

4
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ

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



БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Хоментовский А.С.



Лазаренко Ф.М.

2024

УЧРЕДИТЕЛЬ

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

© Коллектив авторов, 2024

УДК. 577.29

О.И. Сидоренко¹, А.Б. Кулько², С.А. Сафина¹, А.В. Дубанов¹, А.В. Дудковская¹,
П.Н. Филиппов¹, Д.Т. Джандарова¹, Т.М. Мругова¹, О.К. Мигяев¹, Г.И.
Спешилов³, Е.А. Хомякова¹, К.В. Васильева¹, И.А. Штинова¹, О.Г. Шпакова¹,
С.Г. Сафонова², А.И. Исакова², А.Г. Комаров¹, О.С. Глотов^{1,4}

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К АНТИМИКОТИКАМ, С ПРИМЕНЕНИЕМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

- ¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский научно-практический центр лабораторных исследований департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия
- ² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия
- ³ ООО «Научно-производственное предприятие «БИОСФЕРА», Москва, Россия
- ⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального Медико-Биологического Агентства», Санкт-Петербург, Россия

Цель. Оценка возможностей оригинальной тест-системы по идентификации условно-патогенных грибов, выделенных от пациентов фтизиатрической клиники, и ее эффективности с точки зрения применения в диагностической медицинской лаборатории.

Материалы и методы. 149 образцов ДНК штаммов микромицетов, полученных из микробиологической лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ». Было выполнено определение вида микромицета и генов, ассоциированных с резистентностью к противогрибковым препаратам, по протоколам модуля идентификации и анализа резистентности.

Результаты. Установлено, что использование метода NGS в сочетании с культуральными методиками, расширяет возможности лабораторной диагностики глубоких оппортунистических микозов в клинической практике и имеет значение при исследовании эпидемиологии внутрибольничного кандидоза. Следует дополнительно исследовать причины недостаточно высокого уровня сходимости результатов видовой идентификации штаммов грибов методом NGS и общепринятыми культуральными методами (менее 50%). Большинство обнаруженных генов резистентности были сопряжены с устойчивостью к препаратам группы азолов.

Заключение. Показано, что оригинальная отечественная тест-система по методу NGS может успешно применяться в научно-практических целях как дополнительная инновационная методика при идентификации клинически значимых дрожжевых и мицелиальных возбудителей оппортунистических глубоких микозов. Тест-система обладает возможностью определения генов-мишеней и мутаций в них, ассоциированных с резистентностью к противогрибковым препаратам. Имеется возможность оценивать наличие мутаций в перечисленных генах, которые могут быть ассоциированы с развитием устойчивости к противогрибковым препаратам.

Ключевые слова: Секвенирование нового поколения, устойчивость к противогрибковым препаратам, оппортунистические глубокие микозы.

O.I. Sidorenko¹, A.V. Dubanov¹, A.V. Dudkovskaia¹, P.N. Filippov¹, J.T. Dzhandarova¹, T.M. Mrugova¹, T.V. Narkhova¹, N.S. Ergasheva¹, O.K. Migyaev¹, S.A. Safina¹, G.I. Speshilov², K.V. Vasilyeva¹, O.S. Glotov^{1,3}, I.A. Shtinova¹, O.G. Shpakova¹, A.G. Komarov¹, A.B. Kulko², A.I. Isakova², S.G. Safonova²

DEVELOPMENT OF A TEST SYSTEM FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC FUNGI AND THE IDENTIFICATION OF GENES ASSOCIATED WITH THEIR RESISTANCE TO ANTIMYCOTICS USING NEXT-GENERATION SEQUENCING

¹ Moscow Scientific and Practical Laboratory Research Center of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia

² Moscow Scientific and Clinical Antituberculosis Center of the Moscow City Health Department, Moscow, Russia

³ Scientific and Production Enterprise "BIOSPHERE", Moscow, Russia

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

Aim. Evaluation of the capabilities of the original test system for identification of opportunistic fungi isolated from tuberculosis patients and its effectiveness in terms of use in the diagnostic medical laboratory.

Materials and methods. 149 DNA samples of micromycetes strains obtained from the microbiological laboratory of Moscow Scientific and Clinical Antituberculosis Center of the Moscow City Health Department. The micromycete species and the genes associated with resistance to antifungal drugs were determined using the protocols of the resistance identification and analysis module.

Results. It has been established that the use of the NGS method in combination with cultural methods expands the possibilities of laboratory diagnostics of deep opportunistic mycoses in clinical practice and is important in studying the epidemiology of nosocomial candidiasis. It is necessary to further investigate the reasons for the insufficiently high level of convergence of the results of species identification of fungal strains using the NGS method and generally accepted cultural methods (less than 50%). Most of detected resistance genes were associated with resistance to azole drugs.

Conclusion. It was shown that the original national NGS test system can be successfully used for scientific and practical purposes as an additional innovative technique for identifying clinically significant yeast and mycelial pathogens of opportunistic deep mycoses. The test system has the ability to identify target genes and mutations in them associated with resistance to antifungal drugs. It is possible to assess the presence of mutations in the listed genes that may be associated with the development of resistance to antifungal drugs

Key words: new generation sequencing, resistance to antifungal drugs, opportunistic deep mycoses.

Введение

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) патогенные грибы (первично-патогенные виды и условно-патогенные виды, вызывающие внутрибольничные оппортунистические микозы) представляют собой серьезную угрозу для здоровья населения, поскольку они становятся все более распространенными и устойчивыми к терапии [1]. Современные противогрибковые препараты (антимикотики) существенно отличаются по спек-

тру активности, механизмам действия и специфическим мишеням, наличию фунгистатического и фунгицидного эффектов и относятся к разным группам лекарственных средств: полиены, азолы (имидазолы, триазолы первого и второго поколения), эхинокандины, флюоропиримидины, аллиламины [2, 3].

Возможность отличать представителей разных видов друг от друга с использованием традиционных методов осложнена высоким внутривидовым полиморфизмом или, напротив, высоким межвидовым морфологическим и биохимическим сходством.

Необоснованное использование противогрибковых препаратов (антимикотиков), приводит к селекции устойчивых штаммов. Инфекции, вызванные такими штаммами грибов, отличаются длительным течением, увеличивают продолжительность пребывания в стационаре и ухудшают прогноз для пациентов. Таким образом, назначение противогрибковых средств должно осуществляться своевременно с учетом вида возбудителя и его восприимчивости к тем или иным средствам.

Одним из актуальных направлений в изучении видового состава циркулирующих среди пациентов болезнетворных грибов, способных вызывать развитие внутрибольничных микозов разной локализации, является внедрение молекулярно-генетических методов идентификации. Молекулярные тест-системы, основанные на методе ПЦР, преимущественно ориентированы на определение наиболее часто встречаемых видов представителей грибов родов *Candida* и *Aspergillus*; их использование является дорогостоящим и технически сложным. Использование секвенирования нового поколения (NGS) существенно расширяет возможности лабораторных исследований при диагностике микозов, так как позволяет идентифицировать ДНК доминантных и редко встречаемых в клинической практике грибов. На сегодняшний день не существует молекулярно-генетических методик альтернативных методу NGS для выполнения задачи по выявлению состава микобиоты, циркулирующей в госпитальной среде. С другой стороны, доступные для внедрения тест-системы на основе NGS различных производителей охватывают ограниченное количество видов грибов и характеризуются относительно высокой стоимостью.

Важным аспектом при реализации возможностей данных методов является выбор ДНК-мишени, так как не все регионы, используемые для изучения филогенетических связей, способны обеспечить идентификацию воз-

будителя до вида, в некоторых случаях определить вид патогена возможно только при одновременном исследовании нескольких локусов.

Таким образом, представляется необходимым создание и апробация оригинальной тест-системы для определения широкого спектра патогенных и условно-патогенных грибов методами NGS.

Внедрение в практику лабораторий методик NGS обеспечит получение клиническими специалистами дополнительных данных по видовому составу грибов – возбудителей микозов и наличие у штаммов генов резистентности, что повысит эффективность диагностики и лекарственной терапии больных с данной патологией. В сложных случаях, при невозможности выявления патогена имеющимися наборами для ПЦР-диагностики, применение NGS позволит проводить широкий диагностический поиск, что может сократить время до начала этиотропной терапии. Точная диагностика обеспечит рациональный подход в использовании лекарственных препаратов.

Нами предложена тест-система для определения основных возбудителей микозов и выявления в них генов, ассоциированных с резистентностью к антимикотикам. В основе определения лежит метод секвенирования на платформе NGS производства Illumina, США. Также анализ может быть проведен на аналогичных приборах, анализирующих ДНК-библиотеки со стандартными адаптерными последовательностями Illumina: GeneMind, Salus BioMed и т.д.

Разработанная тест-система включает в себя 2 модуля: модуль №1 для определения основных возбудителей внутрибольничных инфекций методом микробиологического профилирования (грибной микробиом) и модуль №2 для выявления генов, ассоциированных с резистентностью к антимикотикам, включающий 10 генов – мишеней для целевого обогащения методом ПЦР. Список генов – мишеней, ассоциированных с устойчивостью к антимикотикам, анализируемых модулем №1, с применением метода секвенирования нового поколения NGS представлен в таблице 1).

Работа модуля №1 основана на проведении микробиологического (микробиомного) профилирования грибной микробиоты по 18S-5.8S рРНК с применением метода NGS. Для анализа проводятся амплификации гипервариабельного межгенного участка ITS2 гена 18S-5.8S рРНК для последующего анализа ампликона методом секвенирования нового поколения, в том числе, оптимизированного под систему производства Illumina, США.

Таблица 1. Гены-мишени целевого обогащения для анализа устойчивости к антимикотикам

Ген	Класс устойчивости
CdMDR1	Азолы
CDR1	Азолы
CDR2	Азолы
CYP51A	Азолы
ERG11	Азолы, полиены
ERG3	Азолы, полиены
FKS1	Эхинокандины
MDR1	Азолы
MDR3	Азолы
MDR4	Азолы

Основным элементом разрабатываемой тест-системы является модуль целевого обогащения ДНК-библиотек. Несмотря на отсутствие прямых конкурирующих решений по целевой пробоподготовке к NGS секвенированию, аналогичными можно назвать зарубежные рекомендации по пробоподготовке, основанной на жидкостной гибридизации. Производителями являются Roche, (США) и Illumina (США). Данные решения обладают высокой ценой (порядка 25000-30000 руб. за образец), нередко в них используется сложный протокол подготовки проб со стадией жидкостной гибридизации, что требует большого количества ручного труда квалифицированного персонала и трудно автоматизируется. Эти недостатки удалось отчасти устранить в разработанной тест-системе.

Преимуществами нашей тест-системы на основе NGS являются:

1. Целесообразность (экономическая) для поиска большого числа мишеней в рамках одного исследования. Использование ПЦР диагностики в таких случаях становится нецелесообразным, так как позволяет определить только единичные мишени в рамках исследования;

2. Возможность рассмотреть все мутации в заданном списке генов в рамках одного исследования (исследование панели генов), давая полную картину имеющихся мутаций, что позволяет избежать дополнительного тестирования;

3. Полная совместимость со всеми платформами секвенирования Illumina со стандартными наборами реактивов. Совместимость с платформами секвенирования MGI при использовании «наборов конверсии»;

4. Упрощенная процедура, позволяющая применить в практике диагностических лабораторий при участии среднего медицинского персонала (лаборант);

5. Полностью отечественные реактивы.

Целью данной работы является оценка возможностей оригинальной тест-системы по идентификации штаммов условно-патогенных грибов, выделенных от пациентов при диагностике микозов, и ее эффективности с точки зрения применения в диагностической лаборатории.

Для этого необходимо было выполнить определение вида гриба в каждом из образцов серии с помощью коммерчески доступных ПЦР-тестов. Результаты были сопоставлены с результатами, полученными с помощью оригинальной тест-системы. При этом помимо показателей эффективности, рассматривались такие аспекты применения системы в практике диагностической лаборатории, как технологичность и требовательность к квалификации персонала.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили образцы ДНК 149 штаммов грибов, полученные из ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ»: 14 музейных штаммов (14 дрожжевых культур из коллекции ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ») (13 клинических штаммов, выделенных от пациентов фтизиатрических клиник г. Москвы (кровь, ликвор, БАЛ, трахеобронхиальный аспират, мокрота), 1 типовой коллекционный штамм Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ)) и 135 клинических штаммов (109 дрожжевых культур и 26 мицелиальных культур, выделенных в лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ» при диагностике бронхолегочных микозов у пациентов с 26.03.2024 по 16.07.2024 (БАЛ, трахеобронхиальный аспират, мокрота)). Всего было взято в исследование: 123 дрожжевых штамма (82,6%) из 4 родов (17 видов): р. *Candida* (112 штаммов (75,2%) 11 видов: *C. albicans* (84), *C. auris* (1), *C. dubliniensis* (1), *C. famata* (1), *C. glabrata* (7), *C. guilliermondii* (1), *C. kefyr* (7), *C. krusei* (6), *C. parapsilosis* (1), *C. tropicalis* (2), *C. zeylanoides* (1)); р. *Cryptococcus* (3 штамма (2,0%) 1 вида: *Cr. neoformans* (3)); р. *Rhodotorula* (6 штаммов (4,0%) 3 видов: *Rh. glutinis* (1), *Rh. minuta* (1), *Rh. mucilaginosa* (4)); р. *Trichosporon* (2 штамма (1,3%) 2 ви-

дов: *Tr. asahii* (1), *Trichosporon* sp. (1)) и 26 мицелиальных штаммов (17,4%) из 4 родов (7 видов): р. *Aspergillus* (23 штамма (15,4%) 4 видов: *A. flavus* (2), *A. fumigatus* (13), *A. nidulans* (1), *A. niger* (7)); р. *Acremonium* (1 штамм (0,7%) 1 вида: *Acr. kiliense* (1)); р. *Fusarium* (1 штамм (0,7%) 1 вида: *F. dimerum* (1)); р. *Paecilomyces* (1 штамм (0,7%) 1 вида: *Paec. variotii* (1)). Идентификация, выделенных их посевов биоматериалов штаммов микромицетов, проводилась по общепринятым в рутинной практике фенотипическим характеристикам (диагностические для групп дрожжевых и мицелиальных грибов биохимические, физиологические характеристики (хромогенные среды, ручные стандартизованные тест-системы для идентификации дрожжевых грибов, температурные границы роста), морфологические признаки (макро- и микроморфологические признаки на стандартных питательных средах)) [4].

Для взятых в исследование 149 образцов ДНК штаммов грибов методом NGS проводили определение видовой принадлежности с детекцией генов, ассоциированных с резистентностью к антимикотикам. Была проведена проверка сходимости результатов видовой идентификации штаммов методом NGS и культуральным методом, используемом в рутинных исследованиях при диагностике микозов в лаборатории ГБУЗ «МНПЦ борьбы с туберкулезом ДЗМ».

Анализ образцов ДНК штаммов грибов был выполнен по следующим протоколам:

Протокол модуля идентификации микроорганизмов включал следующие этапы: амплификацию гипервариабельного межгенного участка ITS2 гена 18S-5.8S рРНК геномов грибов; индексная реамплификация с получением обогащенных баркодированных библиотек ДНК; смешивание равных объемов библиотек для разных образцов; финальная очистка на магнитных частицах.

Протокол модуля анализа резистентности включал следующие этапы: мультиплексную амплификацию целевых фрагментов геномов грибов; индексную реамплификацию с получением обогащенных баркодированных библиотек ДНК; смешивание равных объемов библиотек для разных образцов; финальную очистку на магнитных частицах.

Обработка результатов секвенирования производилась методами биоинформатики и включала в себя этапы первичной обработки прочтений, удаления последовательностей организма хозяина (человека), анализ прочтений на таксономическую принадлежность, сборку последовательности гено-

ма и поиск в ней генов, ассоциированных с резистентностью, а также поиск мутаций в этих генах.

Первичная обработка прочтений (удаление из прочтений технических и неинформативных последовательностей, а также фильтрацию прочтений по качеству и длине) была выполнена с помощью программ Trimmomatic v0.39 [5] и fastp v0.23.4 [6], cutadapt v4.4 [7]. Удаление последовательностей человека (хоста) было выполнено с использованием программы Bowtie2 методом картирования на геном с последующим удалением найденных прочтений из набора данных для анализа [8]. Таксономическая классификация и оценка представленности организмов в прочтениях с помощью программ Kraken2 v2.1.3 и Bracken 2.8 соответственно [9, 10] и Gambit v1.0 [11]. Сборка последовательностей геномов из коротких прочтений была выполнена с помощью программы Shovill v1.1.0 [12]. Поиск генов, ассоциированных с резистентностью, осуществлялся путем выравнивания геномных последовательностей образцов на оригинальную базу данных референсных последовательностей, основанную на AFRbase [13], дополняемую последовательностями генов, ассоциированных у грибов с резистентностью к противогрибковым средствам, вручную. Поиск мутаций в этих генах был осуществлен с помощью программы snippy v4.6.0 [14].

Для приведения в соответствие названий грибов, выявляемых по протоколам модуля идентификации методом NGS (приводимое в базах генетических данных наименование гриба должно соответствовать установленным правилами номенклатуры [15] (это следующее узаконенное название: 1) при наличии у вида нескольких типов спороношения (бесполое, половое) – законное название половой телеоморфной стадии или 2) для строго бесполой анаморфных (митоспоровых) видов – законное название анаморфы)) и выявляемых по протоколам культуральных исследований клинических штаммов (традиционное для медицинской микологии название возбудителя микоза – легитимное название анаморфы) были использованы доступные в Интернете базы данных по номенклатуре и таксономии грибов Index Fungorum [16], MycoBank [17] и базы данных коллекций микроорганизмов Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Центр биоразнообразия грибов (CBS)) [18], Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) [19]. Таким образом, как совпадения (синонимы одного видового названия) учитывались следующие результаты идентификации: 1) *Kluyveromyces marxianus* (метод NGS) – *Candida*

kefyr (культуральные исследования); 2) *Pichia kudriavzevii* (метод NGS) – *Candida krusei* (культуральные исследования); 3) *Cystobasidium minutum* (метод NGS) – *Rhodotorula minuta* (культуральные исследования); 4) *Rhodotorula alborubescens* (метод NGS) – *Rhodotorula mucilaginosa* (культуральные исследования). Было учтено также наличие легитимных синонимов из родов *Cryptococcus* и *Candida* у видовых названий грибов, выявляемых методом NGS: *Naganishia albida* (синоним *Cr. albidus*); *Wickerhamiella parazyta* (синоним *C. pararugosa*).

Результаты и обсуждение

Особенности подготовки проб: используемые подходы не требуют выравнивания концентрации ДНК разных образцов, множества индивидуальных очисток на магнитных частицах. Выравнивание концентрации обогащенных ДНК-библиотек перед смешиванием также не требуется, так как применение специальных условий индексной амплификации позволяет частично выполнить эту процедуру автоматически. При этом различия в финальном покрытии между образцами до 2 - 2,5 раз является нормальными и компенсируются избыточностью необходимого количества данных на образце. Это обстоятельство должно способствовать сокращению затрат времени и средств на выполнение анализа.

С учетом синонимов, результаты идентификации до уровня вида (метод NGS – культуральные исследования) совпадали в 73 из 149 случаев (49,0%); до уровня рода – в 147 из 149 случаев (98,7%).

В группе дрожжевых грибов (123 штамма) видовая идентификация приводила к идентичным результатам у 59 штаммов (48,0%); до рода – у 122 штаммов (99,2%). Всего было протестировано 112 штаммов 11 видов возбудителей кандидоза, 3 штамма 1 вида возбудителя криптококкоза, 8 штаммов 5 видов возбудителей редких дрожжевых инфекций.

У штаммов возбудителей кандидоза результаты видовой идентификации методом NGS подтвердили культуральный метод в 54 из 112 случаев (48,2%): *C. albicans* (38,1%), *C. auris* (100%), *C. dubliniensis* (0%), *C. famata* (0%), *C. glabrata* (100%), *C. guilliermondii* (0%), *C. kefyr* (100%), *C. krusei* (83,3%), *C. parapsilosis* (100%), *C. tropicalis* (50,0%), *C. zeylanoides* (0%). Отметим высокий уровень сходности у штаммов распространенных возбудителей *C. glabrata*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*. Низкое число совпадений для *C. albicans* (главный возбудитель кандидоза и всех оппортунистических

микозов в целом; общеупотребимая методика идентификации – по специфическому окрашиванию колоний на стандартных хромогенных средах (ферментативная активность: определение белка N-ацетил-β-D-галактозамидазы)) объясняется неспособностью дифференцировать на хромагаре близкородственные виды, входящие в комплекс *C. albicans*: *C. albicans*, *C. africana* (ранее подвид или «атипичный» вид политипических дрожжей *C. albicans*; по фенотипическим признакам *C. africana* и *C. albicans* идентичны), *C. dubliniensis* (по фенотипическим признакам *C. dubliniensis* и *C. albicans* трудноразличимы) [4, 20]. Из 84 протестированных штаммов *C. albicans* (прямая окончательная идентификация по окраске колоний на хромогенных средах) 52 штамма (61,9%) были отнесены по молекулярным признакам к близкородственным видам: к *C. africana* (33 штамма (39,3%)), *C. dubliniensis* (16 штаммов (19,0%)), а также *C. tropicalis* (3 штамма (3,6%) – по специфической окраске на хромагаре колонии *C. tropicalis* не всегда четко отличима от колоний *C. albicans*). Полученные с помощью метода NGS данные показали, что распространенность в госпитальной среде Московского региона клинически значимых видов *C. africana* (инфекции, вызванные *C. africana* наиболее распространены в Африке, но были зарегистрированы в разных странах других регионов [20]) и *C. dubliniensis*, вероятно, выше предполагаемого уровня. Очевидно, что применение тест-системы NGS в практических медицинских лабораториях может иметь определяющее значение для изучения эпидемиологии кандидоза, вызываемого политипическими дрожжами *C. albicans*. Неспособность различать клинически значимые виды из комплекса *C. albicans* при использовании стандартных хромогенных сред предопределили общую невысокую сходимость результатов видовой идентификации в целом (общая доля штаммов, относимых по методу NGS не к *C. albicans*, а к *C. africana* или *C. dubliniensis* составляла 32,9% от общего числа исследованных штаммов).

У штаммов возбудителей криптококкоза результаты видовой идентификации методом NGS подтвердили культуральный метод в 1 из 3 случаев (33,3%): *Cr. neoformans* (33,3%). В 2 случаях выделенные из посевов штаммы *Cr. neoformans* были отнесены к другому возбудителю криптококкоза *Cr. albidus* (*Naganishia albidus* – современный синоним).

У штаммов возбудителей редких дрожжевых инфекций результаты видовой идентификации методом NGS подтвердили культуральный метод в 4 из 8 случаев (50,0%): *Rh. glutinis* (0%), *Rh. minuta* (100%), *Rh. mucilaginosa*

(50,0%); *Tr. asahii* (100%), *Trichosporon* sp. (0%). По молекулярным признакам 3 из 6 штаммов рода *Rhodotorula* были отнесены к другим видам того же рода (штамм *Rh. glutinis* отнесен к *Rh. alborubescens* (*Rh. mucilaginosa*), 2 штамма *Rh. mucilaginosa* – к *Rh. taiwanensis*), а штамм базидиомицетовых дрожжей *Trichosporon* sp. идентифицирован как аскомицет *Candida parapsilosis* (в данном случае наиболее вероятно случайная ошибка при пересевах культуры).

В группе мицелиальных грибов (26 штаммов) результаты видовой идентификации совпадали у 14 штаммов (53,8%); до рода – у 25 штаммов (96,2%). Всего было протестировано 23 штамма 4 видов возбудителей аспергиллеза, 3 штамма 3 видов возбудителей гиалогифомикоза.

У штаммов возбудителей аспергиллеза результаты видовой идентификации методом NGS подтвердили культуральный метод в 13 из 23 случаев (56,5%): *A. flavus* (0%), *A. fumigatus* (100%), *A. nidulans* (0%), *A. niger* (0%). Результаты видовой идентификации совпали для всех 13 штаммов главного возбудителя аспергиллеза *A. fumigatus*; штаммы *A. flavus*, *A. nidulans* и *A. niger* по молекулярным данным были отнесены к другим видам того же рода *Aspergillus*. Наличие характерных фенотипических признаков у исследованных клинических штаммов *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* [21, 22] не оставляют сомнений в правильности их видовой идентификации классическими методами. Расхождения с молекулярными данными требует специального исследования для уточнения причин (методические трудности при экстракции ДНК и др.).

У штаммов возбудителей гиалогифомикоза результаты видовой идентификации методом NGS подтвердили культуральный метод в 1 из 3 случаев (33,3%): *Acr. kiliense* (0%), *F. dimerum* (0%), *Paec. variotii* (100%). По молекулярным признакам штамм *F. dimerum* был отнесен *F. begoniae*, штамм *Acr. kiliense* – к *Scedosporium apiospermum* (отметим некоторое сходство фенотипических морфологических признаков у данных анаморфных видов, относящихся к разным родам мицелиальных грибов-оппортунистов).

В рамках предложенного метода было выполнено определение следующих специфичных генов резистентности: CdMDR1, CDR1, CDR2 (системы активного транспорта, резистентность к азолам), CYP51A, ERG11, (ферменты в пути синтеза эргостерола, резистентность к азолам и полиенам), FKS1 (фермент синтеза полисахаридов клеточной стенки, резистентность к эхино-

кандинам), MDR1, MDR3, MDR4, MDR1_5 (системы активного транспорта, резистентность к азолам) [23].

В данной работе рассматривались два основных показателя: наличие в геноме возбудителя генов, ассоциированных с резистентностью, и наличие в этих генах мутаций. Наиболее часто встречались гены систем активного транспорта лекарственного вещества из грибной клетки, ответственные за резистентность к азолам (рис. 1). Это отражает обстоятельство, что антибиотики группы азолов наиболее широко и часто применяются в лечебной практике [24].

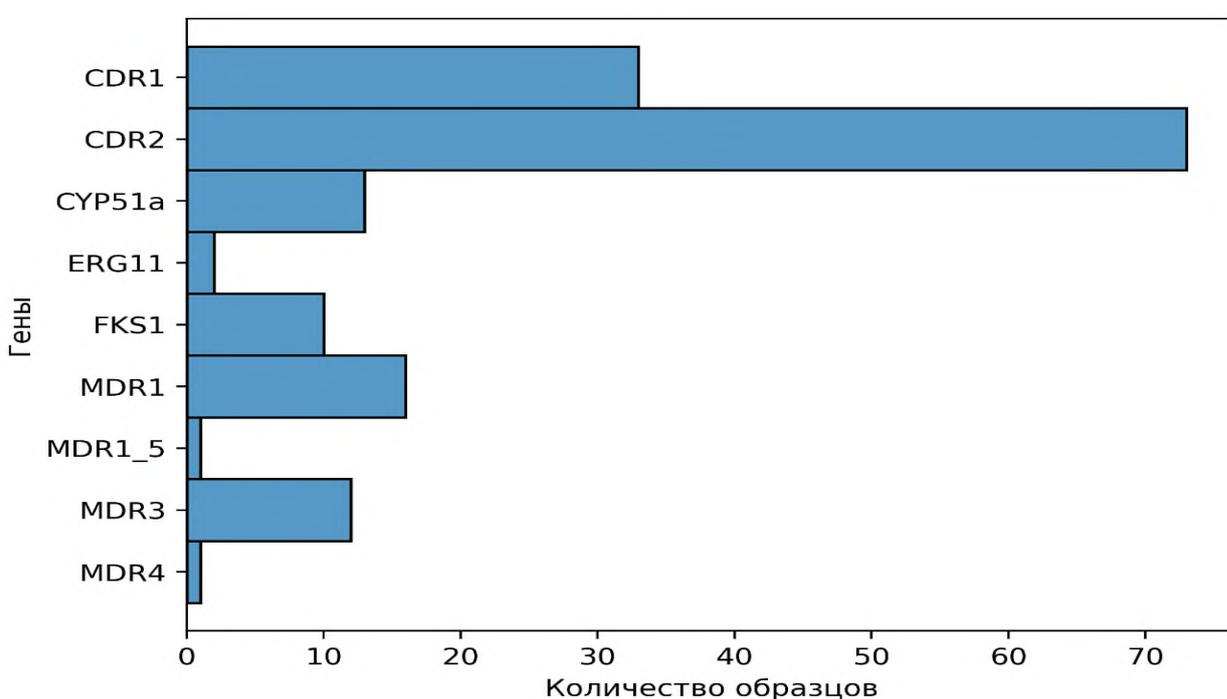


Рис. 1. Встречаемость генов, ассоциированных с резистентностью к противогрибковым средствам.

Следует отметить, что, в отличие от бактерий, факт обнаружения в составе генома патогенного гриба гена, ассоциированного с резистентностью, не будет означать наличие такой резистентности, как и ее отсутствие. У грибов типичными механизмами резистентности являются: наличие системы активного транспорта лекарственного вещества из грибной клетки, мутации фермента-мишени, наличие альтернативного (шунтового) пути метаболизма (например, синтеза эргостерола). В первом случае, в пользу резистентности будет говорить специфичность места связывания транспортируемого вещества к лекарственным веществам определенного класса. Во втором случае, в пользу

резистентности будет говорить наличие такой мутации, которая, не меняя способности связывать субстрат и взаимодействовать с белками-партнерами, тем не менее приводит к снижению способности мишени связывать лекарственное вещество. В третьем случае, потребуется наличие генов всех ферментов альтернативного метаболического пути. Кроме того, во всех трех случаях, ключевую роль будет играть экспрессия перечисленных генов [25].

Исходя из изложенного, одним из направлений совершенствования данного метода должны стать методы анализа данных секвенирования.

Заключение

В ходе выполнения работы были проверены модули идентификации оппортунистических видов грибов и анализа генов, ассоциированных с резистентностью к антимикотикам.

Проведенная видовая идентификация 149 штаммов микромицетов методом NGS приводила к идентичным с рутинными культуральными исследованиями результатам в 49,0%; идентификация до рода – в 98,7%. В группе дрожжевых грибов (123 штамма) результаты видовой идентификации методом NGS и культуральным методом совпадали в 48,0% случаев, в группе мицелиальных грибов (26 штаммов) – в 53,8% случаев. Общий недостаточно высокий уровень сходимости результатов видовой идентификации оппортунистических микромицетов (менее 50%) связан с неспособностью дифференцировать виды из комплекса *C. albicans* по стандартному протоколу рутинной диагностики (использование хромогенных сред). Применение тест-системы NGS в диагностических медицинских лабораториях клиник разного профиля может иметь определяющее значение для изучения эпидемиологии кандидоза, вызываемого политипическими дрожжами комплекса *C. albicans*. Следует отработать видовую идентификацию тест-системой NGS ряда возбудителей аспергиллеза (*A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger*).

Было показано, что тест-система обладает возможностью определения генов-мишеней и мутаций в них, ассоциированных с резистентностью к противогрибковым препаратам. Имеется возможность оценивать наличие мутаций в перечисленных генах, которые должны приводить к развитию резистентности.

(Работа была поддержана грантом АНО «Московский центр инновационных технологий здравоохранения» «Набор реагентов для анализа микробиома человека для выявления количественного и функционального состава грибов с детекцией генов, ответственных за антимикотические свойства, методом NGS»)

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action [Электр. ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threatening-fungi> (дата обращения: 02.12.24).
2. Диагностика и лечение микозов. / Под ред. Д.Р. Хоспентала, М. Дж. Риналди. Пер. с англ. под ред. Ю.В. Сергеева М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. 448 с. [Diagnosis and treatment of mycoses. / Ed. D. R. Hospentala, M. J. Rinaldi. Translated from English. Edited by Yu.V. Sergeev M.: GEOTAR-Media, 2013. 448 p.]
3. Сергеев А.Ю., Сергеев Ю.В. Грибковые инфекции. Руководство для врачей. М.: Бином, 2008. 480 с. [Sergeev A.Yu., Sergeev Yu.V. Fungal infections. A guide for doctors. M.: Binom, 2008. 480 p.]
4. Кулько А.Б., Сафонова С.Г., Иванушкина Т.Н. и др. Лабораторная диагностика легочных микозов во фтизиатрической клинике. Методические рекомендации №24. М. 2019. 28 с. (Рекомендовано Департаментом здравоохранения города Москвы, 17.04.2019 г.). [Kulko A.B., Safonova S.G., Ivanushkina T.N. and others. Laboratory diagnostics of pulmonary mycoses in a phthisiological clinic. Methodological recommendations No. 24. M. 2019. 28 p. (Recommended by the Department of Health of the city of Moscow, 04/17/2019)]
5. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014. 30(15): 2114-2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170.
6. Chen S.F., Zhou Y.Q., Chen Y.R. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*. (2018) 34: 884-80. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.
7. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J*. 2011, 17 (1): 10-12. doi: <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
8. 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.
9. Lu J., Rincon N., Wood D.E. et al. Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc*. 2022. 17(12): 2815-2839. doi: 10.1038/s41596-022-00738-y.
10. 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.
11. Lumpe J., Gumbleton L., Gorzalski A. et al. GAMBIT (Genomic Approximation Method for Bacterial Identification and Tracking): A methodology to rapidly leverage whole genome sequencing of bacterial isolates for clinical identification. *PLoS One*. 2023. 18(2): e0277575. doi: 10.1371/journal.pone.0277575.
12. Shovill. Assemble bacterial isolate genomes from Illumina paired-end reads [Электр. ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/shovill> (дата обращения: 02.12.24).
13. Antifungal Resistance Database [Электр. ресурс]. URL: <http://proteininformatics.org/mkumar/afrbase/home.html> (дата обращения: 02.12.24).
14. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. [Электр. ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения: 02.12.24).
15. Кулько А.Б. Вопросы классификации, таксономии и номенклатуры возбудителей оппортунистических пневмомикозов. *Микология сегодня*. М.: Национальная академия микологии. 2022. Т. 4: 172-181. [Kulko A.B. Classification, taxonomy and nomenclature of opportunistic pneumomycosis pathogens. *Mycology today*. Moscow: National Academy of Mycology. 2022. Vol. 4: 172-181]
16. Index Fungorum. – URL: <http://www.indexfungorum.org/> (дата обращения 02.12.24).
17. MycoBank, the fungal website. – URL: <http://www.mycobank.org/> (дата обращения 02.12.24).
18. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (Centraalbureau voor Schimmelcultures). – URL: https://wi.knaw.nl/fungal_table (дата обращения 02.12.24).
19. Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Открытый каталожный фонд. –

- URL: <https://www.vkm.ru/rus/Cosolidated.htm> (дата обращения 02.12.24). [The All-Russian Collection of Microorganisms (VKM), an open catalog fund. – URL: <https://www.vkm.ru/rus/Cosolidated.htm> (date of request 02.12.24)]
20. Salehipour K., Aboutaleb S.H., Charsizadeh A. et al. Differentiation of *Candida albicans* complex species isolated from invasive and non-invasive infections using *HWP1* gene size polymorphism. *Curr Med Mycol*. 2021. 7(2): 34-38. doi: 10.18502/cmm.7.2.7034.
 21. Кулько А.Б. Атлас условно-патогенных грибов рода *Aspergillus* – возбудителей бронхолегочных инфекций. М.: Типография «Новости», 2012. 160 с. [Kulko A.B. Atlas of conditionally pathogenic fungi of the genus *Aspergillus* – causative agents of bronchopulmonary infections. Moscow: Novosti Printing House, 2012. 160 p.]
 22. Hoog de G.S., Guarro J., Gene J. et al. Atlas of clinical fungi, 2011. Electronic Version 3.1 – CBS: Reus. URL: <http://www.clinicalfungi.org/> (дата обращения 02.12.24).
 22. Czajka K.M., Venkataraman K., Brabant-Kirwan D. et al. Molecular Mechanisms Associated with Antifungal Resistance in Pathogenic *Candida* Species. *Cells*. 2023. 12(22): 2655. doi: 10.3390/cells12222655.
 23. Jangir P., Kalra S., Tanwar S. et al. Azole resistance in *Candida auris*: mechanisms and combinatorial therapy. *APMIS*. 2023. 131(8): 442-462. doi: 10.1111/apm.13336.
 24. Воропаев А.Д., Екатеринчев Д.А., Урбан Ю.Н. и др. Экспрессия CDR1, CDR2, MDR1 и ERG11 у устойчивых к азолам штаммов *Candida albicans*, выделенных от ВИЧ-инфицированных пациентов в городе Москве. *Инфекция и иммунитет*, 2022. Т. 12 (5): 929-937. doi: 10.15789/2220-7619-CCM-1931. [Voropaev A.D., Yekaterinchev D.A., Urban Yu.N., et al. CDR1, CDR2, MDR1 and ERG11 expression in azole resistant *Candida albicans* isolated from HIV-infected patients in city of Moscow. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2022. 12 (5): 929-937. (In Russ.)]

Поступила 3 декабря 2024 г.
Повторно – 19 декабря 2024 г.

(Контактная информация: **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>;

Сведения об авторах

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

Кулько А.Б. – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии², <https://orcid.org/0000-0002-0296-3287>, e-mail: kulko-fungi@yandex.ru;

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

Дубанов А.В. – кандидат биологических наук, аналитик¹, <https://orcid.org/0009-0000-5267-585X>, e-mail: qrcs@mail.ru;

Дудковская А.В. – аналитик, стажёр-исследователь, Международная лаборатория статистической и вычислительной геномики¹, <https://orcid.org/0009-0004-4927-2602>, e-mail: n-dudkovskaya@mail.ru;

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

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

Мругова Т.М. – кандидат медицинских наук, заведующая микробиологической лабораторией¹; <https://orcid.org/0000-0002-4127-7415>; e-mail: MrugovaTM@dcli.ru;

Мигяев О.К. – Заведующий лабораторией клинико-диагностических и генетических ис-

следований¹, <https://orcid.org/0000-0002-0435-9892>; e-mail: MigyaevOK@dcli.ru;

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

Васильева К.В. – аспирант, Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», инженер¹. <https://orcid.org/0009-0003-6939-0617>; e-mail: kiko.00@mail.ru;

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

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

Сафонова С.Г. – доктор биологических наук, заведующий отделом проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии², <https://orcid.org/0000-0002-9542-6252>, e-mail: safonova.s.g.@inbox.ru;

Исакова А.И. – врач клинической лабораторной диагностики централизованной бактериологической лаборатории², <https://orcid.org/0009-0001-2208-5004>, e-mail: isakovaaleks@gmail.com;

Комаров А.Г. – директор¹, <https://orcid.org/0000-0002-0296-3287>, e-mail: KomarovAG@dcli.ru;

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

Образец ссылки на статью:

Сидоренко О.И., Кулько А.Б., Сафина С.А., Дубанов А.В., Дудковская А.В., Филиппов П.Н., Джандарова Д.Т., Мругова Т.М., Мигяев О.К., Спешилов Г.И., Хомякова Е.А., Васильева К.В., Штинова И.А., Шпакова О.Г., Сафонова С.Г., Исакова А.И., Комаров А.Г., Глотов О.С. Разработка тест-системы для детекции патогенных грибов и выявления генов, ассоциированных с их резистентностью к антимикотикам, с применением секвенирования нового поколения. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН 2024. 4: 16с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2024-4/Articles/OIS-2024-4.pdf>) DOI: 10.24411/2304-9081-2024-14002.