



Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения микробиоты кишечника новорожденных

Припутневич Т.В.,
Николаева А.В.,
Гордеев А.Б.,
Исаева Е.Л.,
Муравьева В.В.,
Любасовская Л.А.,
Шубина Е.,
Трофимов Д.Ю.,
Мелкумян А.Р.,
Зубков В.В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, Российская Федерация

Цель настоящего исследования – сравнительный анализ эффективности видовой идентификации микроорганизмов при исследованиях микробиоты кишечника новорожденных с помощью двух различных методов: времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) и секвенирования участков гена *16S rPHK*.

Материал и методы. Исследования микробиоты кишечника проводили на группе новорожденных из различных отделений ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России в 2019 г. Состав микробиоты кишечника новорожденных изучали с использованием расширенного спектра селективных и не-селективных питательных сред и инкубированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях. Для исследования брали все выделенные в ходе работы чистые культуры микроорганизмов. Микроорганизмы идентифицировали с помощью двух различных методов: MALDI-TOF-MS и секвенирования участков гена *16S rPHK*.

Результаты. Для исследования отобрано 84 чистые культуры микроорганизмов, выделенных из фекалий новорожденных. Для каждого выделенного изолята проведено MALDI-TOF-MS исследование. Для большей части изолятов (82%) получены значения показателя SCORE в диапазоне от 1,68 до 2,40, что дало возможность отнести каждый изолят к тому или иному предполагаемому виду. Для 15 (18%) изолятов микроорганизмов видовую идентификацию корректно провести не удалось. Результаты видовой идентификации исследуемых изолятов микроорганизмов, полученные обоими методами, полностью совпали для 58 из 69 изолятов (84%). В ряде случаев определение вида микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-MS прошло некорректно. Применение секвенирования видоспецифических участков гена *16S rPHK* позволило получить правильный результат.

Заключение. Результаты, полученные путем секвенирования видоспецифических участков гена *16S rPHK*, хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра. Показано, что MALDI-TOF-MS можно эффективно использовать при проведении исследований по изучению состава микробиоты кишечника новорожденных.



Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Припутневич Т.В., Николаева А.В., Гордеев А.Б., Исаева Е.Л., Муравьева В.В., Любасовская Л.А., Шубина Е., Трофимов Д.Ю., Мелкумян А.Р., Зубков В.В. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии для изучения микробиоты кишечника новорожденных // Акушерство и гинекология: новости, мнения, обучение. 2020. Т. 8, № 1. С. 22–29. doi: 10.24411/2303-9698-2020-11003

Статья поступила в редакцию 10.01.2020. Принята в печать 05.02.2020.

Ключевые слова: MALDI-TOF-MS, секвенирование гена *16S rPHK*, культуромика, микробиота, микробиота кишечника, новорожденные

Application of MALDI-TOF mass spectrometry to study gut microbiota of newborns

Priputnevich T.V., Nikolaeva A.V.,
Gordeev A.B., Isaeva E.L.,
Muravieva V.V., Lyubasovskaya L.A.,
Shubina J., Trofimov D.Yu.,
Melkumyan A.R., Zubkov V.V.

Kulakov Obstetrics, Gynecology and Perinatology National Medical
Research Center of Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
117997, Moscow, Russian Federation

The aim of the study is to conduct a comparative analysis of the effectiveness of species identification of microorganisms in studies of the gut microbiota of newborns using two different methods: MALDI-TOF-MS and sequencing of *16s rRNA* gene loci.

Material and methods. The study of the gut microbiota was conducted on a group of newborns from various departments of the National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation in 2019. The study of the composition of the intestinal microbiota of newborns was carried out using an extended range of selective and non-selective nutrient media and incubation in aerobic, microaerophilic and anaerobic conditions. All isolated in the work pure cultures of microorganisms were taken for the study. Identification of microorganisms was performed using two different methods: MALDI-TOF-MS and sequencing of *16s rRNA* gene loci.

Results. For the study, 84 pure cultures of microorganisms isolated from the feces of newborn children were selected. The MALDI-TOF-MS analysis was performed for each isolated isolate. For most of the isolates (82%), the values of the SCORE indicator were obtained in the range from 1.68 to 2.40, which made it possible to attribute each isolate to a particular intended species. For 15 (18%) isolates of microorganisms, correct species identification was not possible. The results of species identification of the studied microbial isolates obtained by both methods were identical for 58 of the 69 isolates (84%). In some cases, the determination of the type of microorganisms using the MALDI-TOF-MS was incorrect, and only the use of sequencing of species-specific loci of the *16s rRNA* gene allowed to obtain the correct result.

Conclusion. Results obtained by sequencing species-specific loci of the *16s rRNA* gene correlate well with results obtained using a time-of-flight MALDI-TOF mass spectrometer. It has been shown that MALDI-TOF-MS can be effectively used in studies of the gut microbiota of newborns.



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

For citation: Priputnevich T.V., Nikolaeva A.V., Gordeev A.B., Isaeva E.L., Muravieva V.V., Lyubasovskaya L.A., Shubina J., Trofimov D.Yu., Melkumyan A.R., Zubkov V.V. Application of MALDI-TOF mass spectrometry to study gut microbiota of newborns. *Akusherstvo i ginekologiya: novosti, mneniya, obuchenie* [Obstetrics and Gynecology: News, Opinions, Training]. 2020; 8 (1): 22–9. doi: 10.24411/2303-9698-2020-11003 (in Russian)

Received 10.01.2020. **Accepted** 05.02.2020.

Keywords:
MALDI-TOF-MS,
16S rRNA gene
sequencing,
culturomics,
microbiota,
gut microbiota,
newborns

В настоящее время исследования микробиоты кишечника человека становятся все более актуальными [1–3]. Микробиота кишечника человека формируется с момента внутриутробного зарождения кишечника и вплоть до смерти человека остается динамически изменяющейся системой, влияющей на все основные физиологические процессы организма человека. Нарушение становления микробиоты любой локализации (кишечник, влагалище, кожа и т.д.) или изменение уже сформировавшегося устойчивого микроценоза за счет ятрогенных, инфекционных воздействий, изменений гормонального статуса, в том числе возрастного, морфофункциональных особенностей строения органов и тканей влечет за собой каскад биохимических реакций, способствующих развитию патологических процессов, многогранных по патофизиологии и клиническим проявлениям.

Особое внимание заслуживает изучение микробиоты кишечника новорожденных. В современных условиях характер микробной колонизации кишечника, в том числе у ново-

рожденных, претерпел существенные изменения в связи с увеличением контингента женщин с осложненным течением беременности, ростом стрессовых воздействий, экологическим неблагополучием и бесконтрольным применением антибиотиков [4–6]. Изучение становления микробиоты кишечника новорожденных позволяет, с одной стороны, получить новые знания о влиянии микробиоты кишечника на процессы нормального развития и здоровье ребенка, а с другой – своевременно выявлять проблемы становления кишечной микробиоты и разрабатывать пути ее коррекции. Известно, что самые значимые проблемы становления кишечной микробиоты наблюдаются у недоношенных новорожденных [7]. Известно, что нарушения становления микробиоты кишечника могут привести к сепсису, некротическому энтероколиту (НЭК) и синдрому системной воспалительной реакции [8]. Показано, что у недоношенных детей с очень низкой массой тела наблюдается уменьшение разнообразия микробиоты кишечника и более высокая патогенная нагрузка [7, 9].

Одной из главных проблем, стоящих перед исследователями, занимающихся изучением микробиоты кишечника новорожденных, является корректная и при этом относительно быстрая видовая идентификация большого количества изолятов микроорганизмов, а большинство из них трудно идентифицируются или не идентифицируются классическими бактериологическими методами бактериями. В течение последних десятилетий широкое распространение получили молекулярно-генетические технологии, и среди них особого внимания заслуживают методики высокопроизводительного секвенирования. При этом используются либо методики, направленные на секвенирование участков гена 16S рРНК, либо метагеномный анализ. Секвенирование позволяет выявлять некультивируемые или труднокультивируемые виды микроорганизмов, как правило, с его помощью можно проводить идентификацию тех или иных таксонов, но не все обнаруженные микроорганизмы идентифицируются до уровня видов. Так как при изучении микробиоты кишечника большое значение имеет видовая идентификация микроорганизмов, особенно бифидобактерий и лактобацилл, культуральные методы имеют определенное преимущество. Кроме того, секвенирование не позволяет определить жизнеспособность обнаруженных микроорганизмов: могут быть выявлены участки ДНК нежизнеспособных бактерий, не способных существовать в условиях кишечника.

Другие группы молекулярно-генетических методов: полимеразная цепная реакция (ПЦР) и биочипы, – селективные методы, позволяющие определять только те микроорганизмы, для которых известны специфические для них нуклеотидные последовательности, что ограничивает использование этих методов для изучения микробиоты кишечника.

Первые исследования микробиоты кишечника были выполнены с помощью культуральных методов путем проведения морфологических и биохимических тестов [7]. Однако такие тесты времязатратны и дороги. Секвенирование участков гена 16S рРНК, проводимое для чистых культур, в настоящее время является «золотым стандартом» видовой идентификации бактерий, но имеет высокую себестоимость.

В последние годы для решения стратегических вопросов современной микробиологии мощным инструментом в руках ученых становится метод времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS), ставший абсолютной альтернативой классической биохимической и молекулярно-генетической диагностики. MALDI-TOF-MS – это автоматизированная молекулярная платформа, которая представляет собой быстрый, простой и недорогой метод видовой идентификации бактериальных и грибковых микроорганизмов [10, 11]. На основе масс-спектрометрии их видовая идентификация может быть выполнена в срок, не превышающий нескольких минут, в то время как обычный анализ занимает от нескольких часов до более 2 сут. Однако остается дискуссионным вопрос о том, можно ли использовать метод MALDI-TOF-MS для эффективной видовой идентификации микроорганизмов при исследованиях микробиоты кишечника новорожденных.

Цель исследования – провести сравнительный анализ эффективности видовой идентификации микроорганизмов

при исследованиях микробиоты кишечника новорожденных с помощью двух различных методов: MALDI-TOF-MS и секвенирования участков гена 16S рРНК.

Материал и методы

Исследования микробиоты кишечника проводили на группе новорожденных из различных отделений ФГБУ «НМИЦ АГП им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России в 2019 г. Всем новорожденным выполнены клинические анализы крови и мочи для исключения инфекционной патологии или других факторов, способных повлиять на формирование микробиоты кишечника. У новорожденных проводился 3-кратный отбор проб фекалий: в 1-е сутки, конце 1-й недели и конце 1-го месяца жизни. Образцы мекония, полученного во время первой дефекации, или кала, собранные со стерильной пеленки в стерильный пластиковый контейнер, в течение 2 ч доставляли в лабораторию и незамедлительно приступали к посеву.

Изучение состава микробиоты кишечника новорожденных проведено методом культуромикрии – с использованием расширенного спектра селективных и неселективных питательных сред и инкубированием в аэробных, микроаэрофильных и анаэробных условиях. Посев мекония и кала проводили согласно принятым методикам [5, 12]. Для выделения факультативно-анаэробных и аэробных микроорганизмов использовали колумбийский кровяной агар, хромогенную среду Brilliance, сальмонелла-шигелла-агар, декстрозный агар Сабуро (Oxoid, Великобритания), маннит-солевой агар (Himedia, Индия), среду для выявления и дифференциации *Streptococcus agalactiae* (CHROMagar, Франция), энтерококковый агар, агар Эндо (ФГУН «ГИЦПМ и Б», Оболонск, Россия). Лактобациллы культивировали на среде лактобакагар (ФГУН «ГИЦПМ и Б», Оболонск, Россия). Строгие анаэробы выделяли на агаре для бифидобактерий (Himedia, Индия), прeredуцированном агаре Шедлера с необходимыми добавками, основном агаре для анаэробов, перфрингенс агаре, железосульфитном агаре, селективном агаре для *Clostridium difficile* (Oxoid, Великобритания). Для культивирования микроаэрофилов использовали CO₂-инкубатор (Joan, Франция) с концентрацией CO₂ = 5%. Строгие анаэробы культивировали в анаэробном боксе (Joan, Франция) в атмосфере 3-компонентной газовой смеси (N₂ – 80%; CO₂ – 10%; H₂ – 10%). Для контроля стерильности использовали тиогликолевый бульон (Oxoid, Великобритания).

Для исследования брали все выделенные в ходе работы чистые культуры микроорганизмов. Идентификацию микроорганизмов осуществляли с помощью двух различных методов: MALDI-TOF-MS и секвенирования гена 16S рРНК.

MALDI-TOF-MS анализ проводили следующим образом. Суточные культуры микроорганизмов (1–2 колонии) наносили на ячейки стальной мишени, подсушивали в течение 1–2 мин, затем сверху наслаивали 2 мкл насыщенного раствора матрицы. В качестве матрицы применяли альфа-циано-4-гидроксикоричную кислоту (Bruker Daltonics, Германия) в виде насыщенных растворов в смеси 50% ацетонитрила, 2,5% трифторуксусной кислоты. Все использованные реактивы, включая воду, были аналитической чистоты или специальными для масс-

спектрометрии. Кристаллы оставляли на воздухе в течение 5–10 мин до полного высыхания. Влажность и температуру при этом не контролировали. Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex III (Bruker Daltonics, Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение MALDI BioTyper версии 3.0 (Bruker Daltonics, Германия). При значениях SCORE 1,60 и ниже видовую идентификацию считали недостоверной.

Секвенирование видоспецифических участков гена 16S рРНК осуществляли следующим образом: ДНК-культуры выделяли с использованием набора реагентов ДНК «Проба-ЦиТо» («ДНК-технология»). Для секвенирования использовали 2 фрагмента ДНК: ампликон длиной ~440 п.н., соответствующий позициям 339–785 гена 16S рРНК, и ампликон длиной ~1340 п.н., соответствующий позициям 42–1380 гена 16S рРНК. Амплификацию проводили с использованием детектирующего амплификатора ДТпрайм («ДНК-технология»). Секвенирование осуществляли на приборе 3130 Genetic Analyzer с использованием набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit согласно протоколу производителя. Для видовой идентификации использовали программный пакет BLAST [13].

Результаты видовой идентификации чистых культур, полученные секвенированием видоспецифических участков гена 16S рРНК, сравнивались с результатами, полученными методом MALDI-TOF-MS анализа.

Результаты

Для исследования отобрано 84 чистые культуры микроорганизмов, выделенные из фекалий новорожденных. Для каждого выделенного изолята проведено MALDI-TOF-MS исследование. Результаты видовой идентификации чистых культур микроорганизмов приведены в табл. 1. Для 69 (82%) изолятов получены значения показателя SCORE в диапазоне от 1,68 до 2,40, что дало возможность отнести каждый изолят к тому или иному предполагаемому виду. Для 15 (18%) изолятов микроорганизмов корректно видовую идентификацию провести не удалось.

Для каждого изолята выполнено секвенирование видоспецифических участков гена 16S рРНК. Результаты видовой идентификации, полученные путем секвенирования видоспецифических участков гена 16S рРНК, приведены в табл. 1.

Для всех 15 изолятов микроорганизмов, для которых видовую идентификацию методом MALDI-TOF-MS анализа про-

Таблица 1. Результаты видовой идентификации чистых культур микроорганизмов

№	Результаты видовой идентификации по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии		Результаты видовой идентификации по результатам секвенирования участков гена 16S рРНК
	Вид микроорганизма	Значение показателя SCORE	Вид микроорганизма
1	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,40	<i>Bacteroides fragilis</i>
2	<i>Bacteroides fragilis</i>	2,22	<i>Bacteroides fragilis</i>
3	<i>Clostridium tertium</i>	2,02	<i>Clostridium tertium</i>
4	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2,17	<i>Actinomyces odontolyticus</i>
5	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,19	<i>Bifidobacterium longum</i>
6	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,00	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
7	<i>Bacteroides stercoris</i>	2,40	<i>Bacteroides stercoris</i>
8	<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1,77	Staphylococcus epidermidis
9	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1,90	<i>Lactobacillus jensenii</i>
10	<i>Lactobacillus oris</i>	2,05	<i>Lactobacillus oris</i>
11	–	–	Lactobacillus gasseri
12	Actinomyces oris	1,70	Actinomyces naeslundii/Actinomyces viscosus
13	<i>Veillonella parvula</i>	2,11	<i>Veillonella parvula</i>
14	<i>Ruminococcus gnavus</i>	1,70	<i>Ruminococcus gnavus</i>
15	<i>Granulicatella elegans</i>	1,90	<i>Granulicatella elegans</i>
16	<i>Eggerthella lenta</i>	2,35	<i>Eggerthella lenta</i>
17	–	–	Bifidobacterium bifidum
18	–	–	Cutibacterium acnes
19	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1,90	<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>
20	–	–	Bifidobacterium kashiwanohense/ Bifidobacterium pseudocatenulatum/ Bifidobacterium catenulatum
21	–	–	Bifidobacterium longum
22	Lactobacillus ultinensis	1,85	Lactobacillus helveticus
23	<i>Bacteroides uniformis</i>	2,30	<i>Bacteroides uniformis</i>
24	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,85	<i>Bifidobacterium longum</i>
25	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1,83	<i>Bifidobacterium kashiwanohense/ Bifidobacterium pseudocatenulatum/ Bifidobacterium catenulatum</i>
26	<i>Campilobacter concisus</i>	1,67	<i>Campilobacter concisus</i>
27	<i>Eggerthella lenta</i>	2,18	<i>Eggerthella lenta</i>

№	Результаты видовой идентификации по данным MALDI-TOF масс-спектрометрии		Результаты видовой идентификации по результатам секвенирования участков гена 16S рРНК
	Вид микроорганизма	Значение показателя SCORE	Вид микроорганизма
28	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	2,00	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
29	–	–	<i>Globicatella sanguinis</i>
30	<i>Veilonella dispar</i>	2,07	<i>Veilonella atypica</i>
31	<i>Bifidobacterium dentium</i>	1,78	<i>Bifidobacterium animalis</i>
32	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	2,24	<i>Bifidobacterium kashiwanohense/ Bifidobacterium pseudocatenulatum/ Bifidobacterium catenulatum</i>
33	<i>Bifidobacterium longum</i>	2,10	<i>Bifidobacterium longum</i>
34	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,10	<i>Bifidobacterium breve</i>
35	<i>Veilonella atypica</i>	2,00	<i>Veilonella atypica</i>
36	<i>Sutterella wadsworthensis</i>	2,35	<i>Sutterella wadsworthensis</i>
37	<i>Veilonella parvula</i>	1,68	<i>Veilonella parvula</i>
38	–	–	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
39	<i>Clostridium perfringens</i>	2,00	<i>Clostridium perfringens</i>
40	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
41	<i>Eubacterium limosum</i>	2,00	<i>Eubacterium limosum</i>
42	<i>Streptococcus mitis</i>	2,20	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>
43	–	–	<i>Aerococcus sp.</i>
44	–	–	<i>Streptococcus mutans</i>
45	–	–	<i>Veilonella atypica</i>
46	<i>Parabacteroides distansonis</i>	2,16	<i>Parabacteroides distansonis</i>
47	<i>Lactobacillus salivarius</i>	2,50	<i>Lactobacillus salivarius</i>
48	<i>Eubacterium limosum</i>	2,00	<i>Eubacterium callanderi</i>
49	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1,73	<i>Lactobacillus crispatus</i>
50	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,90	<i>Bifidobacterium longum</i>
51	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,20	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
52	<i>Lactobacillus crispatus</i>	1,80	<i>Lactobacillus fermentum</i>
53	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,90	<i>Bifidobacterium longum</i>
54	<i>Lactobacillus gasseri</i>	2,00	<i>Lactobacillus gasseri</i>
55	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,90	<i>Lactobacillus fermentum</i>
56	–	–	<i>Lactobacillus fermentum</i>
57	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,80	<i>Lactobacillus fermentum</i>
58	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,95	<i>Lactobacillus gasseri</i>
59	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,90	<i>Bifidobacterium breve</i>
60	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,90	<i>Lactobacillus fermentum</i>
61	<i>Lactobacillus paracasei</i>	1,80	<i>Lactobacillus paracasei/casei</i>
62	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,90	<i>Lactobacillus fermentum</i>
63	–	–	<i>Enterococcus faecalis</i>
64	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,99	<i>Lactobacillus fermentum</i>
65	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,90	<i>Bifidobacterium longum</i>
66	–	–	<i>Enterococcus faecalis</i>
67	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,95	<i>Lactobacillus fermentum</i>
68	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,90	<i>Lactobacillus fermentum</i>
69	<i>Lactobacillus zeae</i>	1,90	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
70	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,90	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
71	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,90	<i>Bifidobacterium breve</i>
72	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,70	<i>Bifidobacterium longum</i>
73	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,90	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
74	<i>Lactobacillus fermentum</i>	1,80	<i>Lactobacillus fermentum</i>
75	<i>Bifidobacterium breve</i>	1,70	<i>Bifidobacterium breve</i>
76	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,96	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
77	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,93	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
78	–	–	<i>Lactobacillus fermentum</i>
79	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1,80	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
80	–	–	<i>Enterococcus faecalis</i>
81	<i>Bifidobacterium longum</i>	1,90	<i>Bifidobacterium longum</i>
82	<i>Lactobacillus zeae</i>	1,80	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
83	<i>Lactobacillus casei</i>	1,98	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
84	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1,71	<i>Bifidobacterium bifidum</i>

вести не удалось, путем секвенирования получена видовая идентификация. Изоляты микроорганизмов относились к следующим видам: *Lactobacillus gasseri*, *Bifidobacterium bifidum* (2 изолята), *Cutibacterium acnes*, *Bifidobacterium longum*, *Globicatella sanguinis*, *Aerococcus* spp., *Streptococcus mutans*, *Veilonella atypica*, *Lactobacillus fermentum* (2 изолята), *Enterococcus faecalis* (3 изолята) и к комплексу видов: *Bifidobacterium kashiwanohense*/*Bifidobacterium pseudocatenulatum*/*Bifidobacterium catenulatum*.

Результаты видовой идентификации исследуемых изолятов микроорганизмов, полученные обоими методами, полностью совпали для 58 из 69 изолятов (84%). Следует отметить, что в 5 случаях точную видовую принадлежность близкородственных микроорганизмов установить не удалось при использовании обоих методов. Как методом MALDI-TOF-MS анализа, так и с помощью секвенирования видоспецифических участков гена 16S рПНК невозможно точно определить близкородственные виды *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*, а также виды *Bifidobacterium kashiwanohense*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium catenulatum*; и виды *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, их только можно отнести к группе, включающей 2–3 вида микроорганизмов.

Однако в 16% случаев (11 трудноидентифицируемых изолятов) определение вида микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-MS прошло некорректно, и только секвенирование видоспецифических участков гена 16S рПНК позволило получить правильный результат. Следует отметить, что значения показателя SCORE в этих случаях были невысокими: для 9 изолятов они находились в диапазоне 1,68–1,98 и лишь в 2 случаях показатель SCORE составил 2,00–2,07.

В одном случае с помощью MALDI-TOF-MS был неправильно определен род микроорганизмов: *Actinomyces odontolyticus* со значением SCORE – 1,77. По результатам секвенирования определен *Staphylococcus epidermidis*. Возможно, в данном случае была смесь культур видов *Actinomyces odontolyticus* и *Staphylococcus epidermidis*.

В остальных случаях род микроорганизмов определен верно, но были ошибки видовой идентификации. В 5 случаях некорректно определены виды лактобацилл (род *Lactobacillus*), в 2 случаях – бифидобактерий (род *Bifidobacterium*), по одному случаю *Veilonella*, *Eubacterium* и *Actinomyces*. Следует отметить и сложность корректного определения *Actinomyces* даже с помощью секвенирования видоспецифических участков гена 16S рПНК: изолят *Actinomyces*, определенный с помощью MALDI-TOF-MS как *A.oris*, путем секвенирования определен как *Actinomyces naeslundii* или *Actinomyces viscosus*.

Обсуждение

Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что результаты, полученные путем секвенирования видоспецифических участков гена 16S рПНК, хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью метода MALDI-TOF-MS анализа.

Для большей части изолятов (82%), включенных в исследование, получены значения показателя SCORE в диапазоне

от 1,68 до 2,40, что дало возможность отнести каждый изолят к тому или иному предполагаемому виду. Для 15 (18%) изолятов микроорганизмов корректно видовую идентификацию провести не удалось. Результаты видовой идентификации исследуемых изолятов микроорганизмов, полученные обоими методами, полностью совпали для 84% изолятов.

В ряде случаев определение вида микроорганизмов с помощью MALDI-TOF-MS прошло некорректно, и только применение секвенирования видоспецифических участков гена 16S рПНК позволило получить правильный результат. Так как значения показателя SCORE в этих случаях были невысокими (для 9 изолятов они находились в диапазоне 1,68–1,98 и лишь в 2 случаях показатель SCORE составил 2,00–2,07), можно рекомендовать применение MALDI-TOF-MS при проведении исследований микробиоты кишечника новорожденных в качестве быстрого, недорогого и удобного метода видовой идентификации микроорганизмов.

Следует отметить, что в данной работе видовая идентификация на MALDI-TOF-MS проводилась без предварительной подготовки образцов. В частности, проведение экстракции чистых культур изолятов микроорганизмов, несомненно, улучшило бы результаты проводимых исследований. Но при исследованиях микробиоты кишечника человека проводится MALDI-TOF-MS большого количества выделенных изолятов «на потоке». Экстракция, проводимая для каждого изолята, существенно усложнит процедуру и увеличит время, затрачиваемое на проведение таких исследований.

Однако при низких значениях SCORE, полученных при проведении MALDI-TOF-MS, можно рекомендовать повторное проведение анализа, а также экстракцию чистой культуры микроорганизма.

В случае, когда повторное проведение MALDI-TOF-MS и анализа с предварительной подготовкой образцов не привело к увеличению показателя SCORE до значений 2,00–2,10, рекомендуется проведение секвенирования участков гена 16S рПНК. Секвенирование таких участков в настоящее время является «золотым стандартом» видовой идентификации бактерий, но имеет высокую себестоимость. Особенно хочется отметить не всегда корректное определение лактобацилл и бифидобактерий при низких значениях показателя SCORE. В данной работе в 5 случаях были некорректно определены виды лактобацилл и в 2 – бифидобактерий. Для таких случаев применение секвенирования представляется оправданным.

Следует отметить, что и секвенирование участков гена 16S рПНК не всегда однозначно позволяет определить видовую принадлежность изолята. В данной работе, например, невозможно точно определить близкородственные виды *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*, а также виды *Bifidobacterium kashiwanohense*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* и *Bifidobacterium catenulatum*; виды *Streptococcus mitis* и *Streptococcus oralis*, а также виды рода *Actinomyces*.

К сожалению, ни с помощью MALDI-TOF-MS, ни путем секвенирования используемого в работе участка гена 16S рПНК невозможно корректно определить подвид микроорганизмов вида *Bifidobacterium longum*. Корректное определение подвида *Bifidobacterium longum* необходимо для корректного анализа состава микробиоты кишечника, а также

для выявления кандидатных в пробиотические штаммов микроорганизмов. Мы рекомендуем для дифференциации подвидов использовать ПЦР-методику, представленную в работе [14], а также использовать другие участки генов рибосомальных РНК.

Заключение

Проведен сравнительный анализ эффективности видовой идентификации микроорганизмов при проведении

исследований микробиоты кишечника новорожденных с помощью двух различных методов: MALDI-TOF масс-спектрометрии и секвенирования участков гена 16S рРНК. Результаты, полученные путем секвенирования видоспецифических участков гена 16S рРНК, хорошо коррелируют с результатами, полученными с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра. Показано, что метод MALDI-TOF-MS анализа можно эффективно использовать при проведении исследований по изучению микробиоты кишечника новорожденных.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация:

Припутневич Татьяна Валерьевна (Tatiana V. Priputnevich) – доктор медицинских наук, руководитель отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: priput1@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-4126-9730>

Николаева Анастасия Владимировна (Anastasia V. Nikolaeva) – кандидат медицинских наук, главный врач

E-mail: a_nikolaeva@oparina4.ru

Гордеев Алексей Борисович (Alexey B. Gordeev) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: a_gordeev@oparina4.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9171-5276>

Исаева Елена Леонидовна (Elena L. Isaeva) – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: e_isaeva@oparina4.ru

Муравьева Вера Васильевна (Vera V. Muravieva) – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: v_muravieva@oparina4.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0383-0731>

Любасовская Людмила Анатольевна (Lyudmila A. Lyubasovskaya) – кандидат медицинских наук, руководитель отделения клинической фармакологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: l_lyubasovskaya@oparina4.ru

<https://orcid.org/0000-0002-7456-9940>

Шубина Екатерина (Jekaterina Shubina) – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией биоинформатического анализа геномных данных Института репродуктивной генетики

E-mail: e_shubina@oparina4.ru

<https://orcid.org/0000-0003-4383-7428>

Трофимов Дмитрий Юрьевич (Dmitry Yu. Trofimov) – доктор биологических наук, профессор РАН, директор института репродуктивной генетики

E-mail: molgen@bk.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1569-8486>

Мелкумян Алина Рантиковна (Alina R. Melkumyan) – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории микробиологии отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии

E-mail: alinamelkumyan@yandex.ru

<https://orcid.org/0000-0002-5494-415X>

Зубков Виктор Васильевич (Viktor V. Zubkov) – доктор медицинских наук, директор института неонатологии и педиатрии

E-mail: v_zubkov@oparina4.ru

<https://orcid.org/0000-0001-8366-5208>

ЛИТЕРАТУРА

1. Fitzgibbon G., Mills K.H.G. The microbiota and immune-mediated diseases: opportunities for therapeutic intervention // *Eur. J. Immunol.* 2020. doi: 10.1002/eji.201948322.

2. Quigley E.M.M. Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017. Vol. 17, N 12. P. 94.

3. Milani C., Duranti S., Bottacini F. et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications

of the infant gut microbiota // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2017. Vol. 81, N 4. P. e00036-17.

4. Gronlund M.M., Arvilommi H., Kero P. et al. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months // *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal.* 2000. Vol. 83, N 3. P. 186–192.

5. Щербakov П.Л., Нижевич А.А., Логиновская В.В. и др. Микрoэкология кишечника у детей и ее нарушения // Фарматека. 2007. № 14. С. 28–34.
6. Припутневич Т.В., Исаева Е.Л., Муравьева В.В. и др. Микрoбиота кишечника здоровых новорожденных детей: новые технологии диагностики – новый взгляд на процесс становления // Вестник РГМУ. 2019. № 5. С. 109–115.
7. Беляева И.А., Бомбарди́рова Е.П., Турти Т.В. и др. Кишечная микрoбиота у недоношенных детей – современное состояние проблемы (обзор литературы) // Педиатрическая фармакология. 2015. Т. 12, № 3. С. 296–303.
8. Neu J., Douglas-Escobar M., Lopez M. Microbes and the developing gastrointestinal tract // Nutr. Clin. Pract. 2007. Vol. 22. P. 174–182.
9. Brooks B., Firek B.A., Miller C.S. et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants // Microbiome. 2014. Vol. 2. P. 1.

10. Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L. et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry // J. Clin. Microbiol. 2012. Vol. 50. P. 3093–3095.
11. Припутневич Т.В., Мелкумян А.Р. Масс-спектрометрия новое слово в клинической микрoбиологии // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. Т. 61, № 12. С. 842–848.
12. Методические рекомендации «Микрoбиологическая диагностика дисбактериоза кишечника». М., 2007.
13. Altschul S., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // J. Mol. Biol. 1990. Vol. 215, N 3. P. 403–410.
14. Lawley B., Munro K., Hughes A. et al. Differentiation of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* and *infantis* by quantitative PCR using functional gene targets // PeerJ. 2017. Vol. 5. P. e3375.

REFERENCES

1. Fitzgibbon G., Mills K.H.G. The microbiota and immune-mediated diseases: opportunities for therapeutic intervention. Eur J Immunol. 2020. doi: 10.1002/eji.201948322.
2. Quigley E.M.M. Microbiota-brain-gut axis and neurodegenerative diseases. Curr Neurol Neurosci Rep. 2017; 17 (12): 94.
3. Milani C., Duranti S., Bottacini F., et al. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. Microbiol Mol Biol Rev. 2017; 81 (4): e00036-17.
4. Gronlund M.M., Arvilommi H., Kero P., et al. Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 2000; 83 (3): 186–92.
5. Shcherbakov P.L., Nizhevich A.A., Loginovskaya V.V., et al. Microecology of the intestines in children and its disorders. Farmateka. 2007; (14): 28–34. (in Russian)
6. Pripudnevich, T.V., Isaeva, E.L., Muravieva, V.V., et al. Gut microbiota of healthy newborns: New diagnostic technologies – New outlook on the development process. Bulletin of Russian State Medical University. 2019; 9 (5): 99–104. (in Russian)
7. Belyaeva I.A., Bombardirova E.P., Turti T.V., et al. Intestinal microbiota in premature children – the modern state of the problem (literature analysis).

Pediatricheskaya farmakologiya [Pediatric Pharmacology]. 2015; 12 (3): 296–303. (in Russian)
8. Neu J., Douglas-Escobar M., Lopez M. Microbes and the developing gastrointestinal tract. Nutr Clin Pract. 2007; 22: 174–82.
9. Brooks B., Firek B.A., Miller C.S., et al. Microbes in the neonatal intensive care unit resemble those found in the gut of premature infants. Microbiome. 2014; 2: 1.
10. Theel E.S., Schmitt B.H., Hall L., et al. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2012; 50: 3093–5.
11. Pripudnevich T.V., Melkumyan A.R. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]. 2016; 61 (12): 842–8. (in Russian)
12. Methodical recommendations «Microbiological diagnosis of intestinal dysbiosis». Moscow, 2007. (in Russian)
13. Altschul S., Gish W., Miller W., et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990; 215 (3): 403–10.
14. Lawley B., Munro K., Hughes A., et al. Differentiation of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* and *infantis* by quantitative PCR using functional gene targets. PeerJ. 2017; 5: e3375.