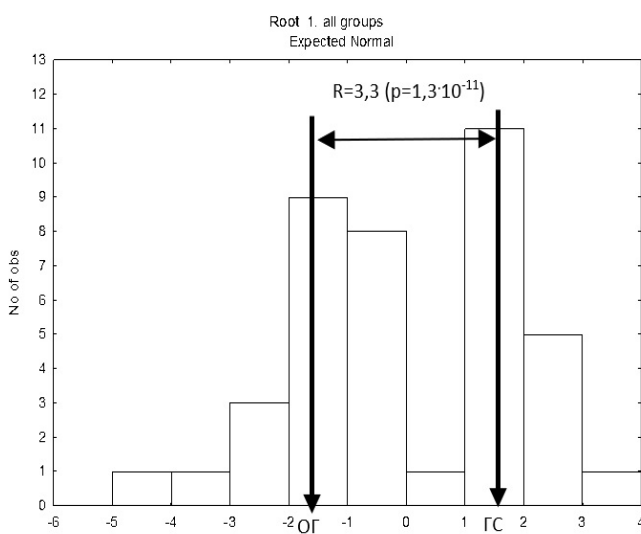
Аналитическая точность модели «Тонзиллит 1.0» составляет 97,1%, что выше прогностической точности пилотной модели «Тонзиллит» - 95%. Повышение прогностической точности достигается за счёт повышения аналитической чувствительности («Тонзиллит 1.0» - 95%, а «Тонзиллит» - 90%).



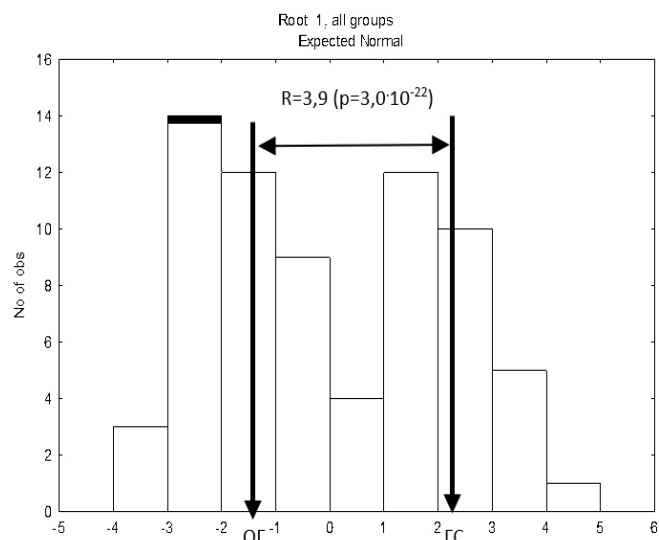
Рассмотрим динамику смещения центроидов групп и распределение количества образцов в дискриминантной функции, расстояние Махаланобиса и статистическую значимость различий. Гистограммы распределения представлены на рисунке, а, б.

С увеличением количества образцов в модели разделение образцов на группы становится более выраженным. Расстояние Махаланобиса между группами увеличивается, а статистическая значимость увеличивается ( $p$  – снижается).

а



б



Распределение количества образцов и расположение центроидов в координатах дискриминантной функции при увеличении численности групп. а - тонзиллит (40 образцов); б - тонзиллит 1.0 (70 образцов).

**Обсуждение.** Хронический тонзиллит является заболеванием, для которого микрофлора ротоглотки формирует чёткий метаболический след, что подтверждает состоявшаяся модель линейного дискриминантного анализа. Уровень статистической значимости дискриминации групп при  $p=1,3 \cdot 10^{-11}$  указывает на высокую чёткость метаболического следа, характеризующего специфичность соотношения концентраций метаболитов, продуцируемых микроорганизмами. В модели задействованы концентрации пропионовой и масляной кислот, на долю которых приходится около 25% пула КЖК и более 90% пула КЖК, продуцируемого анаэробными микроорганизмами. Исходя из состава компонентов КЖК, на которых построена модель можно заключить, что заболевание влияет на большую часть видов анаэробных микроорганизмов, выстраивающих свои трофические цепочки и специфику метаболизма, узнаваемого системой распознавания образов [12, 13].

Чёткость метаболического отпечатка тонзиллита подтверждается высокими показателями прогностической точности, чувствительности и специфичности, полученными на валидационной выборке. Пилотная модель, построенная на небольшой выборке, безошибочно определила тонзиллит при валидации, что так же указывает на чёткость метаболического отпечатка заболевания.

Модель «Тонзиллит 1.0», построенная на объединенной выборке, улучшила показатели аналитической прогностической точности, чувствительности и специфичности, в дискриминантное уравнение включена концентрация валериановой КЖК, относящаяся к метаболитам, продуцируемым облигатной анаэробной микрофлорой [3, 4, 14].

Увеличение расстояния Махаланобиса между центроидами Тонзиллит и группой сравнения, снижение порогового значения  $p$  с  $1,3 \cdot 10^{-11}$  до  $1,3 \cdot 10^{-22}$  указывает на улучшение качества дискриминации групп при увеличении количества пациентов в выборках.

**Заключение.** Показано, что при тонзиллите существенно изменяется функциональная активность микробиоценоза ротоглотки, которая имеет специфический метаболический след, характеризующийся уникальным соотношением концентраций пропионовой, масляной, валериановой КЖК. Модель дискриминантного анализа в пилотном варианте имеет аналитическую прогностическую точность на уровне 95%, при 90% чувствительности и 100% специфичности. Валидационные показатели качественных характеристик модели составляют 100% для прогностической точности, чувствительности и специфичности.

Модель «Тонзиллит 1.0», построенная с помощью алгоритмов линейного дискриминантного анализа по концентрациям КЖК в слюне, на выборке 70 человек

