

Природные источники возникновения новых бактериальных патогенов и возможности их выявления

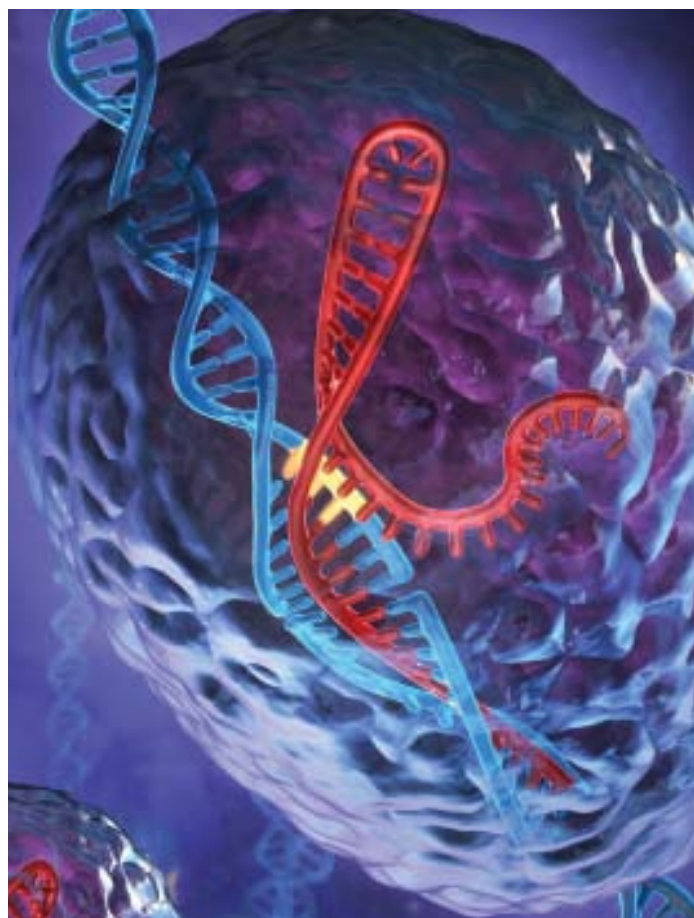
Появление новых патогенных микроорганизмов, в частности бактерий, в большинстве своем населяющих природные экосистемы и существенно превосходящих по биомассе все иные формы жизни на Земле, весьма вероятно по следующим причинам. Во-первых, это изменение климата, приводящее к проявлению «законсервированных» на многие тысячи лет, например в вечной мерзлоте, бактерий, которые могли паразитировать на древних формах жизни – разнообразных ящерах и первичных млекопитающих. Во-вторых, проникновение человека в ранее малодоступные среды – глубины океанов, горные массивы, где могут обитать неизвестные виды эукариотических организмов, имеющие собственные патогены. В-третьих, это крайне малоизученный мир микробов, существующих в глубинных слоях земли (до 5 км) и представляющих собой огромную (по последним данным, до 20 млрд тонн) биомассу бактерий, которые никогда не поднимались на поверхность Земли, имеющих собственный особый метаболизм и стратегию выживания. Кроме того, в какой-то мере следует учитывать и возможное проникновение из космоса патогенов или токсичных соединений, хотя теория панспермии не увязывается с последними исследованиями в области происхождения жизни.

Следует также учитывать, что некультивируемые в искусственных условиях формы бактерий составляют не менее 85% всех микроорганизмов, существующих в природе, и представляют собой так называемую «темную микробиологическую материю», состав и свойства которой только предстоит изучить.

Здесь мы не рассматриваем появление новых патогенов в человеческой популяции и популяциях сельскохозяйственных животных, где может происходить горизонтальный или вертикальный перенос генов вирулентности бактерий, а делаем акцент на возможности появления принципиально новых патогенов.

Исследования вечной мерзлоты на наличие новых видов бактерий и патогенов ведутся достаточно интенсивно, в том числе и нами (недавно выделены два филогенетически древних штаммов сибирской язвы), и этот процесс в достаточной мере контролируется на наличие биологических угроз.

Интенсивное использование недр в различных регионах мира создает риски выявления совершенно новых бактерий, обладающих свойствами, угрожающими человеку. Здесь есть несколько тревожных аспектов. А именно, существуют эукариоты, живущие глубоко под землей (например, нематоды – до 1,5 км), у которых с высокой вероятностью имеются



собственные адаптированные бактериальные паразиты с неизвестными свойствами и возможностями влияния на человека. В огромной массе глубинных бактерий, где происходят, в том числе, процессы конкурирования различных популяций за экологические ниши, могут встречаться виды, способные синтезировать токсичные для человека метаболиты с ферментативными или ингибиторными свойствами. Ярким примером таких молекул является ботулотоксин, вырабатываемый сапрофитным микроорганизмом.

Каковы же сегодняшние возможности для выявления принципиально новых природных патогенов? Стратегия поиска нового патогена первично должна строиться на основании зарегистрированного клинического синдрома. Основные синдромы: синдром острой диареи, синдром острой геморрагической лихорадки, острый желтушный синдром, острый неврологический синдром, острый респираторный синдром, острый дерматологический синдром, острый

офтальмологический синдром, острый «системный» синдром. Для каждого из этих синдромов существует перечень известных, вызывающих их инфекционных болезней и перечень поражающих биотоксинов. Достаточно трудно предположить, что воздействие новых патогенов будет каким-либо иным, поэтому следует положиться на существующую классификацию синдромов.

Выбор и подготовка биологических проб для последующего исследования определяются этими основными клиническими синдромами. Для каждой формы патогенного биологического агента проводится процедура выделения чистой культуры (или биологической структуры) путем посева на питательные среды, культуры клеток, куриные эмбрионы или заражение лабораторных животных. Учитывая, что многие патогены не могут быть культивированы на искусственных средах, необходимо иметь целый спектр разнообразных биомоделей – в основном трансгенных и нокаутных животных, специально созданных для определенного инфекционного заболевания или животных с низким уровнем защищенности от внешних факторов для выявления неизвестного патогена. После выделения культуры, на основе генетических и биохимических свойств, а также по риботипированию с помощью масс-протейной спектрометрии, агент относится к группе известных патогенов по роду и виду или объявляется принципиально новым. Далее определяется наличие факторов вирулентности и лекарственной устойчивости изолята.

В основном все генетические и биохимические признаки факторов вирулентности современных патогенов (бактерий, вирусов, грибов, простейших) известны и хорошо выявляются. Эффективный метагеномный анализ (быстрое массовое параллельное секвенирование всех нуклеиновых кислот в биоматериале и наличие больших вычислительных мощностей) в сочетании с доступом к объемным базам генетических данных позволит достаточно быстро выявить факторы патогенности и предпринять меры к изолированию возбудителя в культуре. Эффективное выделение культуры может быть проведено с применением сортировки клеток, вирусных частиц или отдельных молекул на основе использования меченых узкоспецифичных моноклональных антител с последующим высевом концентрированного материала на среды или заражением биомоделей – животных, культур клеток.

В случае полностью неизвестных патогенов (не несущих известных генетических и биохимических факторов патогенности) необходимо выделение суммарного пула нуклеиновых кислот из образцов пораженных органов, который включает геномы возбудителя и хозяина для последующего метагеномного секвенирования и выявления генома инфекционного агента с помощью биоинформационного анализа. При наличии соответствующих программ и вычислительных мощностей вся процедура обработки данных (вычитание из последовательностей ДНК человека, выравнивание ридов, компрессия дубликатных «прочтений» и др.) вплоть до определения нуклеиновых кислот патогена в базе данных занимает не более часа. Наибольшее значение при этом имеет создание и развитие программ, предсказывающих наличие неизвестного патогена в исследуемом материале.

Современные подходы к предсказанию патогенности основаны на двух основных направлениях: анализе последовательностей, кодирующих белки, и полногеномном анализе. Когда доступны полногеномные последовательности, присутствие/отсутствие генов, кодирующих определенные белки, может быть связано с определенным комплексным фенотипом, например патогенностью. Это утверждение основано прежде всего на наличии факторов вирулентности, которые часто передаются горизонтально, или отсутствию более часто встречаемых генов, которые становятся ненужными при эволюции патогенов из непатогенных предшественников. На сегодняшний день существуют десятки программ, которые работают на этих принципах и отличаются разной степенью достоверности обработки экспериментальных данных. Одной из них является опубликованная в 2016 г. программа PaPrBaG (Pathogenicity Prediction for Bacterial Genomes), предсказывающая патогенность для бактериальных геномов.

Текущие компьютерные программы анализа основаны на поиске сходства последовательностей неизвестного микроба с известными и не обнаруживают новые патогены в тех случаях, когда не с чем сравнивать, т.е. похожие последовательности отсутствуют в базах данных. Подход, используемый в PaPrBaG, основан на обучении компьютерной программы, т.е. программа «обучается» с использованием последовательностей нуклеиновых кислот множества известных патогенных и непатогенных для людей видов бактерий. В результате она приобретает способность предсказывать вероятность патогенных свойств («патогенный потенциал») неизвестного микроорганизма лишь на основании информации о последовательности его нуклеиновых кислот без установления сходства с известными геномами. В основе преимущества PaPrBaG лежит свойство программы работать со всеми последовательностями, в то время как текущие биоинформационные подходы отбрасывают значительную часть последовательностей как «сильно непохожих на известные». Кроме этого, программа надежно работает даже при низком покрытии генома, и ее сочетание с текущими программами повышает эффективность предсказания. С помощью моделирования показано, что программа применима и перспективна в метагеномных исследованиях.

Таким образом, решение проблемы выявления новых бактериальных патогенов в природных источниках лежит в области создания комплексной системы мониторинга за заболеваниями человека неясной этиологии с регистрацией ведущей симптоматики, выявлением подозрительного патогена методами геномного анализа на основе предсказательных биоинформационных программ, его изолирования и всесторонней оценки иммунохимических, биохимических и физиологических свойств.

И.А.Дятлов

Директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН, доктор медицинских наук, профессор