

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ
ВИДОВ ПОРЯДКА FLAVOBACTERIALES, ИНФИЦИРУЮЩИХ
ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ


Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Кузьминой Екатерины Александровны


Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук



1.06.23

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:
профессор, доктор биол. наук



1.06.23

С. А. Степанов

Саратов 2023

Введение

Актуальность темы. Муковисцидоз (кистозный фиброз) – это моногенное полиорганное наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), которое характеризуется клиническим полиморфизмом. Проявляется в виде поражения экзокринных желез жизненно важных органов. Как правило, течение заболевания тяжёлое [1].

Частота МВ колеблется в зависимости от этнической принадлежности и (или) географической зоны. Среди представителей европеоидов МВ встречается у новорожденных с частотой от 1:600 до 1:17000. В Российской Федерации, по данным ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н. П. Бочкова», муковисцидоз есть у одного из 9000 новорожденных [2].

Причиной смерти среди больных МВ в 95% случаев являются хронические респираторные инфекции, вызванные бактериями, грибами или вирусами, находящимися в лёгких. В частности, причиной инфекции являются неферментирующие грамотрицательные бактерии, наиболее часто встречающиеся из которых – представители родов *Pseudomonas* и *Burkholderia*. В последнее время возросли случаи высева из биоматериалов пациентов с муковисцидозом бактерий родов *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Elizabethkingia*, которые также относятся к НГОБ. Их клиническое значение на данный момент не вполне изучено.

Данная тема является актуальной, так как обращает внимание на участвовавшие случаи выделения из легких больных видов с неустановленным клиническим значением. Впоследствии, численность исследуемых бактерий в микробном сообществе может увеличиться. Необходимо изучать клиническую значимость новых видов в поражении дыхательной системы при муковисцидозе, чтобы была возможность предотвратить формирование хронической инфекции. Для этого также важно учитывать, какое экологическое значение имеют представители *Chryseobacterium*, *Empedobacter* и *Elizabethkingia* в микробоценозе легких больных МВ и какое влияние они оказывают на остальные виды в сообществе

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является исследование распространения и изучение биологических свойств некоторых видов порядка Flavobacteriales, инфицирующих пациентов с муковисцидозом.

Для реализации указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

1) исследовать видовое разнообразие флавобактерий, которые были выделены из респираторных образцов пациентов с муковисцидозом в 2018 – 2022 гг.;

2) изучить антагонистические свойства представителей родов *Chryseobacterium*, *Empedobacter*, *Elizabethkingia*, выделенных при МВ, по отношению к бактериям разных морфологических групп.

Материал и методы исследования. Работу проводили на базе кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарского государственного медицинского университета» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

В качестве объекта исследования выступали бактерии *Chryseobacterium* spp., *Empedobacter* spp., *Elizabethkingia* spp. (семейство Weeksellaceae, порядок Flavobacteriales).

Для оценки распространения изучаемых бактерий за 2018-2022 гг. были проанализированы данные о высевах из биоматериалов респираторных путей больных муковисцидозом 434 штаммах, относящихся к порядку Flavobacteriales. Их выделение и идентификация путем масс-спектрометрического белкового профилирования системой MALDI-TOF проводились на базе КДЛ Клиник ФГБОУ ВО «СамГМУ» Министерства Здравоохранения Российской Федерации.

Применяли методы корреляционного анализа и рассчитывали t-критерий Стьюдента. Обработка проводилась с использованием программы STATISTICA 10 (разработчик - StatSoft.Inc).

В работе по определению антагонистической активности в качестве материала для исследований были использованы бактерии *Chryseobacterium arthrosphaerae* (25 штаммов), *C. gleum* (2 штамма), *C. indologenes* (1 штамм), *Elizabethkingia meningoseptica* (3 штамма), *E. anopheles* (3 штамма), *Empedobacter falsenii* (3 штамма).

В качестве тест-объектов послужили грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* 113-13 и *Serratia marcescens* 3880/220015, грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209-P, *Bacillus cereus* 8035 (предоставлены ГИСК имени Л. А. Тарасевича) и штамм *B. velezensis* HR13 (предоставлен кафедрой микробиологии и физиологии растений биологического факультета ФГБОУ ВО «СГУ имени Н. Г. Чернышевского»).

Исследование антагонистической активности проводили *in vitro* методом агаровых блоков в трех модификациях [3].

В первом варианте производили совместное выращивание бактерий-антагонистов и тест-культуры и оценивали влияние скорости роста на антагонизм. Во второй и третьей модификациях рассматривали продукты метаболизма как фактор антагонизма. Для этого, перед помещением на чашки с тест-культурами, исследуемые штаммы обрабатывали медицинским хлороформом 0,5 мг/л течение 30 минут и облучали ультрафиолетовыми лучами мощностью 30 Вт на протяжении 40 минут соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel 2019 (разработчик - MicrosoftInc.)

Структура и объем работы. Работа изложена на 48 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 1 рисунком и содержит 11 таблиц. Список использованных источников 36 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об истории заболевания муковисцидоз, причине его возникновения, механизме развития и клинических проявлениях болезни. Перечислены существующие

способы лечения. Приведены сведения об обнаружении в клиническом материале пациентов представителей *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter* и высокой резистентности к антибиотикам у названных бактерий [4-11].

В главе «Результаты исследования» описаны и проанализированы экспериментально полученные данные о видовом разнообразии представителей порядка Flavobacteriales (*Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter*), изолированных из респираторных образцов пациентов с муковисцидозом, а также о способности исследуемых штаммов к проявлению антагонизма по отношению к бактериям разной морфологии.

Для оценки видового состава представителей порядка Flavobacteriales были проанализированы материалы высевов из респираторных путей пациентов с муковисцидозом за период 2018-2022 гг.

За исследуемый период к порядку Flavobacteriales относились 434 выделенных штаммов, что составило 1,6 % от общего числа и 6,8 % от НФГОБ. Из них больше всего за рассматриваемый период высевали представителей рода *Chryseobacterium* – 306 штаммов, что составляет 70,5 %. Доля видов, относящихся к роду *Chryseobacterium*, снижалась в ряду: *C. gleum* – 33,7 %, *C. indologenes* – 28,8 %, *C. arthrosphaerae* – 10,5 %, *C. joostei* – 7,2 %. Для *C. tructae*, *C. oraniemense* и *C. hamamense* распространение составляло по 3,9 %. Далее по встречаемости следовали *C. gambrini* – 2 % и *C. scophtalmum* – 1,6 %. Доля остальных штаммов составляла менее 1 %.

Данные о распространении наиболее часто встречающихся представителей *Chryseobacterium* spp. были подвергнуты корреляционному анализу. Статистически достоверные результаты были получены только для бактерий *C. arthrosphaerae* и свидетельствуют о том, что доля данного вида в микробиоме дыхательных путей больных МВ будет возрастать ($r_{xy}=0,894$, $p<0,05$).

К роду *Empedobacter* относились 100 выделенных штаммов (23 %), среди которых 90 штаммов были идентифицированы как *E. falsenii*, а 10 штаммов – как вид *E. brevis*.

Реже встречались представители рода *Elizabethkingia*, всего было выделено 28 штаммов (6,5 %), 16 из которых принадлежали к виду *E. miricola* (3,7 %), 9 (2,1 %) – к *E. meningoseptica*, а 3 штамма (0,7 %) – к *E. anopheles*.

Также стоит отметить, что с годами наблюдалось расширение видового разнообразия изучаемых бактерий.

Исследование антагонистических свойств бактерий *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter* показало, что способность к антагонизму у них по отношению к тест-культурам была различной, варьируя у разных штаммов и изменяясь в зависимости от поставленных условий.

В первой модификации метода агаровых блоков все исследуемые виды выступали в качестве антагонистов. Это обусловлено тем, что помимо действия метаболитов, бактерии подавляли тест-культуры за счет скорости роста.

Максимальной антагонистической активностью была относительно бактерий *S. aureus*, их подавляли все флавобактерии. Как антагонист по отношению к бактериям *S. marcescens* не выступал ни один из исследуемых штаммов. И только некоторые представители *C. arthrosphaerae* подавляли рост *B. cereus*, диаметр зон задержки роста при этом составил $32,1 \pm 5,07$ мм и превышал другие значения зон подавления для этого вида хризеобактерий.

Было установлено, что некоторые бактерии подавляли рост только одной тест-культуры (так, *C. gleum*, *C. indologens* и *E. falsenii* действовали на *S. aureus*). Однако были виды, чья антагонистическая активность распространялась на несколько морфологических групп. К таким относились *C. arthrosphaerae*, *E. meningoseptica* и *E. anopheles*.

Наибольшее количество тестируемых культур подавлял вид *C. arthrosphaerae* – он действовал на кишечную палочку и все грамположительные микроорганизмы, в том числе и споровые.

Во второй модификации метода исследовали антагонистическое влияние метаболитов, выделяемых бактериями. По сравнению с первым вариантом, произошло существенное изменение в результатах: бактерии *C. gleum*, *C. indologens* и *E. meningoseptica* утратили способность к подавлению роста

бактерий *S. aureus*. В то же время, *C. arthrosphaerae* и *E. falsenii* проявили антагонистическую активность по отношению к *S. marcescens*.

Штаммы *E. meningoseptica* показали способность к антагонистической активности только по отношению к грамположительным спорообразующим микроорганизмам.

У бактерий *E. falsenii* наиболее выраженные антагонистические свойства проявлялись по отношению к грамтрицательной палочке *E. coli* и к грамположительному кокку *S. aureus*, диаметры зон подавления составили $30,0 \pm 3,01$ мм и $35,0 \pm 21,21$ мм соответственно.

Штаммы *C. arthrosphaerae* подавляли рост бактерий всех экоморфологических групп, при этом значение зоны подавления роста *B. cereus* составило $35,5 \pm 6,19$ мм и так же, как и в первой модификации метода, было выше по сравнению с диаметрами зон ингибирования роста остальных тест-культур.

В третьем варианте также проводили исследование антагонистического действия метаболитов бактерий. Наибольшую чувствительность к штаммам-антагонистам имели такие тест-объекты как *E. coli* и *B. cereus*.

Некоторые штаммы проявляли антагонистическую активность к большему количеству тест культур. Так, у *C. arthrosphaerae* был выявлен антагонизм ко всем представленным тест культурам. Широкий спектр подавления разных групп микроорганизмов показали и штаммы *E. anopheles*, которые не действовали только на *E. coli*, однако, судя по невысоким значениям диаметров зон подавления, их нельзя назвать успешными антагонистами.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что все из изученных видов обладали антагонистическими свойствами. Бактерии обладали двумя механизмами подавления роста других бактерий, одним из которых являлась скорость роста, а другим – выделение метаболитов в окружающую среду.

Результаты варьировались в зависимости поставленных условий.

Наибольшее разнообразие штаммов, проявляющих антагонистическое воздействие, наблюдалось в первом варианте. Это обусловлено тем, что

распространение тест культур подавлялось в том числе и благодаря колонизации субстрата.

Из широкого разнообразия подавляемых тест-культур и высоких значений диаметра зон задержки роста можно сделать вывод, что бактерии *S. arthrosphaerae* и *E. falsenii* были наиболее успешными антагонистами. В основном они действовали на грамположительные бактерии и в меньшей степени подавляли рост грамотрицательных микроорганизмов.

Примечательно, что бактерии *S. arthrosphaerae* были способны воздействовать на все представленные тест-культуры только после обработки хлороформом и ультрафиолетовыми лучами.

Выводы

1. Анализ данных за 2018-2022 гг. по распространению и видовому разнообразию показал, что к порядку Flavobacteriales относились 434 штаммов, что составило 1,6 % от общего числа и 6,8 % от НФГОБ.

Среди бактерий, входящих в порядок Flavobacteriales к *Chryseobacterium* spp. относились 70,5 %. Среди них *S. gleum* занимал долю 33,7 %, *S. indologenes* – 28,8 %, *S. arthrosphaerae* – 10,5 %.

Результаты корреляционного анализа подтвердили, что доля *S. arthrosphaerae* в микробиоме дыхательных путей больных МВ будет возрастать ($r_{xy}=0,894$, $p<0,05$), а значит, .

Второе место по встречаемости среди флавобактерий у больных муковисцидозом занимал род *Empedobacter*, куда относились 100 выделенных штаммов (23 %). Реже всего у пациентов встречались представители *Elizabethkingia* spp. (6,5 %),

Несмотря на умеренную встречаемость исследуемых бактерий, с годами наблюдается расширение видового состава. Существует необходимость мониторинга динамики распространения флавобактерий для формирования более точных представлений об их возможном антагонистическом потенциале в развитии респираторных осложнений у пациентов с муковисцидозом.

2. Результаты исследования антагонистической активности варьировались в зависимости от специальных условий.

Было установлено, что антагонистическое воздействие у исследуемых бактерий осуществлялось по двум механизмам:

- 1) освоение субстрата, быстрая скорость роста;
- 2) выделение в окружающую среду метаболитов, подавляющих рост других бактерий.

Анализ способности к антагонизму среди представителей родов *Chryseobacterium*, *Elizabethkingia* и *Empedobacter* выявил виды, обладающие наибольшей антагонистической активностью. Ими оказались *C. arthrosphaerae* и *E. falsenii*. Наиболее успешно они подавляли рост грамположительных бактерий.

Список использованных источников

1. Муковисцидоз / Н. И. Капранов [и др.]. – М.: Медико-генетический научный центр РАМН, 2011. – 91 с.
2. Консенсус «Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» раздел «Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе» / И. А. Шагинян [и др.] // Педиатр. – 2016. – №1. – С. 80–96.
3. Иркитова А. Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А. Н., Иркитова, Я. Р. Каган, Г. Г. Соколова // Известия АлтГУ. - 2012. – Том 3, № 1. – С. 41-44.
4. *Chryseobacterium* respiratory tract infections in patients with cystic fibrosis / A. Lambiase [et al.] // Journal of infection. – 2007. – Vol. 55, № 6. – P. 518– 523.
5. Whole-genome sequence of *Chryseobacterium oranimense*, a colistin-resistant bacterium isolated from a cystic fibrosis patient in France / P. Sharma [et al.] // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2015. – Vol. 59, № 3. – P. 1696– 1706.
6. Tetz, G. Draft genome sequence of *Chryseobacterium mucoviscidosis* sp. nov. strain VT16-26, isolated from the bronchoalveolar lavage fluid of a patient with cystic fibrosis / G. Tetz, V. Tetz // Genome announcements. – 2018. – Vol. 6, № 2. – P. 1– 2.
7. Maldi-TOF MS improves routine identification of non-fermenting gram negative isolates from cystic fibrosis patients / A. Fernández-Olmos [et al.] // Journal of cystic fibrosis. – 2012. – Vol. 11, № 1. – P. 59– 62.
8. rpoB gene sequencing highlights the prevalence of an *E. miricola* cluster over other *Elizabethkingia* species among UK cystic fibrosis patients / D. T. D. Kenna [et al.] // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2018. – Vol. 90, № 2. – P. 109– 114.
9. Clinical strains of *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia* spp. isolated from pediatric patients in a university hospital: performance of MALDI-TOF MS-based identification, antimicrobial susceptibilities, and baseline patient characteristics / H. C. Mirza [et al.] // Microbial Drug Resistance. – 2018. – Vol. 24, № 6. – P. 816– 821.

10. Draft genome and description of *Chryseobacterium phocaeense* sp. nov.: a new bacterial species isolated from the sputum of a cystic fibrosis patient / R. Abou Abdallah [et al.] // Archives of microbiology. – 2019. – № 210.– P. 8.
11. Identification difficulties of non-fermenting microorganisms from the respiratory tract of patients with cystic fibrosis / M. Chernukha [et al.] // Journal of cystic fibrosis. – 2020. – № 19. – P. 88.

