

МИКРОБНЫЙ СОСТАВ МИКРОФЛОРЫ РОТОГЛОТКИ У БОЛЬНЫХ С ТОНЗИЛЛЯРНОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

О.Ю. Борисова^{1,3}, В.А. Алешкин¹, А.С. Пименова¹, А.И. Крюков², Н.Л. Кунельская²,
А.В. Гуров^{2,3}, Г.Б. Шадрин², А.С. Товмасын², Б.А. Ефимов³, Л.И. Кафарская³

¹ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия

²ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия

³ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель исследования: изучение микробного пейзажа микрофлоры ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией. **Материалы и методы.** Обследовано 79 больных из ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского. Из них 78,5% пациентов с различными формами хронического тонзиллита (основная группа) и 21,5% пациентов с патологией полости носа без хронического тонзиллита (контрольная группа). Среди пациентов основной группы с хроническим тонзиллитом, у 60 (96,8%) больных был диагноз хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма I степени (ТАФ I), у 1 (1,6%) больного — хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма II степени (ТАФ II) и у 1 (1,6%) больного — хронический тонзиллит. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов и коринебактерий проводили масс-спектрометрическим методом с использованием время-пролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция). Идентификацию выделенных коринебактерий проводили путем амплификации гена *rpoB* и последующего прямого секвенирования амплифицированных фрагментов. **Результаты.** Большинство (98,7%) выделенных микроорганизмов относилось к 27 видам и были грамположительными. Всего идентифицировано 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов, из них 41,4% штаммов относились к роду *Streptococcus*, 19,7% — к роду *Staphylococcus*, 36,9% — к роду *Corynebacterium*. Среди микроорганизмов рода *Streptococcus* — 55,4% штаммов относились к стрептококкам группы *viridians*, 38,4% штаммов к *S. pyogenes* и по 3,1% штаммов — к *S. pneumoniae* и *S. oralis*. При идентификации штаммов рода *Staphylococcus*, 64,5% штаммов относились к *S. aureus*, 32,2% штаммов к *S. epidermidis* и у одного больного (3,3%) выделен *S. hominis*. Выявлено 18 видов коринебактерий с преобладанием *C. tuberculostearicum* (17,2% штаммов), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5% штаммов) и *C. aurimucosum* (18,9% штаммов). У 44,3% обследованных пациентов микробный пейзаж представлен монокультурой и у 55,7% выявлены ассоциации микроорганизмов. **Заключение.** Впервые охарактеризован микробный пейзаж у больных с тонзиллярной патологией с идентификацией 18 видов коринебактерий. При выраженном патологическом процессе в микробиоте ротоглотки наблюдалось превалирование монокультуры, в то время как наличие ассоциаций свидетельствовало о менее выраженном патологическом процессе. Установлена тенденция уменьшения с возрастом разнообразия выделенных микроорганизмов.

Ключевые слова: хронический тонзиллит, микрофлора, микробный пейзаж, ротоглотка, MALDI-TOF MS, коринебактерии, стафилококки, стрептококки, кандиды.

Адрес для переписки:

Борисова Ольга Юрьевна
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10,
ФБУН Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. Г.Н. Габричевского.
Тел./факс: 8 (499) 747-64-84, 8 (495) 452-18-30;
8 (916) 147-19-60 (моб.).
E-mail: olgborisova@mail.ru

Contacts:

Olga Yu. Borisova
125212, Russian Federation, Moscow, Admiral Makarov str., 10,
G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone/fax: +7 (499) 747-64-84, +7 (495) 452-18-30;
+7 (916) 147-19-60 (mobile).
E-mail: olgborisova@mail.ru

Библиографическое описание:

Борисова О.Ю., Алешкин В.А., Пименова А.С., Крюков А.И.,
Кунельская Н.Л., Гуров А.В., Шадрин Г.Б., Товмасын А.С., Ефимов Б.А.,
Кафарская Л.И. Микробный состав микрофлоры ротоглотки у больных
с тонзиллярной патологией // Инфекция и иммунитет. 2015. Т. 5, № 3.
С. 225–232. doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232

Citation:

Borisova O.Yu., Aleshkin V.A., Pimenova A.S., Krukov A.I., Kunelskaya N.L.,
Gurov A.V., Shadrin G.B., Tovmasyan A.S., Efimov B.A., Kafarskaya L.I.
Microbial landscape of microflora of a pharynx at patients with tonsillitis
pathology // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya
i immunitet, 2015, vol. 5, no. 3, pp. 225–232.
doi: 10.15789/2220-7619-2015-3-225-232

MICROBIAL LANDSCAPE OF MICROFLORA OF A PHARYNX AT PATIENTS WITH TONSILLITIS PATHOLOGY

Borisova O.Yu.^{a,c}, Aleshkin V.A.^a, Pimenova A.S.^a, Krukov A.I.^b, Kunelskaya N.L.^b, Gurov A.V.^{b,c}, Shadrin G.B.^b, Tovmasyan A.S.^b, Efimov B.A.^c, Kafarskaya L.I.^c

^a G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation

^c Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation

Abstract. The microbial landscape of microflora of a pharynx at patients with tonsillitis pathology were studied. *Materials and methods.* 79 patients from GBUZ “Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology” (78.5% patients with various forms of chronic tonsillitis and 21.5% of patients without chronic tonsillitis (control group). Among patients of the main group with chronic tonsillitis, at 60 (96.8%) patients there was a diagnosis chronic tonsillitis a toxic-allergic form of 1 degree (TAF I), at 1 (1.6%) the patient — chronic tonsillitis a toxic-allergic form II of degree (TAF II) and at 1 (1.6%) the patient — chronic tonsillitis. Identification of microorganisms carried out on cultural-morphological and biochemical properties. Specific identification of the hardly cultivated microorganisms and *Corynebacterium* was carried out by MALDI-TOF MS of BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF (“bioMerieux”, France). Identification of the allocated *Corynebacterium* was carried out by amplification of a gene *rpoB* and the subsequent direct sequencing. *Results.* The majority (98.7%) of the allocated microorganisms, treated 27 types and were Gram-positive. It is revealed 159 strains of 29 species of microorganisms, from them 41.4% of strains belonged to the *Streptococcus*, 19.7% — *Staphylococcus*, 36.9% — *Corynebacterium*. Among *Streptococcus* — 55.4% of *S. viridans*, 38.4% — *S. pyogenes* and 3.1% — of *S. pneumoniae* и *S. oralis*; *Staphylococcus* — 64.5% of *S. aureus*, 32.2% of *S. epidermidis* and 3.3% of *S. hominis*. 18 types of *Corynebacterium* — *C. tuberculostearicum* (17.2% strains), *C. pseudodiphtheriticum* (15.5% strains) and *C. aurimucosum* (18.9% strains) are revealed. At 44.3% of the surveyed patients the microflora is presented by a monoculture and at 55.7% associations are revealed. *Conclusion.* The microflora at patients with tonsillitis pathology is characterized. At the expressed pathological process in a microbiota of a pharynx the monoculture while existence of associations testifies to less expressed pathological process prevails.

Key words: tonsillitis, microflora, microbiocenosis, pharynx, MALDI-TOF MS, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Candida albicans*.

Введение

Многочисленные исследования последних десятилетий показали, что состояние разнообразных микробных консорциумов, колонизирующих различные биотопы организма человека, прямо влияет на его здоровье. Последние достижения, связанные с разработкой и внедрением новых методов исследования в микробиологии, включая высокопроизводительное секвенирование и масс-спектрометрию, в частности метод MALDI-TOF MS, значительно увеличили наши диагностические возможности, используемые для анализа параметров, характеризующих микробные ассоциации, включая и их функциональные изменения, влияющие на патологическое состояние и, даже, коррелирующие с тяжестью течения заболеваний. Также показано, что состав резидентной микрофлоры в том или ином биотопе может определять «поведение» других видов микроорганизмов и особенно патогенных [1, 3, 4, 5, 11, 14].

Проблема тонзиллофарингита сохраняет свою актуальность для современной оториноларингологической практики. Количество видов микроорганизмов при хроническом тонзиллите, включая анаэробные, по разным данным колеблется от 100 до 160 [1, 2, 3, 4, 8]. Наибольшее прогностическое значение имеют микроорганизмы рода *Streptococcus* группы А, обладающие β-гемолитической активностью и рассматрива-

ющиеся в качестве важнейшего этиопатогенетического фактора в развитии хронического тонзиллита и его осложнений. Однако ассоциация патологических проявлений при хроническом тонзиллите с выделением данных микроорганизмов не носит видоспецифического характера. Вместе с тем, на сегодняшний день в литературе все чаще появляются данные о различных нарушениях в микроценозах разных биотопов человеческого организма, в частности, слизистых респираторного тракта, и роли состава микрофлоры в этих биотопах, влияющего на развитие патологических процессов [5, 9, 10, 11, 14].

Поэтому целью работы является изучение микробного состава культивируемых микроорганизмов ротоглотки у больных с тонзиллярной патологией.

Материалы и методы

Всего обследовано 79 больных, госпитализированных в Московский научно-практический Центр оториноларингологии им. Л.И. Свержевского (Москва) в период с сентября 2013 г. по апрель 2014 г. — 38 (48,1%) женщин и 41 (51,9%) мужчины. Возрастной состав обследованных пациентов представлен следующим образом: 15–19 лет — 11 (13,9%) больных, 20–29 лет — 29 (36,7%) больных, 30–39 лет — 26 (32,9%) больных, 40–49 лет — 8 (10,1%) больных, 50–59 лет — 4 (5,1%) больных и 1 (1,3%) больной, принадлежав-

ший возрастной группе 60–69 лет, то есть основная группа обследованных лиц была в возрасте 20–29 и 30–39 лет.

Среди обследованных больных 62 (78,5%) пациента были с различными формами хронического тонзиллита и составили основную группу, и 17 (21,5%) пациентов с патологией полости носа без хронического тонзиллита (контрольная группа). Среди пациентов основной группы с хроническим тонзиллитом у 60 (96,8%) больных был диагноз «хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма I степени (ТАФ I)», у 1 (1,6%) больного — «хронический тонзиллит, токсико-аллергическая форма II степени (ТАФ II)» и у 1 (1,6%) больного — «хронический тонзиллит». Среди пациентов контрольной группы 10 (12,6%) больных имели диагноз «гипертрофический ринит», у 3 (3,7%) больных — «хронический правосторонний (левосторонний) верхнечелюстной синусит», у 1 (1,3%) больного — «фронтит, полисинусит», у 1 (1,3%) больного — «левосторонний хронический гнойный отит», у 1 (1,3%) больного — «кисты верхнечелюстных пазух» и у 1 (1,3%) больного — «полипозный синусит».

Взятие материала из ротоглотки осуществляли с помощью стерильных одноразовых сухих коммерческих тампонов («Sorap», Италия). Доставка материала производилась в термоконтейнерах в течение 2 ч с момента обследования пациентов. Посев патологического материала осуществляли на несколько питательных сред: кровяной агар с добавлением 20% крови крупного рогатого скота, кровяно-теллуритовый агар с добавлением 10% крови крупного рогатого скота (в качестве агаровой основы использовали сухой питательный агар («Микроген», Россия), уриселект («Bio-Rad», США), желточно-солевой агар (на основе солевого агара) и агар Сабуро («HiMedia», Индия). Все посева культивировали по стандартной методике при температуре 37°C в течении 24–48 ч.

Идентификацию микроорганизмов проводили по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Тинкториальные свойства изучали путем окраски по Граму по общепринятой методике, в соответствии с инструкцией производителя. Биохимическую идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли с помощью коммерческих биохимических тест-систем Стафитест-24 («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), для дрожжевых грибов Candida-тест («PLIVA-Lachema Diagnostica», Чехия), Pastorex™ strep — сенсibilизированный латекс для дифференциации стрептококков групп А, В, С, D, F, G («Bio-Rad», США), оптохиновый тест, тест с желчью, определение каталазной активности. Гемолитическую активность культур изучали на агаре с добавлением 5% эритроцитов барана.

Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов и коринебактерий

проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра BioMerieux VITEK MS MALDI-TOF («bioMerieux», Франция).

Идентификацию выделенных коринебактерий проводили путем амплификации гена *groV* и последующего прямого секвенирования амплифицированных фрагментов согласно [11, 12]. Хромосомальную ДНК выделяли методом кипячения согласно Маниатис Т. (1984 г.) из 72-часовой культуры коринебактерий, выращенной на кровяном агаре. Далее, одну микробиологическую петлю культуры суспендировали в 150 мкл деионизированной воды и инкубировали 20 мин при 95°C, после чего центрифугировали при 12 000 об./мин. Выявление фрагментов гена *groV* осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции, проводимой в соответствии с [12, 13]. Реакционная смесь содержала растворы 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,0 мкМ каждого праймера, по 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата («Fermentas», Литва), и IUTaq-DNA полимеразы («Fermentas», Литва) в окончательном объеме 25 мкл. Амплификацию фрагментов нуклеотидных последовательностей проводили в термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Детекцию результатов амплификации осуществляли путем постановки горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле при 160 В в течение 1 ч с последующим сравнением электрофоретической подвижности специфических светящихся фрагментов амплифицированных продуктов с подвижностью фрагментов маркера молекулярных весов DNA Ladder Mix («Fermentas», Литва). Секвенирование фрагментов ДНК штаммов коринебактерий осуществляли согласно общепринятому методу Сенджера (Sanger F.) с помощью ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing ready reaction kit на ABI DNA-секвенаторе («Perkin Elmer Applied Biosystems») в ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России (Москва). Результаты секвенирования обрабатывались с помощью программного обеспечения BLAST и ChromasLite (для формата хроматограммы), секвенированные последовательности сопоставляли с международной online базой данных EMBL/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Результаты

При изучении культур, выделенных от пациентов, обнаружено 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов (табл.).

Большинство (98,7%) выделенных микроорганизмов, относящихся к 27 видам, были грамположительной флорой и 2 (1,3%) культуры — грамотрицательной (*Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*). Среди грамположительных микроорганизмов 65 (41,4%) микроорганизмов относились к роду *Streptococcus*, 31 (19,7%) —

к роду *Staphylococcus*, 58 (36,9%) — к роду *Corynebacterium*, в единичном количестве выделены *Candida albicans* (2 штамма (1,3%) и *Actinomyces viscosus* (1 штамм).

При идентификации микроорганизмов рода *Streptococcus* оказалось, что большинство 38 (55,4%) штаммов принадлежали к стрептококкам группы *viridans*, 25 (38,4%) штаммов — к *Streptococcus pyogenes* и по 2 (3,1%) штамма — к *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus oralis*. При идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* 20 (64,5%) штаммов были *Staphylococcus aureus*, 10 (32,2%) штаммов — *Staphylococcus epidermidis* и у одного больного (3,3%) был выделен *Staphylococcus hominis*.

Наиболее разнообразной в видовом аспекте была группа микроорганизмов рода *Corynebacterium*, представленная 18 видами (табл.). Из них наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (17,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5%) и *C. aurimucosum* (18,9%), в меньшем проценте случаев выделены *C. amycolatum* (8,6%), *C. durum* (5,2%), *C. afermentas lipophilum* (5,2%), *C. minutissimum* (6,9%), *C. urealyticum* (3,6%),

ТАБЛИЦА. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПЕЙЗАЖ ВЫДЕЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

№	Вид микроорганизма	Количество штаммов
1	<i>Streptococcus</i> группы <i>viridians</i>	36
2	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2
3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	25
4	<i>Streptococcus oralis</i>	2
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10
7	<i>Staphylococcus hominis</i>	1
8	<i>Actinomyces viscosus</i>	1
9	<i>Candida albicans</i>	2
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
11	<i>Haemophilus influenza</i>	1
12	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	11
13	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
14	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	9
15	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	10
16	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	5
17	<i>Corynebacterium xerosis</i>	1
18	<i>Corynebacterium accolens</i>	1
19	<i>Corynebacterium coyleae</i>	1
20	<i>Corynebacterium macifaciens</i>	1
21	<i>Corynebacterium durum</i>	3
22	<i>Corynebacterium simulans</i>	1
23	<i>Corynebacterium afermentas lipophilum</i>	3
24	<i>Corynebacterium maris</i>	1
25	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	4
26	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	2
27	<i>Corynebacterium propinquum</i>	2
28	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	1
29	<i>Corynebacterium genitalium</i>	1

C. propinquum (3,6%) и в единичных случаях идентифицированы *C. jeikeium* (1,7%), *C. xerosis* (1,7%), *C. accolens* (1,7%), *C. coyleae* (1,7%), *C. macifaciens* (1,7%), *C. simulans* (1,7%), *C. maris* (1,7%), *C. genitalium* (1,7%) и *C. pseudogenitalium* (1,7%).

Анализ микробного пейзажа показал, что 89 (56%) культур были выделены у мужчин и 62 (39%) культуры — у женщин, причем у женщин обнаружена только грамположительная флора, в то время как две грамотрицательные культуры (*P. aeruginosa*, *H. influenzae*) выявлены только у мужчин. Кроме того, в патологическом материале, полученном от мужчин, идентифицировано в 1,8% раз больше видов микроорганизмов, чем от женщин (26 против 14 соответственно). Следует отметить, что у одного мужчины микрофлора была представлена монокультурой — *P. aeruginosa*. Среди выделенных микроорганизмов рода *Streptococcus* штаммы стрептококков группы *viridans* наиболее часто выделяли из материала от женщин, чем от мужчин (в 30,6 и 19,1% случаев соответственно). *S. pyogenes* также идентифицировали чаще из материала от женщин, чем от мужчин (22,6 и 12,3% соответственно). При идентификации микроорганизмов рода *Staphylococcus* обнаружено, что *S. aureus* и *S. epidermidis* выделяли практически в одинаковом проценте случаев как от мужчин, так и от женщин (14,6 и 7,8%; 11,3 и 4,8% соответственно). Обращает на себя внимание тот факт, что микробный пейзаж коринебактерий, выделенных у мужчин, был наиболее разнообразным, представлен 37 штаммами 17 видов коринебактерий с удельным весом в общем микробном пейзаже 41,6% — *C. tuberculostearicum*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. xerosis*, *C. accolens*, *C. coyleae*, *C. macifaciens*, *C. durum*, *C. simulans*, *C. afermentas lipophilum*, *C. maris*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*, *C. pseudogenitalium*. В то же время у женщин идентифицировано 17 штаммов коринебактерий 9 видов с удельным весом 27,4% — *C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. afermentas lipophilum*, *C. genitalium*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*.

Исследование микробного пейзажа выделенных микроорганизмов в зависимости от возраста показало, что наиболее разнообразный спектр микроорганизмов идентифицирован от лиц молодого возраста — 20–29 и 30–39 лет. Так, у лиц 20–29 лет обнаружено 58 штаммов 17 видов и у лиц 30–39 лет — 50 штаммов 13 видов, в то время как у лиц 15–19-летнего возраста идентифицировано 23 штамма 12 видов микроорганизмов. У лиц 40–49, 50–59 и 60–64 лет отмечается постепенное уменьшение разнообразия выделенных микроорганизмов — 12 штаммов 8 видов (лица 40–49 лет), 8 штаммов 6 видов (50–59 лет) и 2 штамма 2 видов (60–69 лет). Следует отметить, что частота встречаемости штаммов стрептококков группы *viridans*, *S. pyogenes* и *S. aureus* была практически одинаковой во всех возрастных группах — 45,4–48,3–

46,1–50%; 36,4–37,9–23,1–12,5% и 36,4–17,24–34,6–25% соответственно у 15–19, 20–29, 30–39 и 40–49 лет. Штаммы *S. epidermidis* не встречались в микрофлоре у лиц старше 40 лет. Наиболее разнообразные изменения произошли в структуре выделенных коринебактерий. Так, у лиц 15–19, 20–29 и 30–39 лет идентифицировано 9 штаммов 8 видов представителей рода *Corynebacterium* (*C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. genitalum*, *C. accolens*, *C. pseudogenitalum*), 21 штамм 11 видов (*C. tuberculostearicum*, *C. jeikeium*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. durum*, *C. simulans*, *C. afermentas lipophilum*, *C. maris*, *C. minutissimum*, *C. propinquum*) и 17 штаммов 7 видов (*C. tuberculostearicum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. minutissimum*, *C. urealyticum*, *C. propinquum*) соответственно. Среди штаммов, выделенных от лиц 40–49- и 50–59-летнего возраста, регистрируется низкое разнообразие микробного пейзажа, в котором идентифицированы единичные штаммы следующих видов коринебактерий: *C. aurimucosum*, *C. amycolatum*, *C. accolens* — 40–49 лет и *C. durum*, *C. afermentas lipophilum*, *C. xerosis* — 50–59 лет. Следовательно, можно сказать, что наиболее разнообразный микробный пейзаж идентифицирован у лиц от 20 до 40 лет, в то время как у лиц более старшего возраста отмечается постепенное уменьшение разнообразия в микробиоте ротоглотки, и, в основном, это касается представителей рода *Corynebacterium*.

У 35 (44,3%) обследованных пациентов микробный пейзаж представлен монокультурой, и у 65 (55,7%) пациентов выявлены ассоциации микроорганизмов. Наиболее часто как монокультуру идентифицировали штаммы стрептококков группы *viridians* и *S. pyogenes* — у 31,5 и 37,2% больных, штаммы *S. aureus* и *S. epidermidis* встречались в одинаковом проценте случаев (по 11,4%), штаммы *S. pneumoniae* и *P. aeruginosa* выделены в единичном проценте случаев (5,7 и 2,8% соответственно).

Анализ ассоциаций микроорганизмов показал, что в 20,5% случаев ассоциации представлены штаммами представителей родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*: стрептококков группы *viridians*—*S. pyogenes* (4,5%), стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* (6,8%), *S. pyogenes*—*S. aureus* (2,3%), стрептококков группы *viridians*—*S. epidermidis* (2,3%), *S. pyogenes*—стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* (2,3%). Ассоциация стрептококков группы *viridians*—*H. influenzae* или *C. albicans* встречалась в 2,3 и 4,5% случаев соответственно.

Штаммы коринебактерий идентифицировали в 72,7% случаев и только в ассоциациях микроорганизмов. Из них преобладающими были ассоциации из трех микроорганизмов (29,5%), ассоциации из двух микроорганизмов составили 20,5%, из четырех — 11,4% и множественные ассоциации — 4,5% случаев. Наиболее часто в ассоциаци-

ях встречались штаммы *C. tuberculostearicum* (22,7%), *C. aurimucosum* (18,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (11,4%) и *C. amycolatum* (11,4%).

Изучение микробного пейзажа в зависимости от тонзиллярной патологии показало, что в основной группе преобладали монокультуры (в 43,4% случаев), в то время как в контрольной группе наиболее часто встречались ассоциации микроорганизмов (до 56,6%). Следует отметить, что в 20,5% монокультура представлена микроорганизмами родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*. Из них штаммы *S. pyogenes* идентифицированы в 41,2% случаев, стрептококков группы *viridians* — в 35,3%, *S. aureus* — в 8,8%, *S. epidermidis* — в 5,9%, *S. pneumoniae* — в 5,9% случаев и *P. aeruginosa* — в 2,9% случаев.

При идентификации ассоциаций преобладали комплексы из двух и трех видов микроорганизмов (по 42,3%). Ассоциации из четырех микроорганизмов составили 11,5% и множественные (пять) — 3,9% случаев. Обращает внимание, что в ассоциациях их двух микроорганизмов преобладали (в 57,1% случаев) комплексы стрептококков группы *viridians* в сочетании с *S. aureus*. В ассоциациях, состоящих из трех видов микроорганизмов, также преобладающими (55,6%) были комплексы стрептококков группы *viridians*—*C. tuberculostearicum* в сочетании с другими штаммами (*S. aureus*, *C. aurimucosum*, *C. pseudodiphtheriticum*, *C. afermentas lipophilum* и *C. minutissimum*). В ассоциациях, состоящих из четырех видов микроорганизмов, идентифицированы комплексы стрептококков группы *viridians*—*S. aureus* в сочетании с *C. tuberculostearicum*—*C. amycolatum* или *S. pyogenes*—*C. aurimucosum*, а также *S. pyogenes*—*C. aurimucosum*—*C. amycolatum*—*C. simulans*. При множественных ассоциациях выделены сочетания представителей стрептококков, стафилококков и коринебактерий: стрептококков группы *viridians*—*S. aureus*—*C. pseudodiphtheriticum*—*C. amycolatum*—*C. propinquum*.

Интересным оказалось то, что микробный пейзаж микробиоты в контрольной группе (с патологией полости носа без хронического тонзиллита) был в большинстве случаев представлен ассоциациями микроорганизмов (63,2% случаев), состоящими из двух (41,6%), трех (33,3%), четырех (16,7%) или семи (5,2%) микроорганизмов, в то время как монокультура идентифицирована в 36,8% случаев и представлена штаммами *S. aureus*, стрептококков группы *viridians* или *S. epidermidis*.

Обсуждение

Многочисленными работами было показано, что основным этиопатогенетическим фактором, имеющим наибольшее прогностическое значение в развитии хронического тонзиллита и его осложнений, являются микроорганизмы — представители рода *Streptococcus* группы А, об-

ладающие β -гемолитической активностью [1, 2, 3, 4, 8]. По данным исследований, проведенных в прошлые годы, было показано, что эти микроорганизмы идентифицировали у 15,3% больных с токсико-аллергической формой (ТАФ) хронического тонзиллита I степени и у 15,8% больных с ТАФ хронического тонзиллита II степени [1, 2, 3, 4]. Однако ассоциация хронического тонзиллита с наличием данных микроорганизмов не носит видоспецифического характера. Попытки установления связи между течением хронического тонзиллита и фенотипическими характеристиками соответствующего штамма β -гемолитического стрептококка остаются безуспешными: ни антигенная структура, ни способность к продукции суперантигенов и пирогенных токсинов не демонстрируют корреляции с клиническими проявлениями хронического тонзиллита. Также появился ряд исследований, посвященных роли анаэробных микроорганизмов при тонзиллярной патологии и ангинах [11]. Так, из биоптатов миндалин выделено до 12 представителей различных родов анаэробных бактерий, причем независимо от возраста и состояния здоровья обследуемых, и показано, что ангина — это полимикробная инфекция, в основе которой лежит взаимодействие в консорциумах различных видов микроорганизмов, играющих этиологическую роль. Кроме того, в литературе появились данные о возможной роли резидентной микрофлоры, колонизирующей биотоп слизистых миндалин, в развитии тонзиллярной патологии [5, 7, 9, 10, 14, 15]. Показано, что поверхность слизистых оболочек представлена целыми консорциумами из микроорганизмов, находящихся в постоянном динамическом взаимодействии, сдвиг равновесия в которых приводит к развитию патологического процесса. Поэтому целью настоящей работы явилась характеристика микробного пейзажа микроорганизмов при тонзиллярной патологии.

Нами обнаружено, что у 55,7% пациентов на поверхности слизистых миндалин выявлены ассоциации микроорганизмов. Выделено 159 штаммов, принадлежащих к 29 видам микроорганизмов, большинство (98,7%) из которых относились к 27 видам грамположительной флоры: 41,4% микроорганизмов — к роду *Streptococcus*, 19,7% — к роду *Staphylococcus* и 36,9% — к роду *Corynebacterium*, что свидетельствует в пользу гипотезы о наличии достаточно разнообразного консорциума микроорганизмов, колонизирующих поверхность слизистых миндалин [1, 4, 5, 11, 14]. Кроме того, установлено, что наиболее разнообразный спектр микроорганизмов идентифицирован от лиц молодого возраста — 20–29 и 30–39 лет, а с возрастом отмечается уменьшение разнообразия микробиома слизистых миндалин.

Изучение микробного пейзажа в зависимости от тонзиллярной патологии показало, что в основной группе в 43,4% случаев превалиро-

вали монокультуры, которые в 20,5% представлены микроорганизмами родов *Streptococcus* и *Staphylococcus*, в то время как в контрольной группе (без патологии) наиболее часто (до 56,6%) встречались ассоциации микроорганизмов. Такие результаты подтверждают предположение зарубежных коллег [5, 11, 14] о том, что при увеличении разнообразия в микробиоме у пациентов отмечается менее выраженная патология, в то время как при истощении разнообразия сообщества значительно увеличивается количество одного микроорганизма и усиливалась тяжесть патологического процесса. Кроме того, нами в монокультуре при тонзиллярной патологии идентифицированы штаммы *S. pyogenes* в 41,2% случаев и стрептококков группы *viridians* — в 35,3%, что, по сравнению с предыдущими исследованиями [2, 3, 4], свидетельствует об увеличении выделения данных микроорганизмов при этой патологии.

Интересным результатом работы явилось выделение значительного количества микроорганизмов рода *Corynebacterium*, которые составили 36,9% от общего числа микроорганизмов. Род *Corynebacterium* в настоящее время насчитывает 101 опубликованный вид, большинство из которых описаны недавно. Из них более 50% видов выделены от человека, остальные — от животных, птиц, окружающей среды и т.д. [6]. Идентификация микроорганизмов рода *Corynebacterium* с помощью классических микробиологических методов исследования имеет целый ряд трудностей, обусловленных тем, что большинство видов обладают сходной метаболической активностью и, следовательно, имеют одинаковую фенотипическую характеристику [7, 10, 12]. Некоторые коринебактерии метаболически инертные и являются медленно-растущими, что также затрудняет их идентификацию по морфологическим, тинкториальным, культурально-биохимическим свойствам или не позволяет правильно идентифицировать эти микроорганизмы. Использование коммерческой биохимической тест-системы API-Coryne («bioMérieux», Франция) дает возможность идентифицировать не более 30% микроорганизмов этого рода, что также связано с их сходной метаболической активностью и невозможностью расширить панельный ряд. Применение масс-спектрометрического метода позволяет идентифицировать коринебактерии с высокой долей достоверности [7, 10]. Однако не всегда можно получить высокий score или возможны ошибки, например, при идентификации *C. pseudodiphtheriticum* и *C. propinquum*, а также других видов. Кроме того, существующая база данных масс-спектрометрических профилей представлена иногда единичными профилями, а для увеличения достоверности идентификации необходима предварительная обработка образцов. В настоящее время золотым стандартом иденти-

фикации является секвенирование фрагментов 16S rRNA или гена *rpoB* [7, 12, 13, 14, 15]. Нами с помощью комплекса классических микробиологических, масс-спектрометрических методов исследования и секвенирования из клинического материала от пациентов с тонзиллярной патологией и без нее было идентифицировано 18 видов коринебактерий. Причем в большинстве случаев (72,7%) данные микроорганизмы были выделены только в ассоциациях с превалированием 3–4-компонентных сообществ. Наибольшее разнообразие выделенных коринебактерий также отмечалось в возрасте от 20 до 40 лет, в то время как у лиц более старшего возраста отмечается постепенное уменьшение разнообразия этих микроорганизмов в микробиоте ротоглотки.

Ранее считалось, что недифтерийные коринебактерии являются одними из представителей нормофлоры человеческого организма и выделяются из различных биотопов — кожа, слизистые респираторного и урогенитального тракта. Однако, в последнее десятилетие увеличивается число работ, посвященных выделению коринебактерий при различных инфекционных состояниях как верхних, так и нижних дыхательных путей [5, 7, 9, 10, 14]. Так, по некоторым данным [9, 14], количество выделенных из клинического материала коринебактерий при патологических состояниях верхних дыхательных путей достигает 72%, а при инфекциях нижних дыхательных путей, в частности, пневмониях, бронхитах и бронхоэктазах — до 55% случаев. Кроме того, коринебактерии выделяются из различных биотопов при таких патологических состояниях как эндокардит, бактериемии, кожные и урогенитальные инфекции. Также обращает внимание тот факт, что при иммунодефицитных состояниях и отягощенном преморбидном фоне количество выделенных коринебактерий увеличивается [9]. В связи с этим в последние годы

широко обсуждается вопрос о патогенетической значимости этих микроорганизмов.

В проведенном исследовании из выделенных коринебактерий наибольший удельный вес имели *C. tuberculostearicum* (17,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (15,5%) и *C. aurimucosum* (18,9%). Данные микроорганизмы также наиболее часто встречались и в ассоциациях — *C. tuberculostearicum* (22,7%), *C. aurimucosum* (18,2%), *C. pseudodiphtheriticum* (11,4%). По данным литературы [7, 9, 14], *C. pseudodiphtheriticum* в настоящее время рассматривается не только как представитель нормофлоры, но и как возбудитель инфекций респираторного тракта, так как выделяется при фарингитах, пневмониях, бактериемиях, легочных абсцессах, трахеитах, трахеобронхитах и риносинуситах. Вид *C. tuberculostearicum* впервые был выделен и описан только в 2004 г., и к настоящему времени данный микроорганизм выделен при риносинуситах, маститах, остеомиелитах, из гнойных хирургических ран и образцов мочи [10, 14]. Поэтому полученные данные о выделении этих микроорганизмов и при тонзиллярной патологии расширяет наше представление об их патогенетической значимости.

Выводы

Проведенные исследования впервые позволили охарактеризовать микробный пейзаж у больных с тонзиллярной патологией с молекулярно-генетической идентификацией 18 видов выделенных коринебактерий; показано, что состояние ротоглотки прямо зависит от состава микробиоты; при выраженном патологическом процессе в микробиоте ротоглотки превалирует монокультура, в то время как наличие ассоциаций, обусловленных разнообразным микробным пейзажем, свидетельствует о менее выраженном патологическом процессе; установлена тенденция уменьшения с возрастом разнообразия выделенных микроорганизмов.

Список литературы/References

1. Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. М.: Медицина, 1991. 301 с. [Borovskii E.V., Leontiev V.K. *Biologiya polosti rta* [Biology of oral cavity]. Moscow: Medicine, 1991, 301 p.]
2. Крюков А.И., Шостак Н.А., Туровский А.Б., Жуховицкий В.Г., Елисеев О.В. Анализ эффективности консервативного лечения простой формы хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. 2005. № 3. С. 50–51. [Krukov A.I., Shostak N.A., Turovskii A.B., Zuchovizkii V.G., Eliseev O.V. Analysis of efficiency of conservative treatment of a simple form of chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2005, no. 3, pp. 50–51. (In Russ.)]
3. Крюков А.И., Сухина М.А., Жуховицкий В.Г. Роль микрофлоры в этиологии хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. 2010. № 3. С. 4–6. [Krukov A.I., Suchinina M.A., Zuchovizkii V.G. Role of microflora in an etiology of chronic tonsillitis. *Vestnik otorinolaringologii = Herald of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 3, pp. 4–6. (In Russ.)]
4. Крюков А.И., Кунельская Н.Л., Туровский А.Б. Стрептококковые заболевания глотки // Русский медицинский журнал. 2006. Т. 14, № 27. С. 1972–1973. [Krukov A.I., Kunelskai N.L., Turovskii A.B. Streptococcal diseases of a throat. *Russkii meditsinskii zhurnal = Russian Medical Journal*, 2006, vol. 14, no. 27, pp. 1972–1973. (In Russ.)]
5. Abreu N.A., Nagalingam N.A., Song Y., Roediger F.C., Pletcher S.D., Goldberg A.N., Lynch S.V. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculostearicum* enrichment mediates rhinosinusitis. *Science Transl. Medicine*, 2012, vol. 4, no. 151, pp. 151ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3003783
6. Alatoon A., Cazanave C.J., Cunningham S.C., Ihde S.M., Patel R. Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 1, pp. 160–163. doi: 10.1128/JCM.05889-11

7. Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 10, pp. 3152–3158. doi: 10.1128/JCM.00796-12
8. Brook I. Failure of penicillin to eradicate group A beta-hemolytic streptococci tonsillitis: causes and management. *J. Otolaryngology*, 2001, vol. 30, pp. 324–329.
9. Diez-Aguilar M., Ruiz-Garbajosa P., Fernandez-Olmos A., Guisado P., Del Campo R., Quereda C., Cantón R., Meseguer M.A. Non-diphtheriae *Corynebacterium* species: an emerging respiratory pathogen. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Disease*, 2012, vol. 32, no. 6, pp. 769–772. doi: 10.1007/s10096-012-1805-5
10. Hinic V., Lang C., Weisser M., Strauba C., Freia R., Goldenbergera D. *Corynebacterium tuberculostearicum*: a potentially misidentified and multiresistant *Corynebacterium* species isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, no. 8, pp. 2561–2567. doi: 10.1128/JCM.00386-12
11. Jensen A., Fagö-Olsen H., Sørensen C.H., Kilian M. Molecular mapping to species level of the tonsillar crypt microbiota associated with health and recurrent tonsillitis. *PLOS One*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. e56418. doi: 10.1371/journal.pone.0056418
12. Khamis A., Raoult D., La Scola B. Comparison between rpoB and 16SrRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 4, pp. 1934–1936. doi: 10.1128/JCM.43.4.1934-1936.2005
13. Khamis A., Raoult D., La Scola B. rpoB gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 9, pp. 3925–3931. doi: 10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004
14. Nhan T.X., Parienti J.J., Badiou G., Leclercq R., Cattoir V. Microbiological investigation and clinical significance of *Corynebacterium* spp. In respiratory specimens. *Diagn. Microbiol. and Infect. Disease*, 2012, vol. 74, pp. 236–241. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.07.001
15. Pascual C., Lawson P.A., Farrow J.A., Gimenez M.N., Collins M.D. Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16SrRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1995, vol. 45, no. 4, pp. 724–728. doi: 10.1099/00207113-45-4-724

Авторы:

Борисова О.Ю., д.м.н., руководитель лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Алешкин В.А., д.б.н., профессор, директор ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Пименова А.С., младший научный сотрудник лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Россия;

Крюков А.И., д.м.н., профессор, директор ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

Кунельская Н.Л., д.м.н., профессор, зам. директора по научной работе ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

Гуров А.В., д.м.н., профессор кафедры оториноларингологии лечебного факультета, профессор кафедры микробиологии и вирусологии педиатрического факультета ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Шадрин Г.Б., к.м.н., зав. консультативно-диагностическим отделением, старший научный сотрудник ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

Товмасын А.С., к.м.н., старший научный сотрудник ГБУЗ Научно-исследовательский клинический институт оториноларингологии им. Л.И. Свержевского, Москва, Россия;

Ефимов Б.А., д.м.н., профессор, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

Кафарская Л.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии и вирусологии ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Borisova O.Yu., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Diagnostics of Diphtheria and Pertussis Infections of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Aleshkin V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Pimenova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Diagnostic of Diphtheria and Pertussis Infections of G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

Krukov A.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Director of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

Kunelskaya N.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Scientific Work of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

Gurov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor of Department of Otorhinolaryngology, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Shadrin G.B., PhD (Medicine), Head of Department of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

Tovmasyan A.S., PhD (Medicine), Leader Scientist of Research Institute of Clinical Otorhinolaryngology, Moscow, Russian Federation;

Efimov B.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation;

Kafarskaya L.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department of Microbiology and Virology of Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov, Moscow, Russian Federation.