

3
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

<http://www.elmag.uran.ru>



БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Рычков П.И.



Ломоносов М.В.

2024

УЧРЕДИТЕЛЬ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ОРЕНБУРГСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
УРАЛЬСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

© Коллектив авторов, 2024

УДК. 614.2:616-036.882-036.22.

К.В. Васильева¹, С.А. Сафина¹, О.И. Сидоренко¹, П.Н. Филиппов¹,
Д.Т. Джандарова¹, Т.В. Нархова¹, Н.С. Эргашева¹, О.К. Мигяев¹,
Г.И. Спешилов², А.Т. Лейнсоо³, Т.М. Мругова¹, О.С. Готов^{1,4},
Д.Ю. Щекочихин^{5,6}, И.А. Штинова¹, О.Г. Шпакова¹, А.Г. Комаров¹

ПЕРВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СРАВНИТЕЛЬНОГО АНАЛИЗА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ НАТИВНОГО МАТЕРИАЛА И ЧИСТЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ ОТДЕЛЕНИЙ РЕАНИМАЦИИ И ИНТЕНСИВНОЙ ТЕРАПИИ

¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центр лабораторных исследований департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия.

² ООО «Научно-производственное предприятие «БИОСФЕРА», Москва, Россия.

³ Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, Москва, Россия

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального Медико-Биологического Агентства»

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова.

⁶ Городская клиническая больница № 1 имени Н.И. Пирогова.

Цель. Сравнение результатов секвенирования нативного биоматериала и выделенных из него бактериальных изолятов в группе пациентов с нозокомиальными инфекциями, вызываемыми бактериями группы ESKAPE, из отделений реанимации и интенсивной терапии Московских стационаров.

Материалы и методы. Объект исследования: 48 образцов бронхоальвеолярного лаважа от пациентов из отделений реанимации и интенсивной терапии двух московских стационаров, а также 97 образцов клинических изолятов этиологически значимых микроорганизмов, выделенных из биоматериала пациентов и подвергнутых метагеномному секвенированию гена 16S рРНК и таргетному секвенированию генов антибиотикорезистентности.

Результаты. Сравнительный анализ данных классических микробиологических методов и секвенирования показал схожие результаты. Имеющиеся отличия можно объяснить недостатками обоих методов, а также сложностью биоинформатического протокола обработки данных. Использование обоих подходов позволяет сбалансированно и наиболее полно подойти к изучению возбудителей нозокомиальных инфекций.

Заключение. Результаты секвенирования могут способствовать оптимизации назначения рациональной антибактериальной терапии нозокомиальных инфекций и будут полезны для мониторинга нозокомиальных инфекций.

Ключевые слова: нозокомиальные инфекции, микробиологический мониторинг, метагеномное секвенирование, антибиотикорезистентность, бактерии группы ESKAPE, внутрибольничный инфекционный контроль.

K.V. Vasilyeva¹, S.A. Safina¹, O.I. Sidorenko¹, P.N. Filippov¹, J.T. Dzhandarova¹, T.V. Narkhova¹, N.S. Ergasheva¹, O.K. Migyaev¹, G.I. Speshilov², A.T. Leinsoo³, T.M. Mrugova¹, O.S. Glotov^{1,4}, D.Y. Shchekochikhin^{5,6}, I.A. Shtinova¹, O.G. Shpakova¹, A.G. Komarov¹

THE FIRST RESULTS OF A COMPARATIVE ANALYSIS OF MOLECULAR GENETIC STUDIES OF NATIVE MATERIAL AND PURE CULTURES OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS IN INTENSIVE CARE UNITS

¹ State Budgetary Healthcare Institution "Moscow Scientific and Practical Laboratory Research Center of the Moscow City Health Department", Moscow, Russia

² Limited Liability Company "Scientific and Production Enterprise "BIOSPHERE", Moscow, Russia

³ Sklifosovsky Clinical and Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

⁴ Federal State Budgetary Institution "Children's Scientific and Clinical Center for Infectious Diseases of the Federal Medical and Biological Agency", St. Petersburg, Russia

⁵ First Moscow State Medical University.

⁶ No. 1 Pirogov First Moscow City Hospital.

Aim. Comparison of sequencing results of native biomaterial and bacterial isolates isolated from it in a group of patients with nosocomial infections caused by bacteria of the ESKAPE group, intensive care units and intensive care units of Moscow hospitals.

Materials and methods. The object of the study: 48 samples of bronchoalveolar lavage from patients in intensive care and intensive care units of two Moscow hospitals, as well as 97 samples of clinical isolates of etiologically significant microorganisms isolated from the patients' biome and subjected to metagenomic sequencing of the 16S rRNA gene and targeted sequencing of antibiotic resistance genes.

Results. A comparative analysis of data from classical microbiological methods and sequencing showed similar results. Some of the differences can be explained by the disadvantages of both methods, as well as the complexity of the bioinformatic data processing protocol. The use of both methods allows for a balanced and comprehensive approach to the study of the causative agents of nosocomial infections.

Conclusion. The sequencing results can help optimize the administration of rational antibacterial therapy for nosocomial infections and are useful for monitoring nosocomial infections.

Key words: Nosocomial infections, microbiological monitoring, metagenomic sequencing, antibiotic resistance, bacteria of the ESKAPE group, nosocomial infection control.

Введение

Распространение резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам становится глобальной экологической проблемой современного общества. Такие общественные организации, как Центры по контролю и предотвращению заболеваний (CDC – Centers for Disease Control and Prevention), а также Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ), с целью контроля сложившейся ситуации создают и принимают ряд стратегических документов по контролю и борьбе с антибиотикорезистентностью [1-3]. В связи с распространением устойчивых к антибиотикам микроорганизмов развитие нозокомиальных инфекционных осложнений приводит к уменьшению

эффективности стандартных методов терапии, увеличению длительности пребывания в стационаре, увеличению расходов на лечение и к росту летальности в популяции. Пациенты с нозокомиальными инфекциями, вызванными бактериями с выраженной антибиотикорезистентностью, всегда имеют менее благоприятный прогноз в сравнении с группой больных с инфекционными осложнениями идентичной этиологии, но без детерминант антибиотикорезистентности [4, 5].

Как показывают многочисленные исследования, основной причиной внутрибольничных инфекций во всем мире являются бактерии группы ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. [6]. И именно бактерии, относящиеся к группе ESKAPE, характеризуются множественной лекарственной устойчивостью и представляют реальную угрозу жизни пациента и популяции в целом.

По оценкам западных коллег, распространенность внутрибольничных инфекций может варьировать в странах с различным уровнем дохода от 3,0 до 20,7%, а заболеваемость от 5 до 10%. [7]. Экономическая «нагрузка», связанная с нозокомиальными инфекциями, определяется растущей лекарственной устойчивостью возбудителей, что приводит к увеличению сроков пребывания в стационаре и, соответственно, дополнительных расходов на лечение, а также к росту смертности. Увеличение времени пребывания в больнице также обуславливает растущий риск перекрестного заражения пациентов, способствуя тем самым дальнейшему распространению госпитальных штаммов [8]. До 2,5 млн. случаев нозокомиальных инфекций в Российской Федерации наносят экономический ущерб более 5 млрд. рублей ежегодно [9].

Спектр механизмов, позволяющих микроорганизмам избегать воздействия антибактериальных средств, достаточно обширный и включает в себя следующие: структурное изменение мишени-субстрата для антибиотика (АБ), ингибирование его проникновения, активный эффлюкс АБ, формирование метаболических шунтов, выработка ферментов, разрушающих антибиотика. К примеру, увеличение экспрессии эффлюксного насоса происходит вследствие мутации в регуляторном гене *MarA* [10]. Ген *RmtC* кодирует метилтрансферазы и отвечает за посттранскрипционное N7-метиляцию нуклеотида G1405 в 16S рРНК, что делает рибосому устойчивой к 4,6-дизамещенным деоксострептаминовым аминогликозидам [11]. Как пример

выработки ферментов, разрушающих АБ, можно привести β -лактамазы, которые разрушают β -лактамное кольцо в структуре пенициллинов, цефалоспоринов и др., дезактивируя их антибактериальные свойства. К таким генам, кодирующим различные β -лактамазы, относятся, к примеру, гены классов TEM, CTX-M, SHV, VIM, NDM, OXA, включающих большое разнообразие ферментов [12].

В условиях многопрофильного стационара наиболее интересными, с точки зрения выявления резистентных микроорганизмов, являются отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Пребывание в ОРИТ, как правило, связано со значительной степенью инвазивных вмешательств и ослабленным иммунным статусом пациентов, что создает благоприятную среду для распространения госпитальных штаммов, характеризующуюся низким коэффициентом разнообразия циркулирующих микроорганизмов, повышенной их АБ-резистентностью и вирулентностью [13]. Интенсивные миграционные процессы в замкнутом пространстве отделения также способствуют реализации патогенного потенциала микроорганизмов.

Микробиологические исследования являются стандартным методом идентификации микроорганизма и его резистентности к антибактериальным препаратам. Исследование чувствительности бактерий к АБ осуществляется диффузионными методами и методами серийных разведений. Наиболее распространенными являются диско-диффузионный метод и E-тест [14]. На сегодняшний день, существует возможность не только изучать фенотипическую устойчивость к антибиотикам классическими микробиологическими методами, но и исследовать биоматериал на наличие в нем генов антибиотикорезистентности. Например, на отечественном рынке имеются наборы реагентов для выявления генов антибиотикорезистентности методом ПЦР в реальном времени. Такой подход позволяет получить результаты исследования сразу на несколько генов в короткие сроки (менее 24 ч), и анализ можно проводить из биологического материала, минуя этап получения чистых бактериальных культур. Тем не менее, ПЦР-методы имеют ограничения в производительности при необходимости одновременного определения множества генетических детерминант резистентности в десятках локусов генома различных микроорганизмов.

Новым направлением, на данный момент не применяющемся в рутинной клинической практике в России, является использование технологий се-

квенирования нового поколения (New Generation Sequencing, NGS) для установления вида микроорганизма и поиска генов антибиотикорезистентности и мутаций в них. NGS отличается высокой производительностью и дает возможность одновременно анализировать большое количество образцов, измеряемое десятками и сотнями.

Секвенирование метагеномных ДНК-библиотек с последующей сборкой геномов позволяет провести глубокий анализ состава микробного сообщества в образце, а также определить тысячи различных генов антибиотикорезистентности (определение резистома). Ограничениями такого метода секвенирования являются пока еще высокая стоимость исследования и сложная биоинформатическая обработка полученных данных [15].

Другой подход в секвенировании бактерий – определение возбудителя инфекции на основе гена 16S рРНК и использование ампликонной панели для поиска наиболее распространенных генов антибиотикорезистентности. Технологии, использованные в нашем исследовании, позволяют при достаточной степени оптимизации и автоматизации в лаборатории проанализировать 192 образца бактериальных культур или биологического материала в сроки до 5 дней.

Исследование генов, ответственных за приобретение резистентности к антибактериальным препаратам, позволит эффективно усовершенствовать систему мониторинга нозокомиальных инфекций. Секвенирование может быть более быстрым и информативным методом мониторинга. В рамках гранта, выданного Государственному бюджетному учреждению здравоохранения «Московский научно-практический центр лабораторных исследований департамента здравоохранения города Москвы», была разработана и апробирована тест-система для определения основных возбудителей внутрибольничных инфекций, и выявления генов, ассоциированных с резистентностью бактерий группы ESKAPE к различным классам антибиотиков, основанная на методе секвенирования нового поколения на платформе Illumina.

В данной работе мы приводим первые результаты нашего исследования, нацеленного на сравнение данных секвенирования нативного биоматериала и выделенных из него бактериальных изолятов в группе пациентов с нозокомиальными инфекциями, вызываемыми бактериями группы ESKAPE, из отделений реанимации и интенсивной терапии Московских стационаров.

Материалы и методы

Бактериологические, микробиологические и молекулярно-генетические исследования проводили на базе микробиологической лаборатории и Московского геномного центра ГБУЗ «Московского научно-практического центра лабораторных исследований ДЗМ» (МНПЦЛИ ДЗМ). Материалом послужили 48 проб бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) от пациентов с диагнозом «Внутрибольничная пневмония», находившихся на лечении в отделениях реанимации и интенсивной терапии «Городской клинической больницы №1 им. Н.И. Пирогова», Москва, Россия и ГБУЗ «НИИ Скорой Помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва, Россия, а также 97 чистых культур этиологически значимых микроорганизмов, выделенных из первичного биоматериала (n=48). Ниже приведен дизайн исследования (рис. 1).

Для получения чистых культур микроорганизмов проводили посев клинического материала на питательные среды общего назначения и селективные питательные среды: колумбийский агар с бараньей кровью (Bio-Rad, США), шоколадный агар (ООО «ГЕМ», Россия), UriSelect4 (Bio-Rad, США, МЖСА (ООО «ГЕМ», Россия), Сабуро (ООО «ГЕМ», Россия). Микробиологическую идентификацию микроорганизмов проводили с помощью белкового профилирования с использованием времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF «Microflex», Bruker). Для всех культур определяли лекарственную чувствительность методами разведений и диско-диффузионным методом.

Секвенирование панелей генов проводили как для клинического материала (БАЛ), так и для изолированных из него чистых бактериальных культур. Выделение ДНК производили с использованием набора "HiPure Microbiome DNA kit" (MAGEN, Китай). У исследуемых образцов определяли гены антибиотикорезистентности, а также проводили метагеномное секвенирование 16S рРНК. Для этого для каждого образца параллельно подготовили два типа ДНК-библиотек для NGS секвенирования: с применением набора для микробиологического профилирования по 16S рРНК бактерий и набора для обогащения фрагментами генов, ассоциированных с резистентностью к антибиотикам. Указанные наборы разрабатывались ООО «НПП «Биосфера» (Россия). Полученные ДНК-библиотеки анализировали на секвенаторе MiSeqDX (Illumina, США).

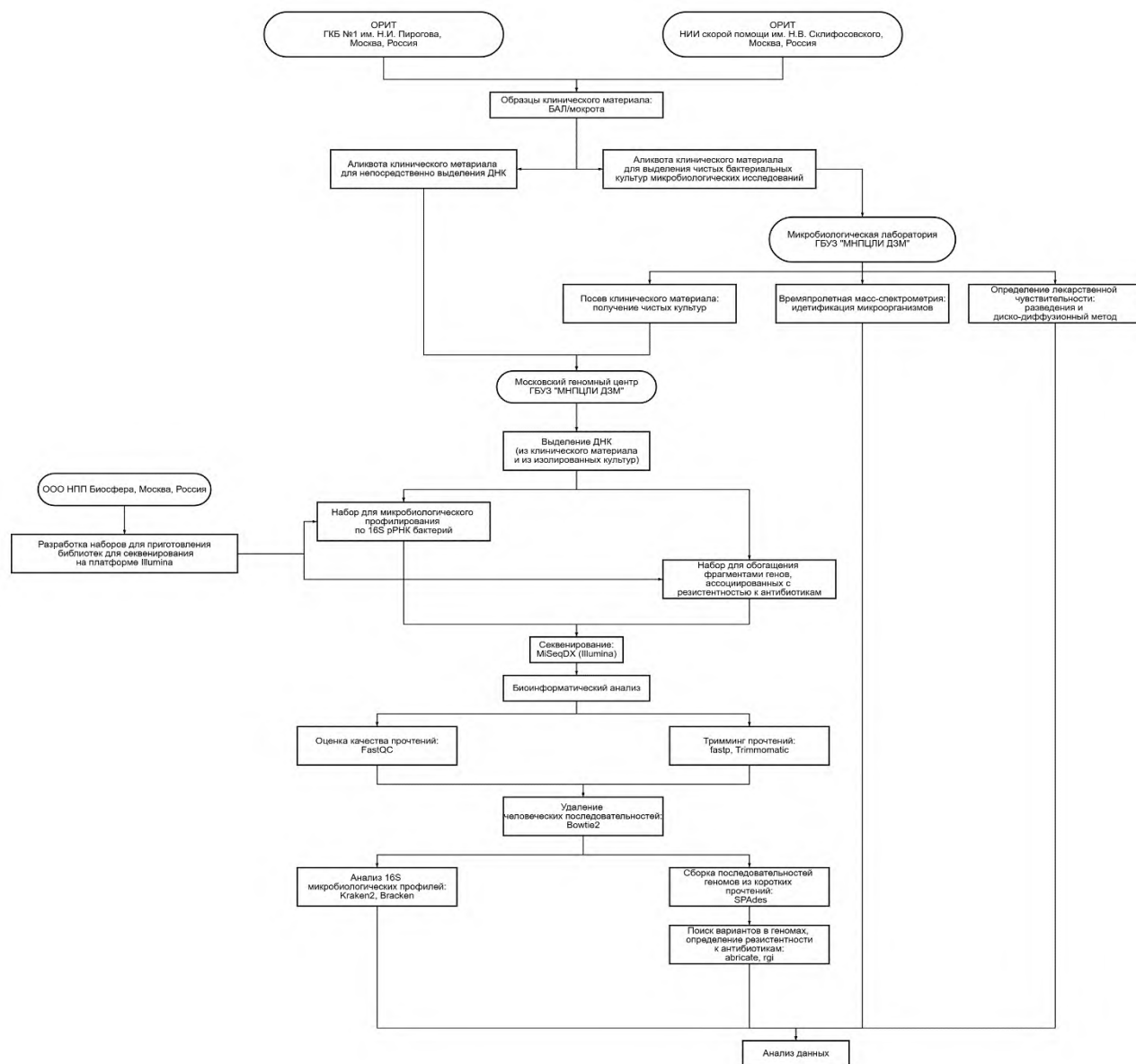


Рис. 1. Дизайн исследования.

Биоинформатический анализ данных включал в себя:

- оценку качества прочтений при помощи программы FastQC v0.12.1 [16]; первичную обработку прочтений (удаление из прочтений технических и неинформативных последовательностей, а также фильтрацию прочтений по качеству и длине) с помощью программ Trimmomatic v0.39 [17] и fastp v0.23.4 [18];
- удаление последовательностей человека (хоста) с использованием программы Bowtie2 методом картирования на геном с последующим удалением найденных прочтений из набора данных для анализа [19];
- анализ 16S микробиологических профилей: таксономическую классификацию и оценку представленности организмов в прочтениях с помощью программ Kraken2 v2.1.3 и Bracken 2.8 соответственно [20, 21];

- сборку последовательностей геномов из коротких прочтений с помощью SPAdes v4.0.0 [22];

- поиск вариантов в геномах и определение резистентности к антибиотикам с использованием abricate v.1.0.1 [23] и rgi v6.0.3 [24] параллельно в рамках анализа генов антибиотикорезистентности.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием программ Microsoft Office Excel 2016.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования было установлено, что распространенность бактерий группы ESKAPE среди выделенных микроорганизмов составила 80,4%, в то время как изоляты, не принадлежащие к данной группе, высевались в 19,6% случаев. При этом среди выделенных штаммов доминирующими микроорганизмами были *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*, а представители видов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* встречались значительно реже.

Сравнительные результаты данных бактериологического исследования и секвенирования гена 16S рНК из нативного материала представлены на рисунке 2.

На основании проведенного исследования можно сделать следующее заключение: в большинстве случаев метод секвенирования гена 16S рНК позволяет выявить большее разнообразие микроорганизмов в клиническом материале. Однако присутствуют и противоположные результаты – случаи, при которых данные секвенирования включают в себя не все микроорганизмы, которые удалось выделить при проведении классического микробиологического исследования. Необходимо отметить, что идентификация бактерий по гену 16S рНК из нативного биоматериала в некоторых случаях показывает меньшую эффективность, чем аналогичное секвенирование изолированных культур (табл. 1).

Выявленные различия также были описаны исследователями из других стран [25]. Таким образом, результаты, полученные на этом этапе, свидетельствуют, что наиболее часто выявляемые возбудители нозокомиальных инфекций в реанимационных отделениях стационаров, представляют собой глобальную угрозу в связи со стремительно развивающейся антибиотикорезистентностью.

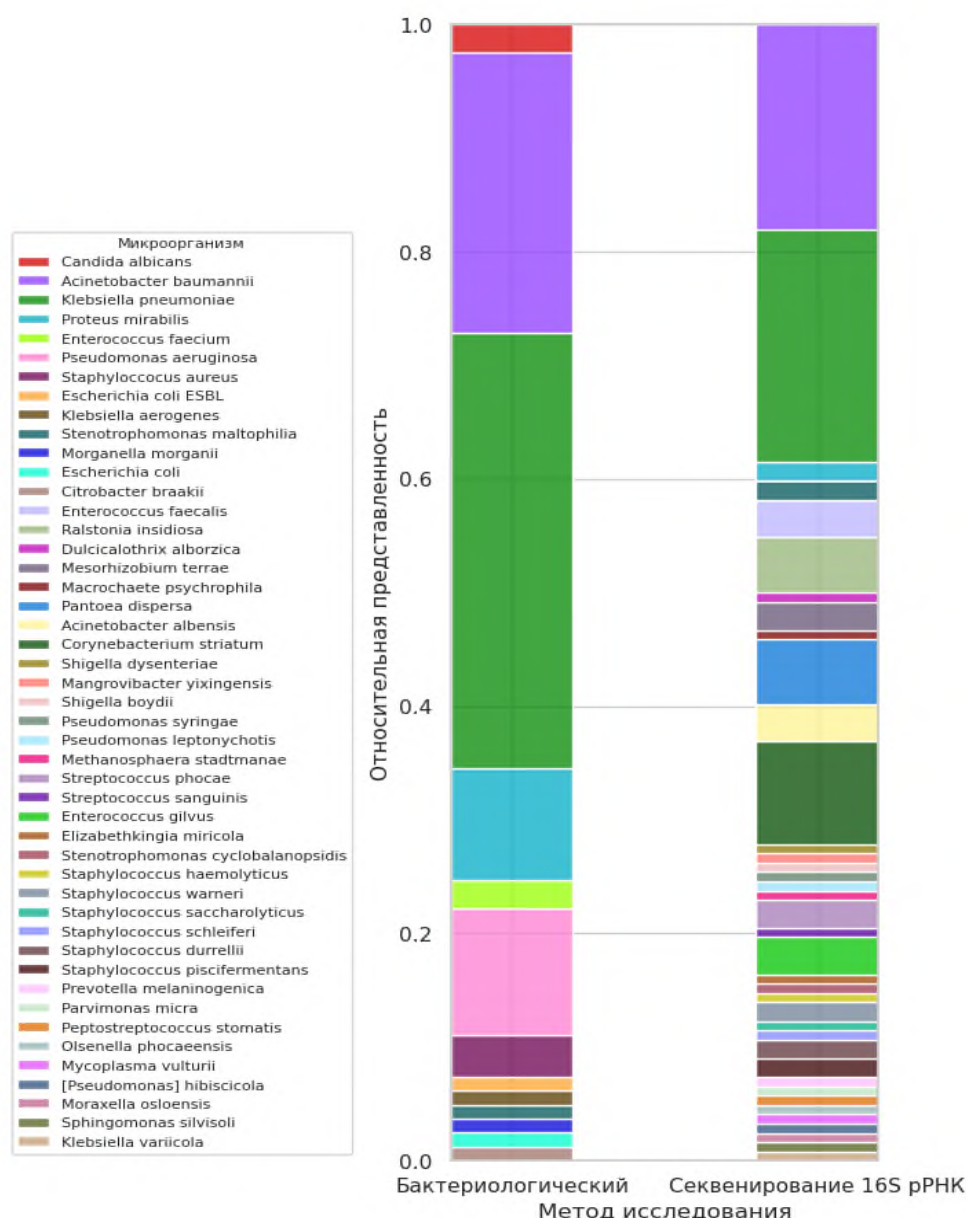


Рис. 2. Сравнение результатов идентификации бактериальных культур микробиологическими методами и метагеномным секвенированием гена 16S рРНК в клиническом материале пациентов.

С целью подтверждения теории о пригодности нативного биоматериала для первичного скрининга пациентов с нозокомиальными инфекциями помимо изучения видового разнообразия, фенотипическими методами была определена чувствительность к антибактериальным препаратам, а также проведены молекулярно-генетические исследования нативного материала и выделенных изолятов. Использование нативного материала могло бы ускорить процесс назначения корректной антибиотикотерапии (табл. 2).

Таблица 1. Сравнительные результаты идентификации бактерий классическими методами и методом секвенирования гена 16S рРНК в нативном биоматериале и в изолированных культурах на примере данных, полученных из биоматериала двух пациентов

Пациент	Определение культуральными методами	16S-секвенирование изолированной культуры	16S-секвенирование БАЛ
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 63%; <i>Pantoea dispersa</i> - 30%	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 27%; <i>Klebsiella pneumoniae</i> - 26%; <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> - 14%; <i>Pantoea dispersa</i> - 10%; [<i>Pseudomonas</i>] <i>hibiscicola</i> - 7%
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 98%	
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 97%	<i>Staphylococcus piscifermentans</i> - 20%; <i>Staphylococcus durrellii</i> - 14%; <i>Acinetobacter baumannii</i> - 10%; <i>Staphylococcus schleiferi</i> - 8%; <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> - 8%; <i>Staphylococcus warneri</i> - 7%
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 66%; <i>Pantoea dispersa</i> - 25%	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus piscifermentans</i> - 45%; <i>Staphylococcus durrellii</i> - 15%; <i>Staphylococcus warneri</i> - 11%; <i>Staphylococcus schleiferi</i> - 7%; <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> - 7%; <i>Staphylococcus auricularis</i> - 5%	

Таблица 2. Сравнительные результаты определения резистентности бактерий к антибиотикам культуральным методом и методом секвенирования генов антибиотикорезистентности в нативном биоматериале и в изолированных культурах на примере данных, полученных из биоматериала двух пациентов.

Пациент	3		4	
Культуральный метод	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
16S-секвенирование культуры	<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 82%; <i>Klebsiella variicola</i> - 11%	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 98%	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 98%	<i>Klebsiella pneumoniae</i> - 59%; <i>Pantoea dispersa</i> - 35%
Посев на чувствительность	азтреонам - R, цефотаксим - R, цефтазидим - R, цефтазидим/авибактам - S, цефепим - R, цефазолин - R, цефуроксим - R, эртапенем - R, имипенем - R, меропенем - R, левофлоксацин - R, моксифлоксацин - R, пиперацillin/тазобактам - R, триметоприм/сульфаметоксазол - R	ампициллин/сульбактам - R, дорипенем - R, имипенем - R, меропенем - R, ципрофлоксацин - R, левофлоксацин - R, пиперацillin/тазобактам - R, триметоприм/сульфаметоксазол - I, полимиксин в - R,	ампициллин/сульбактам - R, дорипенем - R, имипенем - R, меропенем - R, амикацин - R, гентамицин - R, ципрофлоксацин - R, левофлоксацин - R, пиперацillin/тазобактам - R, триметоприм/сульфаметоксазол - R, полимиксин в - R, тобрамицин - R	азтреонам - R, цефотаксим - R, цефтазидим - R, цефтазидим/авибактам - R, цефепим - R, цефазолин - R, цефутоксим - R, эртапенем - R, имипенем - R, меропенем - R, амикацин - R, гентамицин - R, левофлоксацин - R, моксифлоксацин - R, пиперацillin/тазобактам - R, триметоприм/сульфаметоксазол - R

Продолжение таблицы 2

Пациент	3		4	
Гены антибиотикорезистентности из культуры	carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-19; KPC beta-lactamase; resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	16S rRNA methyltransferase (G1405); ArmA family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase; class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116; OXA beta-lactamase; OXA-24 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-72; TEM beta-lactamase	16S rRNA methyltransferase (G1405); ArmA family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase; class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116; OXA beta-lactamase; OXA-23 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-167; resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump; TEM beta-lactamase	Van ligase; carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-18; class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-116; glycopeptide resistance gene cluster; KPC beta-lactamase; methicillin resistant PBP2; OXA beta-lactamase; OXA-24 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-72; quinolone resistance pentapeptide repeat protein QnrS1; quinolone resistance protein (qnr); resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump; sulfonamide resistant sul; sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2; TEM beta-lactamase
Антибиотики, гены из культур	carbapenem; cephalosporin; diaminopyrimidine; fluoroquinolone; glycylicline; monobactam; nitrofurantoin; penam; tetracycline	aminoglycoside; beta-lactam; carbapenem; cephalosporin; gentamicin; monobactam; penam; penem	aminoglycoside; beta-lactam; carbapenem; cephalosporin; diaminopyrimidine; fluoroquinolone; gentamicin; glycylicline; monobactam; nitrofurantoin; penam; penem; tetracycline	beta-lactam; carbapenem; cephalosporin; diaminopyrimidine; fluoroquinolone; glycopeptide; glycylicline; monobactam; nitrofurantoin; penam; penem; quinolone; sulfonamide; tetracycline
16S-секвенирование БАЛ	<i>Acinetobacter baumannii</i> - 50%; <i>Klebsiella pneumoniae</i> - 31%	<i>Corynebacterium striatum</i> - 47%; <i>Klebsiella pneumoniae</i> - 21%; <i>Pantoea dispersa</i> - 12%; <i>Acinetobacter baumannii</i> - 11%		

Продолжение таблицы 2

Пациент	3	4
Гены антибиотикорезистентности из БАЛ	Van ligase; 16S rRNA methyltransferase (G1405); ArmA family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase; carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-18; class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-178; CTX-M beta-lactamase; D-alanine--(R)-lactate ligase VanA; GES beta-lactamase; glycopeptide resistance gene cluster; KPC beta-lactamase; OXA beta-lactamase; OXA-23 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-167; resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump; sulfonamide resistant sul; sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2	16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase RmtB4; 16S rRNA methyltransferase (G1405); ArmA family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase; carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-18; class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1; class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15; CTX-M beta-lactamase; GES beta-lactamase; KPC beta-lactamase; OXA beta-lactamase; OXA-24 family carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-72; resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump; sulfonamide resistant sul; sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2; TEM beta-lactamase
Антибиотики, гены из БАЛ	aminoglycoside; carbapenem; cephalosporin; diaminopyrimidine; fluoroquinolone; gentamicin; glycopeptide; glycylcycline; monobactam; nitrofurran; penam; sulfonamide; tetracycline; vancomycin	aminoglycoside; beta-lactam; carbapenem; cephalosporin; diaminopyrimidine; fluoroquinolone; gentamicin; glycylcycline; monobactam; nitrofurran; penam; penem; sulfonamide; tetracycline

Примечание: R - resistant (резистентный, устойчивый), S - sensitive (чувствительный), I - intermediate (промежуточный).

В целом, данные двух методов показывают близкие результаты. Имеющиеся некоторые отличия можно объяснить недостатками, которые есть у обоих методов, а также сложностью биоинформатического протокола обработки данных.

Заключение

Полученные результаты подтверждают данные о значительной роли патогенов группы ESKAPE в развитии нозокомиальных инфекционных осложнений в отделениях реанимации и интенсивной терапии. В большинстве случаев метод секвенирования гена 16S рРНК позволяет выявить большее видовое разнообразие микроорганизмов в клиническом материале по сравнению с культуральным методом. Оба метода (культуральный и NGS) показали схожие результаты по определению резистентности бактерий к антибиотикам в нативном биоматериале и изолированных культурах.

Выбор метода в лаборатории должен определяться задачами, возможностями и укомплектованностью персоналом, оборудованием и реактивами. На наш взгляд, использование обоих методов позволяет сбалансированно и

наиболее полно подойти к изучению возбудителей внутрибольничных инфекций. Представленные данные наших исследований могут быть использованы для улучшения системы мониторинга нозокомиальных инфекций в условиях многопрофильного стационара, а также значительного повышения эффективности и ускорения первичной диагностики заболевания для своевременного назначения рациональной антибактериальной терапии, в том числе с использованием отечественных разработок.

(Работа выполнена в рамках гранта, выданного Государственному бюджетному учреждению здравоохранения «Московский научно-практический центр лабораторных исследований департамента здравоохранения города Москвы» на разработку тест-системы для определения основных возбудителей внутрибольничных инфекций, и выявления генов, ассоциированных с резистентностью бактерий группы ESKAPE).

ЛИТЕРАТУРА

1. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019 https://www.cdc.gov/antimicrobial-resistance/data-research/threats/index.html#cdc_research_or_data_summary_suggested_citation-suggested-citation.
2. Mukwege, D., Kusinza, A.B., Tibasima, E.B. Global Burden of Antimicrobial Resistance: Essential Pieces of a Global Puzzle. *thelancet.com* 2022, 399, 2347-2348. doi:10.1016/S0140-6736(22)00944-8.
3. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. 1 Jan 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report for 2019 – Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2023. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-report-2019.pdf> Accessed 2024 Nov 24.
5. Alp E, Damani N (2015) Healthcare-associated infections in Intensive Care Units: epidemiology and infection control in low-to-middle income countries. *J Infect Dev Ctries* 9:1040–1045. doi: 10.3855/jidc.6832.
6. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2475067. doi: 10.1155/2016/2475067.
7. Samuel S, Kayode O, Musa O, et al. Nosocomial infections and the challenges of control in developing countries. *Af J Clin Exp Micro.* 2010 Apr 20;11(2):102–110. doi: 10.4314/ajcem.v11i2.53916.
8. Kaye KS, Marchaim D, Chen TY, et al. Effect of nosocomial bloodstream infections on mortality, length of stay, and hospital costs in older adults. *J Am Geriatr Soc.* 2014 Feb;62(2):306–11. doi: 10.1111/jgs.12634. PMID: 24438554; PMCID: PMC4037885.
9. Kudryavtsev A.N., Chizhov A.G. Modern principles of prevention of nosocomial infection in intensive care units of a multidisciplinary hospital. *Bulletin of Pirogov National Medical & Surgical Center* 2010;5(3):127-33. (In Russ.) [Кудрявцев А.Н., Чижов А.Г. Современные принципы профилактики внутрибольничной инфекции в отделениях реанимации многопрофильного стационара. *Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова* 2010;5(3):127-33].
10. Hiltunen T., Virta M., Laine A.L. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017 Jan 19;372(1712). doi: 10.1098/rstb.2016.0039.

11. Wachino J, Shibayama K, Kimura K, et al. RmtC introduces G1405 methylation in 16S rRNA and confers high-level aminoglycoside resistance on Gram-positive microorganisms. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 Oct;311(1):56-60. doi: 10.1111/j.1574-6968.2010.02068.
12. Philippon A, Slama P, Dény P, et al. Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clin Microbiol Rev.* 2016 Jan;29(1):29-57. doi: 10.1128/CMR.00019-15.
13. Sergevnin V. I., Zueva N. G., Klyukina T. V. The role of the hospital strain of pathogens and the hands of medical personnel in the formation of the epidemic process of purulent septic infections of newborns. *Meditsinskii al'manakh* 2012; 2: 44–46. (In Russ.) [Сергевнин В. И., Зуева Н. Г., Клюкина Т. В. Роль госпитального штамма возбудителей и рук медицинского персонала в формировании эпидемического процесса гнойно-септических инфекций новорожденных. *Медицинский альманах* 2012; 2: 44–46].
14. Методические указания МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 4 марта 2004 г.).
15. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, et al. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011 Mar;162(6):1239-49. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
16. Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (21 Nov 2024).
17. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014 Aug 1;30(15):2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
18. Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics.* (2018) 34:884–90. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
19. Langmead B, Trapnell C, Pop M, et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.* 2009;10(3):R25. doi: 10.1186/gb-2009-10-3-r25.
20. Wood, D. E., Lu, J. & Langmead, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol.* 2019; 20, 257 doi: 10.1038/s41564-024-01862-z.
21. Lu J, Breitwieser F, Thielen P, et al. Bracken: estimating species abundance in metagenomics data. *PeerJ Computer Science.* 2017;3(1):e104. doi: 10.7717/peerj-cs.104.
22. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, et al. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics.* 2020 Jun;70(1):e102. doi: 10.1002/cpbi.102.
23. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, et al. Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Oct 22;63(11):e00483-19. doi: 10.1128/AAC.00483-19. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Mar 24;64(4):e00361-20. doi: 10.1128/AAC.00361-20.
24. Alcock BP, Huynh W, Chalil R, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Res.* 2023 Jan 6;51(D1):D690-D699. doi: 10.1093/nar/gkac920.
25. An N, Wang C, Dou X, et al. Comparison of 16S rDNA Amplicon Sequencing With the Culture Method for Diagnosing Causative Pathogens in Bacterial Corneal Infections. *Transl Vis Sci Technol.* 2022 Feb 1;11(2):29. doi: 10.1167/tvst.11.2.29. 6

Поступила 15 сентября 2024 г.

Повторно – 29 сентября 2024 г.

(Контактная информация и сведения об авторах: Васильева Ксения Владимировна – аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», Инженер ГБУЗ «МНПЦЛИ ДЗМ», ул. Ореховый бульвар, 49, корпус 1, г. Москва, Россия, 115580. e-mail: VasilievaKV@dcli.ru, Тел.: +7 (963) 638 26 61; <https://orcid.org/0009-0003-6939-0617>;

Сафина С.А. – врач клинической лабораторной диагностики¹, Москва, Россия, <https://orcid.org/0009-0005-9276-9152>, e-mail: sasveaz@yandex.ru;

Сидоренко О.И. – аналитик¹, <https://orcid.org/0009-0007-2616-5363>, e-mail: oxiksid@gmail.com;

Филиппов П.Н. – заведующий лабораторным центром № 3¹, <https://orcid.org/0009-0001-3613-0558>, e-mail: FilipovPN@dcli.ru;

Джандарова Д.Т. – кандидат биологических наук, заведующая микробиологической лабораторией¹, <https://orcid.org/0000-0003-4140-4784>, e-mail: DjandarovaDT@dcli.ru;

Нархова Т.В. – врач-бактериолог¹, <https://orcid.org/0009-0001-4524-424X>, e-mail: NarhovaTV@dcli.ru;

Эргашева Н.С. – врач-бактериолог¹, <https://orcid.org/0009-0008-3756-8317>, e-mail: dirusha@mail.ru;

Мигяев О.К. – заведующий лабораторией клинико-диагностических и генетических исследований №1¹, Москва, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-0435-9892>, e-mail: MigyaevOK@dcli.ru;

Спешилов Г.И. – руководитель отдела NGS-разработок², <https://orcid.org/0000-0002-6539-6494>;

Лейнсоо А.Т. – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии ГБУЗ НИИ Скорой Помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ³, <https://orcid.org/0000-0003-4006-6787>;

Мругова Т.М. – кандидат медицинских наук, заведующая микробиологической лабораторией №3¹, <https://orcid.org/0000-0002-4127-7415>, e-mail: MrugovaTM@dcli.ru;

Глотов О.С. – доктор биологических наук, начальник московского геномного центра¹, Москва; заведующий НИО экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга⁴, <https://orcid.org/0000-0002-0091-2224>, e-mail: olglotov@mail.ru;

Щекочихин Д.Ю. – кандидат медицинских наук, доцент кафедры кардиологии, функциональной и ультразвуковой диагностики⁵, Начальник отдела организации проведения клинических исследований⁶, <https://orcid.org/0000-0002-8209-2791>, e-mail: agishm@list.ru;

Штинова И.А. – заведующая Лабораторным центром № 1¹, <https://orcid.org/>, e-mail: shtinovaia@dcli.ru;

Шпакова О.Г. – заведующая КДЛ¹, <https://orcid.org/>, e-mail: shpakovaog@dcli.ru;

Комаров А.Г. – директор ГБУЗ «МНПЦЛИ ДЗМ», e-mail: KomarovAG@dcli.ru

Образец ссылки на статью:

Васильева К.В., Сафина С.А., Сидоренко О.И., Филиппов П.Н., Джандарова Д.Т., Нархова Т.В., Эргашева Н.С., Мигяев О.К., Спешилов Г.И., Лейнсоо А.Т., Мругова Т.М., Глотов О.С., Щекочихин Д.Ю., Штинова И.А., Шпакова О.Г., Комаров А.Г. Первые результаты сравнительного анализа молекулярно-генетических исследований нативного материала и чистых культур микроорганизмов, выделенных от пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН 2024. 3: 15с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2024-3/Articles/VKV-2024-3.pdf>) DOI: 10.24411/2304-9081-2024-13001.