

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НЕТИПИЧНОГО БАКТЕРИАЛЬНОГО ВИДА *STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS*, ВЫЗВАВШЕГО АБСЦЕСС ГОЛОВНОГО МОЗГА, СЕКВЕНИРОВАНИЕМ ПО СЭНГЕРУ ГЕНА 16S РРНК ИЗ ДНК ОБРАЗЦА ГНОЯ

М. А. Гордукова¹✉, Ю. В. Дивилина¹, О. В. Мишукова², Е. В. Галеева¹, А. П. Продеус¹, М. Л. Филипенко²

¹ Клиническая диагностическая лаборатория, Детская городская клиническая больница № 9 им. Г. Н. Сперанского, Москва

² Лаборатория фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Представлено описание клинического случая: наблюдали девочку в возрасте 14 лет 11 мес с абсцессом головного мозга, для которого не удалось установить возбудителя стандартными микробиологическими методами. До и в течение периода госпитализации у ребенка отсутствовала лихорадка, а многие антибиотики вызывали аллергические реакции, в связи с чем диагностика и терапия инфекции были затруднены. Пациентке были выполнены три операции. Четырежды производили посев гноя из абсцесса, но ни разу не наблюдали роста культуры. Дважды проводили ПЦР-анализ, но в обоих случаях результаты исследования были отрицательными. Тогда был амплифицирован и секвенирован по Сэнгеру ген 16S рРНК из образца ДНК, экстрагированной из гноя. С помощью программы BLAST была показана высокая гомология (99 %) определенной последовательности с последовательностью гена 16S рРНК бактерии *Streptococcus intermedius* (штамм ChDC B589, KF733728.1), для которой ранее была описана роль в развитии абсцессов головного мозга. Терапия *ex juvantibus* против этого микроорганизма, начатая еще до получения результатов секвенирования, привела к положительной динамике и купированию процесса у ребенка. Таким образом, в отдельных случаях секвенирование может являться практически единственным способом идентификации потенциального возбудителя.

Ключевые слова: абсцесс головного мозга, *Streptococcus intermedius*, 16S рРНК, секвенирование по Сэнгеру, лабораторная диагностика

✉ **Для корреспонденции:** Гордукова Мария Александровна
Шмитовский пр-д, д. 29, г. Москва, 123317; ma.gordukova@dgkb-9.ru

Статья получена: 04.07.2017 Статья принята к печати: 04.08.2017

IDENTIFICATION OF THE ATYPICAL BACTERIAL STRAIN *STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS* THAT CAUSED BRAIN ABSCESS IN THE PATIENT USING SANGER SEQUENCING OF THE 16S RRNA GENE FROM THE DNA EXTRACTED FROM A PUS SAMPLE

Gordukova MA¹✉, Divilina YuV¹, Mishukova OV², Galeeva EV¹, Prodeus AP¹, Filipenko ML²

¹ Clinical Diagnostic Laboratory, Speransky Children's Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russia

² Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

In this article we present a clinical case of brain abscess in a girl aged 14 years and 11 months caused by a pathogen that could not be identified by routine microbiological testing. Before admission and during her stay in the hospital, the teenager did not have fever. Diagnosis and treatment were impeded by allergic responses to a wide range of antibiotics. The patient underwent three surgical interventions. Pus culture was performed 4 times, showing no growth. A PCR assay was run twice, but both times the results came out negative. Therefore, a decision was made to amplify and Sanger-sequence the 16S rRNA gene from the DNA extracted from patient's pus. BLAST showed a 99 % homology of the obtained nucleotide sequence to the sequence of the 16S rRNA gene of *Streptococcus intermedius* (strain ChDC B589, KF733728.1) which had been previously shown to play a role in brain abscess development. Treatment *ex juvantibus* against the pathogen was started before sequencing results were available. The patient responded positively, the symptoms were alleviated and the condition improved. Thus, we conclude that in some cases sequencing may be the only diagnostic technique capable of identifying the pathogen.

Keywords: brain abscess, *Streptococcus intermedius*, 16S rRNA, Sanger sequencing, laboratory diagnosis

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria Gordukova
Shmitovskiy proezd, d. 29, Moscow, Russia, 123317; ma.gordukova@dgkb-9.ru

Received: 04.07.2017 Accepted: 04.08.2017

Первым шагом в борьбе с инфекционным заболеванием является быстрое и точное определение одного или нескольких патогенов, являющихся причиной инфекции. Идентификация возбудителей способствует выбору наиболее эффективной антибиотикотерапии не только при клинических синдромах, таких как сепсис, но также и в случае инфекций, вызванных множественными патогенами, например инфекций верхних дыхательных путей.

Как правило, методы идентификации и выявление устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам в большинстве микробиологических лабораторий основаны на культивировании микроорганизмов. Такие подходы затратны по времени и не всегда эффективны для труднокультивируемых микроорганизмов и для микроорганизмов с ослабленной жизнеспособностью, например в результате лекарственной терапии. Современное молекулярное тестирование позволяет идентифицировать большое число патогенов с высокой специфичностью и чувствительностью напрямую из клинических образцов [1].

Перечень выявляемых с помощью доступных тест-систем возбудителей ограничен наиболее частыми бактериальными видами, поэтому иногда мы наблюдаем признаки инфекции при наличии отрицательных результатов культуральных и молекулярно-генетических тестов. Для таких случаев еще в начале 1990-х гг. был предложен подход, включающий амплификацию на ДНК клинического образца или чистой бактериальной культуры фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК, определение его нуклеотидной последовательности и идентификацию бактерии на основании анализа полученной последовательности, а также ее сравнения с последовательностями, описанными для известных патогенов [2].

Использование гена 16S рРНК в качестве мишени для идентификации бактерий возможно за счет его наличия у всех бактерий и его высокой консервативности [3]. Высококонсервативные участки перемежаются вариabельными областями, их комбинации видоспецифичны. Амплификация гена 16S рРНК выполняется с помощью олигонуклеотидных праймеров, соответствующих консервативным участкам гена [4]. Бактерии могут быть идентифицированы путем анализа нуклеотидной последовательности продукта полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим сравнением этой последовательности с известными последовательностями, хранящимися в базе данных, например RiboDB. К настоящему времени описаны десятки тысяч нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК разнообразных бактериальных видов.

Амплификация и секвенирование гена 16S рРНК возможны для ДНК, полученной как из клинических образцов, так и из бактериальных изолятов, в тех случаях, когда список потенциальных возбудителей достаточно длинный. Метод также может быть применен для обнаружения бактерий, которые трудно культивировать, или при работе с клиническими образцами от пациентов, получавших антибиотики [5–7]. Некоторые исследователи использовали его для анализа образцов спинномозговой жидкости, гноя, жидкости в суставах и тканей [8]. Например, Xia и соавт. [9] секвенировали ген 16S рРНК одновременно с проведением стандартного анализа бактериальной культуры для выявления инфекционных агентов у пациентов с пневмониями. С помощью секвенирования были идентифицированы бактерии родов *Prevotella*, *Proteus*, *Aquabacter* и *Sphingomonas*, которые не были обнаружены при стандартном исследовании. Бактерии 7 видов —

Streptococcus, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* и *Klebsiella* — были обнаружены обоими методами, но метод секвенирования гена 16S рРНК обладал значительно большей чувствительностью при обнаружении бактерий родов *Streptococcus* и *Pseudomonas*. В работе Daroy и соавт. [10] секвенирование гена 16S рРНК позволило выявить бактерии *Haemophilus influenzae*, *Sphingomonas* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Morganella morganii*, *Mycobacterium* sp., *Chryseobacterium* sp., *Pseudomonas saccharophila* (*Xanthomonas*) и грибы *Phaeoacremonium inflatipes* в 19 образцах слезной жидкости пациентов с инфекциями глаз, хотя для всех из них были получены отрицательные результаты при культуральном исследовании.

Нами описан клинический случай идентификации патогена, вызвавшего абсцесс головного мозга, амплификацией и секвенированием гена 16S рРНК.

Описание клинического случая

В Детской городской клинической больнице № 9 им. Г. Н. Сперанского (Москва) с 6 июня по 15 июля 2016 г. находилась на стационарном лечении девочка в возрасте 14 лет 11 мес. с диагнозом «абсцесс головного мозга». Отсутствие лихорадки до и в течение периода госпитализации и постоянные аллергические реакции на различные антибиотики затрудняли как диагностику инфекции (в связи с этим ребенок был достаточно поздно госпитализирован), так и терапию.

С января 2016 г. девочку беспокоили боли в правом ухе, с 25 мая она перенесла правосторонний острый средний катаральный отит. После вызова бригады скорой медицинской помощи была доставлена в стационар из-за тошноты и рвоты, не лихорадила. На следующий день развились ригидность затылочных мышц и симптомы Кернига, верхний и нижний симптомы Брудзинского и атаксия. Была проведена компьютерная томография головного мозга, которая выявила абсцесс правой гемисферы с перифокальным отеком.

7 июня ребенку была выполнена трепанация черепа, дренирование абсцесса головного мозга правой теменной области, удалено 2 мл гноя, поставлен дренаж, назначена антибиотикотерапия. После введения ванкомицина развилась аллергическая сыпь, и препарат был отменен с заменой на комбинированную антибиотикотерапию меропенемом в дозе 2 г/сут. и линезолидом в дозе 600 мг каждые 12 ч. 9 июня возникла аллергическая реакция на линезолид: тошнота, рвота, затруднение дыхания. Этот препарат был заменен на амикацин в дозе 400 мг дважды в день. 13 июня был удален дренаж, а с 19 июня по просьбе матери ребенка было прекращено введение меропенема из-за аллергических реакций.

21 июня была проведена контрольная КТ с контрастным усилением, которая выявила рецидив абсцесса в смежных отделах головного мозга. Был назначен цефепим в дозе 2 г трижды в день и метронидазол внутривенно по 0,5 г/сут. В тот же день была проведена повторная операция, при которой было эвакуировано 20 мл гноя. Ребенок не лихорадил. Отделяемого по дренажу не было. 25 июня — снова операция, эвакуировано 12 мл гноя. Субфебрилитета не было. К цефепиму и метронидазолу был добавлен ванкомицин, а с 30 июня — цефотакс в дозе 2 г трижды в день вместо цефепима. Таким образом, за

время нахождения в стационаре ребенку были выполнены 3 операции по удалению содержимого абсцесса.

Четыре посева гноя из абсцесса не показали роста культуры ни в одном случае. Результаты биохимических анализов крови с определением содержания С-реактивного белка и скорости оседания эритроцитов приведены в таблице.

Дважды, 14 и 22 июня, на ДНК и кДНК из содержимого абсцесса головного мозга был проведен ПЦР-анализ для определения вируса простого герпеса I и II типа, цитомегаловируса, вируса Эпштейн–Барра, вируса простого герпеса VI типа, энтеровирусов, *Toxoplasma gondii*, *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулоноггативных штаммов *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* и *Streptococcus spp.* Оба раза результаты были отрицательными. При этом внутренним контролем в данном наборе реагентов служил ген актина, и по этой мишени кривая амплификации пересекала линию трешхолда при Ct = 23,39, что свидетельствовало о нормальном качестве ДНК, экстрагированной из гноя.

Образец ДНК был передан в лабораторию фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск) для амплификации фрагмента гена 16S рНК. В результате секвенирования была получена нуклеотидная последовательность, включавшая высоковариабельные участки гена v2–v4. Сравнительный анализ полученной нуклеотидной последовательности с использованием программы BLAST (NCBI, США) показал высокую гомологию (99 %) с последовательностью гена 16S рНК бактерии *Streptococcus intermedius* (штамм ChDC B589, KF733728.1).

Обсуждение клинического случая

В научной литературе и международных клинических рекомендациях описана роль комменсала *Streptococcus intermedius* в развитии абсцессов головного мозга [11]. Также описан случай абсцесса ГМ у пожилой женщины, посева аспириата из которого не приводили к росту культуры, а инфекционный агент, как и в описываемом нами случае, был установлен с помощью секвенирования гена 16S рНК [12]. *Streptococcus intermedius* и *Streptococcus constellatus* составляют группу, которую в зависимости от применяемой классификации иногда называют *Streptococcus milleri* group, демонстрируют серологическое и гемолитическое разнообразие, обладают разной иммуногенностью. Вероятно, *S. intermedius* в данном случае не запустил развитие адекватного иммунного ответа у пациентки, что привело к отсутствию как лихорадки, так и маркеров воспаления (таблица). Соответственно, никакие методы лабораторной диагностики, имеющиеся в распоряжении многопрофиль-

ного стационара, не могли помочь в установлении этиологии заболевания, кроме примененного нами секвенирования по Сэнгеру.

Ошибочные результаты ПЦР-анализа были связаны, вероятно, с отсутствием данного референсного штамма у разработчиков использованного набора реагентов. Терапия *ex juvantibus* против *S. intermedius*, начатая еще до получения результатов секвенирования, привела к положительной динамике и купированию процесса у ребенка, что стало косвенным подтверждением данных секвенирования. Таким образом, описанный клинический случай указывает на то, что в случае дискордантных результатов двух молекулярных методов — ПЦР и секвенирования по Сэнгеру — стоит опираться на второй как на «золотой стандарт» в молекулярной биологии.

Выводы

Амплификация и полное секвенирование гена 16S рНК или секвенирование его фрагментов непосредственно из клинических образцов имеет свои ограничения. В качестве образца для анализа является предпочтительным материал из стерильных локусов. При полимикробных инфекциях или взятии материала из нестерильных локусов обычно возникают трудности с интерпретацией результатов секвенирования. Кроме того, даже получение ампликона ДНК микроорганизма из клинического образца необязательно свидетельствует о том, что именно идентифицированный организм является возбудителем инфекции. Секвенирование гена 16S рНК — трудоемкая процедура, требующая хорошего оснащения лаборатории и высокой квалификации персонала. Тем не менее в отдельных случаях данный метод может являться практически единственным способом идентификации потенциального патогена. В приведенном клиническом случае секвенирование гена 16S рНК позволило выявить нетипичный бактериальный вид, а анализ доступных литературных данных позволил предположить его этиологическую роль в развитии абсцесса мозга и предположить причины нетипичного течения заболевания.

Содержание С-реактивного белка (СРБ) и скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по результатам нескольких биохимических анализов крови пациента

Дата	СРБ, мг/л	СОЭ, мм, ч
07.06.2016	55,8	–
14.06.2016	3,1	46
20.06.2016	2,2	–
27.06.2016	0,9	–
01.07.2016	0,6	19
12.07.2016	0,5	19

Примечание. СРБ в норме — 0,1–8,2 мг/л; СОЭ в норме — 0–20 мм/ч. Полужирным выделены значения показателей за пределами нормы.

Литература

- Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* 2008 Sep; 197 (3): 313–24. DOI: 10.1007/s00430-007-0063-0.
- Bruce IJ. Nucleic acid amplification mediated microbial identification. *Sci Prog.* 1993–1994; 77 (Pt 3–4): 183–206.
- Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987 Jun; 51 (2): 221–71.
- Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science.* 1999 May 21; 284 (5418): 1308–10.
- Schmidt TM, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured

- pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 205–22.
6. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan; 14 (1): 177–207. DOI: 10.1128/CMR.14.1.177-207.2001.
 7. Harris KA, Fidler KJ, Hartley JC, Vogt J, Klein NJ, Monsell F et al. Unique case of *Helicobacter* sp. osteomyelitis in an immunocompetent child diagnosed by broad-range 16S PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3100–3.
 8. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003 Aug; 52 (Pt 8): 685–91. DOI: 10.1099/jmm.0.05213-0.
 9. Xia LP, Bian LY, Xu M, Liu Y, Tang AL, Ye WQ. 16S rRNA gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15; 8 (10): 18560–70.
 10. Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, Loy MJ, Tuano PM, Matias RR. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May; 17 (5): 776–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03369.x.
 11. Mishra AK, Fournier PE. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr; 32 (4): 477–83. DOI: 10.1007/s10096-012-1782-8.
 12. Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J et al. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. *Intern Med.* 2012; 51 (2): 211–6.

References

1. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* 2008 Sep; 197 (3): 313–24. DOI: 10.1007/s00430-007-0063-0.
2. Bruce IJ. Nucleic acid amplification mediated microbial identification. *Sci Prog.* 1993–1994; 77 (Pt 3–4): 183–206.
3. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev.* 1987 Jun; 51 (2): 221–71.
4. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science.* 1999 May 21; 284 (5418): 1308–10.
5. Schmidt TM, Relman DA. Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 205–22.
6. Brouqui P, Raoult D. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jan; 14 (1): 177–207. DOI: 10.1128/CMR.14.1.177-207.2001.
7. Harris KA, Fidler KJ, Hartley JC, Vogt J, Klein NJ, Monsell F et al. Unique case of *Helicobacter* sp. osteomyelitis in an immunocompetent child diagnosed by broad-range 16S PCR. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug; 40 (8): 3100–3.
8. Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003 Aug; 52 (Pt 8): 685–91. DOI: 10.1099/jmm.0.05213-0.
9. Xia LP, Bian LY, Xu M, Liu Y, Tang AL, Ye WQ. 16S rRNA gene sequencing is a non-culture method of defining the specific bacterial etiology of ventilator-associated pneumonia. *Int J Clin Exp Med.* 2015 Oct 15; 8 (10): 18560–70.
10. Daroy ML, Lopez JS, Torres BC, Loy MJ, Tuano PM, Matias RR. Identification of unknown ocular pathogens in clinically suspected eye infections using ribosomal RNA gene sequence analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2011 May; 17 (5): 776–9. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03369.x.
11. Mishra AK, Fournier PE. The role of *Streptococcus intermedius* in brain abscess. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013 Apr; 32 (4): 477–83. DOI: 10.1007/s10096-012-1782-8.
12. Saito N, Hida A, Koide Y, Ooka T, Ichikawa Y, Shimizu J et al. Culture-negative brain abscess with *Streptococcus intermedius* infection with diagnosis established by direct nucleotide sequence analysis of the 16s ribosomal RNA gene. *Intern Med.* 2012; 51 (2): 211–6.