

ГЕНОМ *Staphylococcus epidermidis* ИЗ КАЗЕОЗНОГО НЕКРОЗА ТУБЕРКУЛЕМЫ

© 2024 В. В. Синьков¹, Е. А. Орлова¹, О. Б. Огарков^{1, *}, А. Е. Суздальницкий^{2, 3},
И. Г. Кондратов¹, Н. Л. Белькова¹, Л. В. Рычкова¹, Л. И. Колесникова¹

¹Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, 664003 Россия

²Иркутская областная клиническая туберкулезная больница, Иркутск, 664039 Россия

³Иркутский государственный медицинский университет, Иркутск, 664003 Россия

*e-mail: obogarkov@mail.ru

Поступила в редакцию 02.04.2024 г.

После доработки 23.04.2024 г.

Принята к публикации 06.05.2024 г.

Ряд факультативно-анаэробных липофильных микроорганизмов, включая представителей *Corynebacterium* и *Staphylococcaceae*, обитают в некротическом содержимом туберкулем. Проведено выделение из казеума штамма *Staphylococcus epidermidis*, его полногеномное секвенирование и картирование генов. Выявили, что коагулазонегативный стафилококк относится к генотипу MLST 73 и устойчив к двум противотуберкулезным препаратам. Фенотипически штамм обладает уреазной, желатиназной и бета-гемолитической активностью и имеет соответствующие гены. Как и у *S. epidermidis* O47, его геном состоит из одной хромосомы, содержащей около 2.4 млн пар нуклеотидов, а *oriC* имеет такую же ориентацию. Всего было идентифицировано 2333 гена, из которых 2206 были кодирующими. В контигах изученного генома обнаружены последовательности генов репликации плазмид: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* и *pSK1*. Филогенетический анализ указывает на близость анализируемого генома с большой группой европейских штаммов. Учитывая биохимические и микробиологические свойства выделенного штамма, мы предполагаем, что стафилококки и другие факультативно-анаэробные микроорганизмы-сателлиты туберкулезных очагов могут играть важную роль в разжижении казеозного некроза за счет собственной протеолитической активности и привлечения нейтрофилов к очагу воспаления.

Ключевые слова: туберкулема, *Staphylococcus epidermidis*, картирование генов вирулентности.

DOI: 10.31857/S0016675824100139 **EDN:** WEFYLG

Микробиота глубоких отделов легких сильно отличается от микробиоты верхних дыхательных путей гораздо более низкой биомассой и динамическим разнообразием [1]. Внутри туберкулезного очага происходит резкое снижение биоразнообразия сателлитной микробиоты [2]. Полученные нами метагеномные данные позволили разделить исследуемые сообщества микроорганизмов туберкулезных очагов на два типа: (i) — микобактериальная казеома (туберкулема), в которой 70% и более геномов соответствует микобактериям туберкулеза, и (ii) — полимикробное сообщество, в котором концентрация микобактерий туберкулеза варьирует от 0 до 10% [3]. При этом в одном из казеумов (некротический центр туберкулезного очага) было выявлено преобладание представителей семейства *Staphylococcaceae* [3]. Туберкулема является наиболее часто встречающейся патологической формой при туберкулезе легких и квалифицируется как объемное казеозно-некротическое образование,

отграниченное от прилежащей ткани капсулой. Культивирование пяти казеозных образцов из туберкулем (отличных от использованных в настоящем исследовании) при пониженном парциальном давлении кислорода позволило нам выделить и идентифицировать по результатам полногеномного секвенирования липофильную *Corynebacterium kefirresidentii* [4]. Выделение из туберкулезных некротических очагов липофильных факультативно-анаэробных бактерий вместе с результатами метагеномных исследований [2–4] свидетельствует о вероятной роли нетуберкулезной сателлитной микрофлоры в процессах разжижения казеозного некроза. Это может иметь важное патофизиологическое значение и, вероятно, должно рассматриваться как неблагоприятный исход при туберкулезе легких. Мы предполагаем, что микробное сообщество туберкулезного очага формируется в результате изоляции иммунной системой пациента вместе с возбудителем туберкулеза [5] других бактерий

из нижних дыхательных путей. При этом условия внутри туберкулезного очага создают возможности для развития преимущественно факультативно-анаэробной липофильной микробиоты.

Цель настоящего исследования — выделение и полногеномное секвенирование представителя *Staphylococcaceae* как одного из наиболее распространенных сателлитных обитателей казеозного некроза в очагах при туберкулезе легких.

Настоящее исследование одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ. Все образцы операционного материала были получены во время операций по иссечению туберкулем.

Образцы помещались в 50-миллилитровую стерильную пластиковую пробирку в условиях операционной и затем хранились при температуре -80°C до момента исследования. После медленного оттаивания при 4°C максимально доступное количество некротического материала из туберкулезного очага помещали в стерильные пробирки с 5-ю мл LB (Luria-BertaniMedium, BD Difco) под

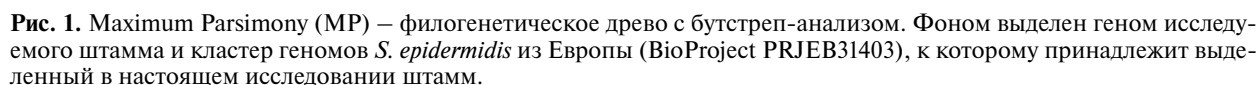
вазелиновым маслом. Через две недели 100 мкл осадка засеивали газоном на чашку Петри с LB-агаром (BD Difco). Инкубацию проводили при 37°C в течение трех дней в инкубационном контейнере BD GasPak EZ с AnaeroGasPac (Россия) до образования видимых колоний бактерий. Один штамм из образца 2206 дал стабильный и воспроизводимый рост на чашках Петри.

Штамм 2206-2 был первично идентифицирован с помощью секвенирования по Сэнгеру генов *16S rPHK* и *rpoB*. Для амплификации и секвенирования по Сэнгеру гена *rpoB* рода *Staphylococcus* были использованы праймеры 1418st F: 5'-ATCTCAATTYATGGACCAAGC, 3241st R: 5'-GCTACGTGTTCCATACCTGT [6], а также универсальные бактериальные праймеры для гена *16S rPHK* EUB27 L: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG и EUB518 R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG [7]. Идентичность по генам *rpoB* и *16S rPHK* с видами *S. epidermidis* образца 2206-2 и составила 100% (GenBank accession numbers: 2206-2 *16S* rRNA OP893659, *rpoB* OP893660).

Таблица 1. Сводная таблица биохимических и микробиологических свойств выделенного штамма

Параметры	2206-2	Параметр	2206-2
STAPHYtest 16 (ErbaLachema)		Sensititre RAPMYCO	
VPT Acetoin	yes	Trimethoprim	Res
H Urease URE	yes	Ciprofloxacin	Sus
G Arginine ARG	no	Moxifloxacin	Sus
F Ornithine ORN	no	Cefoxitin	Sus
E β -GalactosidasebGA	no	Amikacin	Sus
D β -Glucuronidase GLR	no	Doxycycline	Sus
C Esculin ESL	no	Tigecycline	Sus
B Nitrate NIT	no	Clarithromycin	Res
A Phosphatase PHS	no	Linezolid	Sus
H Galactose GAL	yes	Imipenem	Sus
G Sacharose SUC	yes	Cefepime	Sus
F Trehalose TRE	no	Amoxicillin	Sus
E Mannitol MAN	no	Ceftriaxone	Sus
D Xylose XYL	no	Minocycline	Sus
C Maltose MLT	yes	Tobramycin	Sus
B Mannose MNS	yes	Sensititre SLOWMYCO	
A Lactose LAC	yes	Rifabutin	Sus
Микробиологические тесты		Ethambutol	Res
Gelatinase	yes	Isoniazid	Res
Coagulase	no	Rifampin	Sus
Hemolysis	yes (β -type)	Streptomycin	Sus
Lipase	no	Ethionamide	Sus

Примечание. Sus — susceptibility (чувствительность), Res — resistance (устойчивость).



в сборке, проводилась с помощью программного пакета SqueezeMeta. Гены факторов вирулентности определяли программой Vfanalyzer. Предсказание oriC в исследуемом геноме осуществлялось с использованием программы Ori-Finder 2. Для определения нуклеотидных последовательностей плазмидных генов репликации использовали программу PlasmidFinder.

Таблица 2. Обнаруженные гены факторов вирулентности

Группа факторов вирулентности	Фактор вирулентности	Соответствующий ген [9]	2206-2 рамка считывания
Adherence	Autolysin	<i>atl</i>	orf01481
	Cell wall associated fibronectin binding protein	<i>ebh</i>	orf00155
	Elastinbindingprotein	<i>ebp</i>	orf00118
	Ser-Asp rich fibrinogenbinding proteins	<i>sdrF</i>	orf01195
		<i>sdrG</i>	orf00844
		<i>sdrH</i>	orf01386
Enzyme	Cysteineprotease	<i>sspB</i>	orf01711
	Lipase	<i>geh</i>	orf01204
		<i>lip</i>	orf02238
	Serine V8 protease	<i>sspA</i>	orf02100
	Thermonuclease	<i>nuc</i>	orf00275
Toxin	Betahemolysin	<i>hly</i>	orf01227

Биоинформационный поиск потенциальной множественной устойчивости к антибиотикам осуществляли программами ResFinder 4.1 и CARD 3.2.9 (<https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>). Филогенетическое древо построено программой IQ-TREE с 1000 итераций. Биохимические свойства штамма изучали с использованием биохимических тест-систем «STAPHY test 16» (Erba Lachema s. r. o., Чехия). Липазную активность определяли посевом на сердечно-мозговой агар (HIMEDIA, Индия) с добавлением 1%-ного Tween-80 и 10 мМ CaCl₂, как описано ранее [4]. Фенотипическая устойчивость к антибиотикам против микобактерий определялась с помощью тест-систем TREK Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific (США) RAPMYCO для быстрорастущих и SLOWMYCO для медленно растущих микобактерий по протоколам производителя.

Штамм относится к коагулазонегативным стафилококкам (табл. 1). Обращает на себя внимание фенотипическая устойчивость к двум противотуберкулезным препаратам, а также уреазная, желатиназная и гемолитическая активности. По результатам секвенирования по Сэнгеру и полногеномного секвенирования, штамм относится к MLST 73 [8] — достаточно широко распространенный в мире генотип у людей, но не встречавшийся ранее в России. Так же как и у *S. epidermidis* O47 [9], его геном состоит из одной хромосомы, содержащей около 2.4 млн п. н., а *oriC* имеет ту же направленность. В общей сложности были идентифицированы 2333 гена, из которых 2206 являлись кодирующими. В контигах исследуемого генома обнаружены последовательности плазмидных репликационных генов: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* и *pSK1*. Визуально при

электрофорезе тотальной ДНК наблюдались три дискретные (отличные от геномной) полосы, которые могут быть плазмидами (данные не приводятся). Биоинформационный анализ, выполненный программами ResFinder 4.1 и CARD 3.2.9, предполагает множественную лекарственную устойчивость исследуемого штамма к широкому кругу антибиотиков, включая макролиды, за счет наличия генов *fosB*, *msr(A)*, *mph(C)* и *tet(K)*, с большой вероятностью кодируемых плазмидами.

На рис. 1 приведено МР филогенетическое древо 180 геномов *S. epidermidis* из NCBI и генома выделенного штамма. Затемнением выделен кластер геномов *S. epidermidis* из Европы (BioProject PRJEB31403). Таким образом, выделенный штамм *S. epidermidis* обладал весьма умеренной токсичностью и вирулентностью (табл. 2), продуцировал биофильм при культивировании на жидкой среде, был крайне устойчив к различным химическим воздействиям (данные не приводятся) и обладал множественной лекарственной устойчивостью, включая устойчивость к этамбутолу и изониазиду.

Мы предполагаем, что микробное сообщество легких в силу своего непостоянства и транзиторного характера попадает внутрь туберкулезного очага в известной мере случайно. Однако попадание липофильных факультативно-анаэробных бактерий может драматическим образом изменять организацию некротического содержимого туберкулезного очага. По всей видимости, благоприятное течение связано со “стерильной” кальцификацией некроза, в рамках которой никакая посторонняя микробиота внутри казеоза не размножается. Микобактерии туберкулеза в анаэробных условиях казеума

остаются жизнеспособными, но теряют способность к размножению, при этом они демонстрируют чрезвычайную толерантность к противотуберкулезным препаратам [10].

Можно также предполагать, что в некротическом содержимом способна развиваться “патологическая сукцессия”, когда к бактериям с высокой активностью липаз [4] присоединяются другие бактерии, имеющие в том числе коллагеназную (желатиназа) активность, например стафилококки. Разрушение коллагеновой стромы легкого является необратимым процессом, ведущим в конечном итоге к образованию каверн. Мы ожидаем, что выделенные нами из казеума туберкулем липофильные факультативно-анаэробные микроорганизмы в дальнейшем могут послужить источником биологически активных веществ с адьювантными и/или иммуномодулирующими свойствами, пригодными для создания специфических иммунологических препаратов, в том числе для усиления эффекта субъединичных вакцин, разрабатываемых для профилактики туберкулеза. В пользу этой возможности говорит многолетняя и успешная история исследования грамположительной анаэробной палочки *Corynebacterium parvum*, которая принадлежит к нормальной микробиоте кожи [11].

Настоящая работа выполнена при участии группы геномных исследований и биоинформационного анализа ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ с использованием оборудования ЦКП “Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья” ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РНФ 23-15-00280.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта людей и животных.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Natalini J.G., Singh S., Segal L.N. The dynamic lung microbiome in health and disease. // Nat. Rev. Microbiol. 2023. V. 21. P. 222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>
2. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Кондратов И.Г. и др. Анализ разнообразия и функционального потенциала бактериальных сообществ туберкулезных очагов // Клеточ. техн. в биол. и медицине. 2024. № 1. С. 29–36. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2024-1-29-36>. Cell Technologies in Biology and Medicine 2024. № 1. С. 29–36.)
3. Орлова Е.А., Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е. и др. Анализ микробного разнообразия казеозного некроза туберкулезных очагов // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2021. Т. 39. № 3. С. 18–24. <https://doi.org/10.17116/molgen20213903118> <https://doi.org/10.3103/S0891416821030058>
4. Огарков О.Б., Суздальницкий А.Е., Кондратов И.Г. и др. Выделение и полногеномное секвенирование липофильной анаэробной бактерии, представителя видового комплекса *Corynebacterium tuberculo-stearicum*, из туберкулезного очага // Acta Biomedica Scientifica. 2023. Т. 8. № 4. С. 12–19. <http://dx.doi.org/10.29413/ABS.2023-8.4.2>
5. Russell D.G., Cardona P.J., Kim M.J., Allain S., Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma // Nat. Immunol. 2009. V. 10. № 9. P. 943–948. <https://doi.org/10.1038%2Fni.1781>
6. Mellmann A., Becker K., von Eiff C. et al. Sequencing and staphylococci identification // Emerg. Infect. Dis. 2006. V. 12 № 2 P. 333–336. <https://doi.org/10.3201%2Fid1202.050962>
7. Sun D.L., Jiang X., Wu Q.L., Zhou N.Y. Intragenomic heterogeneity of 16S rRNA genes causes overestimation of prokaryotic diversity // Appl. Environ. Microbiol. 2013. V. 79. № 19. P. 5962–5969. <https://doi.org/10.1128/aem.01282-13>
8. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // Wellcome Open Res. 2018. V. 24. № 3. P. 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
9. Raue S., Fan S.H., Rosenstein R. et al. The Genome of *Staphylococcus epidermidis* O47 // Front. Microbiol. 2020. V. 25. № 11. <https://doi.org/10.3389%2Ffmicb.2020.02061>
10. Sarathy J.P., Dartois V. Caseum: A niche for *Mycobacterium tuberculosis* drug-tolerant persists // Clin. Microbiol. Rev. 2020. V. 33 № 3. <https://doi.org/10.1128/cmr.00159-19>
11. Palmieri B., Vadalà M., Roncati L. et al. The long-standing history of *Corynebacterium parvum*, immunity, and viruses // J. Med. Virol. 2020 V. 92. № 11. P. 2429–2439. <https://doi.org/10.1002%2Fjmv.26100>

The genome of *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Caseous Tuberculoma

V. V. Sinkov¹, E. A. Orlova¹, O. B. Ogarkov^{1,*}, A. E. Suzdalnitsky^{2, 3}, I. G. Kondratov,
N. L. Belkova¹, L. V. Rychkova¹, L. I. Kolesnikova¹

¹Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, 664003 Russia

²Irkutsk Tuberculosis-prevention hospital, Irkutsk, 664039 Russia

³Irkutsk State Medical University, Irkutsk, 664003 Russia

*e-mail: obogarkov@mail.ru

A number of facultative-anaerobic lipophilic microorganisms, including representatives of *Corynebacterium* and Staphylococcaceae, inhabit the necrotic contents of tuberculomas. A strain of *Staphylococcus epidermidis* was isolated from caseum, fully genome sequenced, and gene-mapped. The coagulase-negative *Staphylococcus* belonged to the MLST 73 genotype and was resistant to two antituberculosis drugs. The strain phenotypically had urease, gelatinase and beta-hemolytic activities and possessed the corresponding genes. Similar to *S. epidermidis* O47, its genome consists of a single chromosome containing approximately 2.4 million base pairs, and oriC has the same orientation. A total of 2333 genes were identified, of which 2206 were coding genes. In contigs of the genome, sequences of plasmid replication genes were found: *rep7a*, *rep13*, *rep5b* and *pSK1*. Phylogenetic analysis indicates the closeness of the analyzed genome with a large group of European strains. Considering the biochemical and microbiological properties of the isolated strain, we hypothesize that staphylococci and other facultative-anaerobic satellite microorganisms of tuberculosis foci may play an important role in caseum liquefaction due to their own proteolytic activity and attraction of neutrophils to the focus of inflammation.

Keywords: tuberculoma, *Staphylococcus epidermidis*, virulence gene mapping.