

**Молекулярно-генетический анализ возбудителей бактериальных пневмоний, ассоциированных с COVID-19, в стационарах г. Ростова-на-Дону**А.К. Носков¹, А.Ю. Попова², А.С. Водопьянов¹, Р.В. Писанов¹, О.С. Чемисова¹, Н.В. Павлович¹, Ю.В. Демина², Е.Н. Гудуева¹, Е.В. Ковалев³, Г.В. Карпущенко⁴¹ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ул. М. Горького, д. 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Российская Федерация² Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, ул. Баррикадная, д. 2/1, г. Москва, 125993, Российская Федерация³ Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, ул. 18-я линия, д. 17, г. Ростов-на-Дону, 344019, Российская Федерация⁴ ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора, ул. 7-я линия, д. 67, г. Ростов-на-Дону, 344019, Российская Федерация**Резюме**

Введение. Присоединение бактериальной суперинфекции на фоне COVID-19 является одной из основных причин, приводящих к более тяжелому течению болезни у пациента, повышению риска неблагоприятного исхода заболевания и, как следствие, увеличению времени пребывания в стационаре. В связи с этим большое внимание исследователей уделяется изучению генетических маркеров, позволяющих выявлять клональные связи между различными изолятами возбудителей бактериальных коинфекций, что в свою очередь позволяет дифференцировать внутрибольничные и внебольничные случаи заражения.

Цель – изучение генетического разнообразия и клональных связей *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с новой коронавирусной инфекцией в г. Ростове-на-Дону.

Материалы и методы. Исследовали биологический материал от 217 пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония», находившихся на амбулаторном лечении или в стационарах г. Ростова-на-Дону. Полногеномное секвенирование штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* проведено на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Отбор SNP-маркеров проводили с помощью авторского программного обеспечения, написанного на языках Java и Python. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для построения дендрограммы применена программа MEGA 5.

Результаты. Установлен спектр этиологических агентов бактериальной природы, вызывающих развитие вторичной инфекции на фоне COVID-19. По результатам полногеномного секвенирования 10 возбудителей пневмоний, выделенных от пациентов с новой коронавирусной инфекцией, выявлена клональность отдельных штаммов. Доказано внутрибольничное происхождение двух изолятов *P. aeruginosa* и двух – *A. baumannii*, в свою очередь анализ плазмидного состава подтвердил их внутрибольничное происхождение. Присоединение вторичной бактериальной инфекции у пациентов, находящихся на лечении, может быть обусловлено как патологическим развитием доминирующей микрофлоры слизистых верхних дыхательных путей, обеспечивающей нормобиоценоз у здоровых людей, так и несоблюдением в должном объеме принципов противоэпидемического режима и инфекционной безопасности в медицинских организациях в отношении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Заключение. Проведенный анализ позволил определить этиологическую структуру пневмоний, у пациентов с COVID-19. Данные полногеномного секвенирования с последующим биоинформационным анализом позволили выявить внутрибольничное происхождение ряда штаммов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*.

Ключевые слова: COVID-19, внебольничная пневмония, нозокомиальные инфекции, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, SNP-типирование.

Для цитирования: Носков А.К., Попова А.Ю., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Чемисова О.С., Павлович Н.В., Демина Ю.В., Гудуева Е.Н., Ковалев Е.В., Карпущенко Г.В. Молекулярно-генетический анализ возбудителей бактериальных пневмоний, ассоциированных с COVID-19, в стационарах г. Ростова-на-Дону // Здоровье населения и среда обитания. 2021. Т. 29. № 12. С. 64–71. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-12-64-71>

Сведения об авторах:

✉ **Носков** Алексей Кимович – к.м.н., директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: noskov-epid@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>.

Попова Анна Юрьевна – д.м.н., профессор Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; e-mail: kaf.orgses.rmapo@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>.

Водопьянов Алексей Сергеевич – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Писанов Руслан Вячеславович – к.м.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Чемисова Ольга Сергеевна – к.б.н., заведующая лабораторией «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>.

Павлович Наталья Владимировна – д.м.н., заведующая лабораторией ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>.

Демина Юлия Викторовна – д.м.н., профессор Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования; e-mail: kaf.orgses.rmapo@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0538-1992>.

Гудуева Елена Николаевна – младший научный сотрудник «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6114-9891>.

Ковалев Евгений Владимирович – руководитель Управления Роспотребнадзора по Ростовской области; e-mail: master@61.rospotrebнадzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>.

Карпущенко Гарри Викторович – к.м.н., главный врач ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»; e-mail: master@donses.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-8753>.

Информация о вкладе авторов: Носков А.К. – разработка дизайна исследований, анализ полученных данных, написание текста рукописи; Попова А.Ю. – разработка дизайна исследований, анализ полученных данных; Водопьянов А.С. – разработка дизайна исследований, анализ полученных данных, написание текста рукописи; Писанов Р.В. – получение данных для анализа; Чемисова О.С. – разработка дизайна исследований, анализ полученных данных, написание текста рукописи; Павлович Н.В. – получение данных для анализа; Демина Ю.В. – разработка дизайна исследований; Гудуева Е.Н. – получение данных для анализа, анализ полученных данных; Ковалев Е.В. – получение данных для анализа; Карпущенко Г.В. – получение данных для анализа.

Финансирование: исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение правил биоэтики: дизайн исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, протокол № 16 от 05.08.2020.

Статья получена: 27.05.21 / Принята к публикации: 01.12.21 / Опубликована: 15.12.21

Molecular Genetic Analysis of the Causative Agents of COVID-19-Associated Bacterial Pneumonia in Hospitals of Rostov-on-Don

Aleksey K. Noskov,¹ Anna Yu. Popova,² Alexey S. Vodop'ianov,¹ Ruslan V. Pisanov,¹ Olga S. Chemisova,¹ Natalia V. Pavlovich,¹ Yulia V. Demina,² Elena N. Gudueva,¹ Evgeny V. Kovalev,³ Garry V. Karpushchenko⁴

¹Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute,
117/40 Maxim Gorky Street, Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,
2/1 Barrikadnaya Street, Moscow, 125993, Russian Federation

³Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Rostov Region, 17 18th Line Street, Rostov-on-Don, 344019, Russian Federation

⁴Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region,
67 7th Line Street, Rostov-on-Don, 344019, Russian Federation

Summary

Introduction: Hospital-acquired bacterial superinfections in COVID-19 patients are one of the main reasons of a severer course of the disease, a higher risk of adverse outcomes, and, consequently, a longer hospital stay. Much attention is, therefore, paid to the study of genetic markers enabling identification of clonal relationships between different isolates of the causative agents of bacterial co-infections, which, in their turn, help distinguish between hospital- and community-acquired cases of infectious diseases.

Objective: To study the genetic diversity and clonal relationships of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* isolated from patients with a novel coronavirus disease (COVID-19) in Rostov-on-Don.

Materials and methods: We tested biological specimens from 217 in- and outpatients with community-acquired pneumonia in the city of Rostov-on-Don. Whole-genome sequencing of *A. baumannii* and *P. aeruginosa* strains was performed using a MiSeq sequencer (Illumina, USA). SNP markers were selected using proprietary software written in Java and Python. Cluster analysis and dendrogram construction were performed using the author's software using the UPGMA method. The MEGA 5 software was used to build the dendrogram.

Results: We established the spectrum of bacteria causing the development of secondary infection associated with COVID-19. Results of the whole-genome sequencing of 10 pneumonia pathogens isolated from patients with the novel coronavirus disease revealed clonality of individual strains. The nosocomial origin of two isolates of *P. aeruginosa* and two of *A. baumannii* was demonstrated and confirmed by the analysis of their plasmid composition. Secondary bacterial infection in COVID-19 patients may be attributed to the pathological development of the dominant microflora of the upper respiratory tract mucosa, which provides normal biocenosis in healthy people, or non-compliance with basic principles of hospital hygiene and infection control precautions.

Conclusion: The research helped determine the etiological structure of pneumonia in patients with COVID-19. Whole-genome sequencing and the following bioinformatic analysis revealed the nosocomial origin of a number of strains of *P. aeruginosa* and *A. baumannii*.

For citation: Noskov AK, Popova AY, Vodop'ianov AS, Pisanov RV, Chemisova OS, Pavlovich NV, Demina YuV, Gudueva EN, Kovalev EV, Karpushchenko GV. Molecular genetic analysis of the causative agents of COVID-19-associated bacterial pneumonia in hospitals of Rostov-on-Don. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2021; 29(12):64–71. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2021-29-12-64-71>

Author information:

✉ Aleksey K. Noskov, Cand. Sci. (Med.), Director of the Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: noskov-epid@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>.

Anna Yu. Popova, Dr. Sci. (Med.), Professor, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; e-mail: kaf.orgses.rmapo@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4315-5307>.

Alexey S. Vodop'ianov, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Ruslan V. Pisanov, Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Molecular Biology of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>.

Olga S. Chemisova, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Culture Collection of Pathogenic Microorganisms, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>.

Natalia V. Pavlovich, Dr. Sci. (Med.), Head of the Tularemia Laboratory, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8287-4294>.

Yulia V. Demina, Dr. Sci. (Med.), Professor, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education; e-mail: kaf.orgses.rmapo@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0538-1992>.

Elena N. Gudueva, Junior Researcher, Laboratory of Culture Collection of Pathogenic Microorganisms, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute; e-mail: plague@aaanet.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6114-9891>.

Evgeny V. Kovalev, Head of the Office of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the Rostov Region; e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0840-4638>.

Garry V. Karpushchenko, Cand. Sci. (Med.), Chief Physician, Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region; e-mail: master@donses.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4672-8753>.

Author contributions: Noskov A.K., Vodop'ianov A.S., and Chemisova O.S. developed the study conception and design, analyzed data, and wrote the manuscript; Popova A.Yu. developed the study conception and design and interpreted data; Pisanov R.V., Pavlovich N.V., Kovalev E.V., and Karpushchenko G.V. acquired data for analysis; Demina Yu.V. developed the study design; Gudueva E.N. acquired and analyzed data. All authors reviewed the results, contributed to the discussion, and approved the final version of the manuscript.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Respect for patients' rights: The study was conducted in compliance with the ethical standards set out in the Declaration of Helsinki. The study design was approved by the Bioethics Committee of the Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute, Minutes 16 of August 5, 2020.

Received: May 27, 2021 / Accepted: December 1, 2021 / Published: December 15, 2021

Введение. Присоединение бактериальной суперинфекции на фоне COVID-19 является одной из основных причин, приводящих к более тяжелому течению болезни у пациента, повышению риска неблагоприятного исхода заболевания и, как следствие, увеличению времени пребывания в стационаре [1–6]. Так, например, *Acinetobacter baumannii*, резистентный к карбопенемам, явился этиологическим фактором продолжительной вспышки внутрибольничной инфекции в Нью-Джерси, что, по мнению исследователей, было связано с его способностью длительно сохраняться на различных поверхностях и руках медицинских работников [7]. Не меньшую проблему представляет собой синегнойная палочка – *Pseudomonas aeruginosa*, что особенно актуально ввиду приобретения ей множественной антибиотикорезистентности. По данным ряда авторов, *P. aeruginosa* является одним из возбудителей бактериальных пневмоний, ассоциированных с COVID-19 [7–10].

В связи с этим большое внимание исследователей уделяется изучению генетических маркеров, позволяющих выявлять клональные связи между различными изолятами возбудителей бактериальных коинфекций, что в свою очередь позволяет дифференцировать внутрибольничные и внебольничные случаи заражения [11].

Другим важным аспектом является увеличение удельного веса патогенов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, обусловленной конъюгативными плазмидами [12–14]. Согласно данным литературы именно такие плазмиды являются одной из причин формирования внутрибольничных штаммов, обеспечивая их селективное преимущество перед возбудителями внебольничных инфекций [15, 16]. Причем особенно остро эта проблема актуализировалась в период пандемии COVID-19 из-за существенно возросшей нагрузки на стационары. В настоящее время благодаря современным молекулярно-генетическим методам, в частности высокопроизводительному полногеномному секвенированию, становится возможным обнаружение подобных генетических элементов и раскрытие механизмов множественной антибиотикоустойчивости [17, 18].

Ранее нами показано, что особенностью внебольничных пневмоний у больных с лабораторно подтвержденным COVID-19 является более высокая частота микст-инфекций как вирусной, так и бактериальной этиологии, в том числе

характеризующихся полирезистентностью к антибактериальным препаратам [19].

Цель настоящего исследования состояла в изучении генетического разнообразия и клональных связей *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов с новой коронавирусной инфекцией в г. Ростове-на-Дону.

Материалы и методы. В период 2–24 декабря 2020 г. в г. Ростове-на-Дону выполнено исследование 217 проб мокроты от больных с внебольничной пневмонией, находившихся в двух городских больницах г. Ростова-на-Дону, обозначенных как медицинские организации «А» и «Б». Критериями включения в исследование являлись возраст старше 18 лет, установленный диагноз внебольничной пневмонии (J 18.9) согласно Российским национальным рекомендациям по внебольничной пневмонии (2019) и информированное согласие пациента на участие в исследовании. Пациентов обследовали двукратно: при поступлении в стационар и через 6–10 дней после лечения в стационаре.

Для выявления микроорганизмов на объектах окружающей среды отбирали смывы в палатах и других помещениях в соответствии с МУК 4.2.2942–11 «Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях».

Проведен молекулярно-генетический анализ геномного разнообразия возбудителей внебольничных пневмоний, изучено пять штаммов *P. aeruginosa* и пять штаммов *A. baumannii* (табл. 1).

Полногеномное секвенирование проведено на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Для тримминга использовали алгоритм Trimmomatic [20]. Сборку геномов проводили с применением геномного ассемблера Spades [21]. В сравнительный анализ включены данные полногеномного секвенирования штаммов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, полученные из базы данных NCBI. Отбор SNP-маркеров проводили с помощью авторского программного обеспечения, написанного на языках Java и Python [22]. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для визуализации построенной дендрограммы применена программа MEGA 5 [23].

С целью амплификации плазмид из суточных культур микроорганизмов готовили взвесь 10^9 мк.кл./мл в жидкой среде LB, содержащей

Таблица 1. Штаммы, использованные в работе

Table 1. Strains used in the study

Штамм / Strain	Учреждение / Institution	Вид исследования / Type of research
<i>A. baumannii</i>		
39924	МБУЗ «ГБ «А» г. Ростова-на-Дону» / Rostov-on-Don City Hospital A	Первичное исследование / Primary research
39442		
44116		Повторное исследование / Repeated research
44109		
168		
<i>P. aeruginosa</i>		
39926	МБУЗ «ГБ «А» г. Ростова-на-Дону» / Rostov-on-Don City Hospital A	Первичное исследование / Primary research
45048		Повторное исследование / Repeated research
45287	МБУЗ «ГБ «Б» г. Ростова-на-Дону» / Rostov-on-Don City Hospital B	Повторное исследование / Repeated research
45528		Первичное исследование / Primary research
44712		Повторное исследование / Repeated research

смесь антибиотиков (цефтриаксон 5 мкг/мл, хлорамфеникол 5 мкг/мл, цефотаксим 5 мкг/мл), и инкубировали при 37 °С 12 часов. После инкубации 1 мл каждой культуры переносили в пластиковые пробирки. Бактерии осаждали центрифугированием и проводили выделение ДНК с использованием набора реагентов «Рибо-преп» (ООО «Амплисенс», г. Москва).

Результаты и обсуждение. В результате обследования 217 пациентов с диагнозом «внебольничная пневмония» в первый день поступления в стационар медицинских организаций «А» и «Б» наличие SARS-CoV-2 лабораторно подтверждено у 71 пациента (32,7 %). Установлено, что частота случаев ВП увеличивалась пропорционально возрасту пациентов. Так, 76,7 % случаев ВП зарегистрировано у лиц старше 50 лет, при этом наибольшее (32,5 %) число заболевших отмечено среди пациентов от 60 до 69 лет. По данным National Center for Health Statistics, у пожилых людей заболеваемость внебольничной пневмонией в два раза выше, чем у лиц молодого возраста, а сопутствующие заболевания, нередко с декомпенсацией, усложняют лечение больного и ухудшают прогноз заболевания [24]. В связи с этим особенно важно было определить спектр этиологических агентов, способных утяжелить течение внебольничной пневмонии, ассоциированной с COVID-19. В ходе проведенного бактериологического исследования мокроты от больных у 52,1 % (113 из 217) пациентов с внебольничной пневмонией были выявлены возбудители бактериальной и грибковой природы.

Следует отметить, что наиболее часто встречающийся этиологический агент внебольничных пневмоний *Streptococcus pneumoniae* не был обнаружен в данном исследовании, что может быть связано с высоким охватом населения Ростовской области вакцинацией от пневмококков. Наиболее частым этиологическим агентом ВП бактериальной природы являлись плазмокоагулирующие стафилококки (*Staphylococcus aureus*), которые обнаружены у 5,5 % пациентов. Были зарегистрированы случаи выделения представителей семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе *Escherichia coli* (у 1,8 % пациентов) и *Klebsiella pneumoniae* (2,3 %), а также культур неферментирующих грамотрицательных

бактерий (НГБО), преимущественно *A. baumannii* (2,3 %) и *P. aeruginosa* (1,4 %). В структуре изолированной микрофлоры преобладали грибы рода *Candida*, среди которых 71,4 % пришлось на долю *C. albicans* (рис. 1).

Регулярное использование инвазивных методов лечения у пациентов с SARS-CoV-2, применение в схеме лечения данной группы пациентов короткостероидных препаратов увеличивает риск распространения внутрибольничной инфекции среди пациентов. В связи с вышеизложенным проведено повторное обследование пациентов через 6–10 дней после лечения в стационаре. В результате присоединение вторичной инфекции отмечено у 51,6 % пациентов. Из возбудителей бактериальной природы преобладали типичные представители нозокомиальных инфекций – неферментирующие грамотрицательные бактерии *A. baumannii* (у 8,0 % пациентов с вторичной инфекцией), *P. aeruginosa* (3,2 %) и *K. pneumoniae* (6,4 %), в том числе характеризующиеся полирезистентностью к антибактериальным препаратам.

В результате исследования смывов из ООС (палат, коридоров) изолированы устойчивые к широкому спектру антибактериальных препаратов культуры *S. haemolyticus* и *A. baumannii*.

Дальнейшая работа была направлена на анализ источника присоединения вторичной инфекции у пациентов с пневмонией, для этого отобраны штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

Молекулярно-генетический анализ штаммов P. aeruginosa

Проведен сравнительный анализ пяти геномов *P. aeruginosa* и составлен перечень SNP-маркеров для последующего анализа. По итогам этого этапа отобрано 41 898 SNP, расположенных в открытых рамках считывания.

Последующий анализ коллекции геномов *P. aeruginosa*, состоящей из пяти изолятов, выделенных в г. Ростове-на-Дону, и 53 штаммов из базы данных NCBI, позволил построить дендрограмму, отражающую филогенетические связи между изучаемыми штаммами (рис. 2). В ряде случаев прослеживается четкая географическая приуроченность отдельных групп штаммов. Так, например, штаммы, выделенные в Москве в 2019–2020 гг., попали в отдельный кластер,

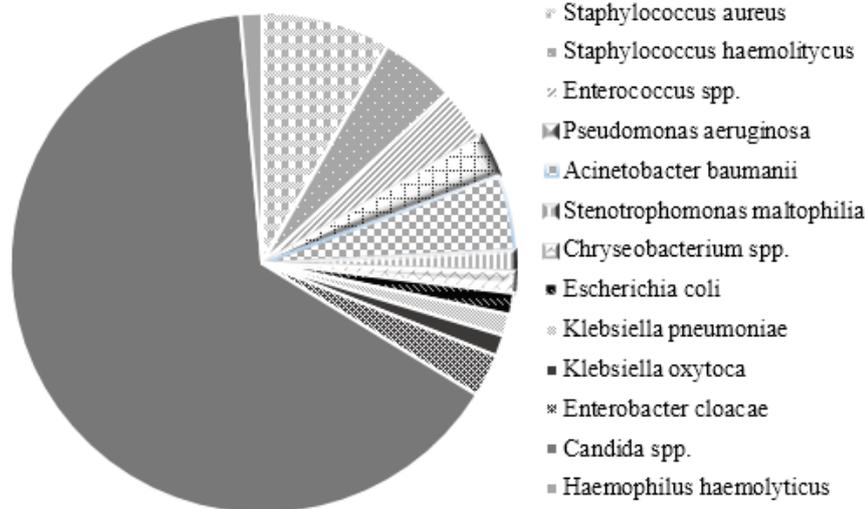


Рис. 1. Спектр этиологических возбудителей внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19

Fig. 1. Spectrum of etiological pathogens of community-acquired pneumonia associated with COVID-19

отличаясь от кластера штаммов из Нижнего Новгорода.

Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные в г. Ростове-на-Дону в 2020 г., распределились между четырьмя кластерами. Изоляты *P. aeruginosa* №№ 44712 и 45287, выделенные в медицинской организации «Б», попали в общий кластер, отличаясь друг от друга по 13 SNP. В совокупности с данными о времени пребывания пациента в стационаре (забор мазка проводился повторно на 10-й день госпитализации) это свидетельствует о внутрибольничном заражении единым клоном *P. aeruginosa*, циркулирующим в данном стационаре. Необходимо отметить, что отличие описанных штаммов от изолята *P. aeruginosa* № 45528, выделенного в этой же больнице, но при взятии биологического материала в день поступления в стационар, составило уже более 8 тысяч SNP, что подтверждает его принадлежность к другому клону и присоединение коинфекции, по-видимому, за счет развития условно-патогенной микрофлоры на фоне поражения респираторной системы вирусом SARS-CoV-2.

Подробный анализ полученных полногеномных последовательностей пяти штаммов *P. aeruginosa* позволил выявить последовательности конъюгативной плазмиды NC11MDR19 размером 19217 п.о., в которой обнаружены 35 генов, в том числе пять идентифицированы как гены множественной антибиотикоустойчивости и один ген – устойчивости к дезинфектантам (табл. 2). Весьма примечательно, что данная плаزمида обнаружена в двух штаммах *P. aeruginosa* №№ 44712 и 45287, выделенных от больных, госпитализированных в медицинскую организацию «Б», что также свидетельствует в пользу их общего внутрибольничного происхождения. Следует отметить, что в смывах из объектов окружающей среды данного стационара штаммы *P. aeruginosa* изолированы не были. Тем не менее результаты проведенных исследований подтверждают внутрибольничное распространение возбудителя нозокомиальной инфекции *P. aeruginosa*. В то же время два штамма *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов стационара «А», отнесены к разным клонам, т. е. доказательств внутрибольничного заражения пациента, проходящего лечение в данной медицинской организации, нами не получено.

Молекулярно-генетический анализ штаммов *A. baumannii*

С целью изучения генетического разнообразия штаммов *A. baumannii* создана рабочая коллекция, в которую вошли пять геномов, полученных из биологического материала от больных, госпитализированных в медицинскую организацию «А», и 61 геном из базы данных NCBI. По итогам составлен перечень из 77 408 SNP, расположенных в открытых рамках считывания, что позволило построить дендрограмму, отражающую степень генетической связи между различными штаммами (рис. 3).

Анализ дендрограммы показал, что штаммы *A. baumannii* №№ 44116 и 44109 представляют собой один клон, отличаясь друг от друга на два SNP. При этом от наиболее генетически близкого им штамма

AbCTX4, выделенного во Франции (2015 г.), их отличало уже 448 SNP. Учитывая, что данные штаммы были отобраны у пациентов на 10-й день госпитализации, это доказывает, что они представляют собой общий внутрибольничный клон, циркулирующий в медицинской организации «А».

Три штамма *A. baumannii* №№ 168, 39442 и 39924 образуют общий кластер, отличаясь между собой на 8-17 SNP. От штамма *A. baumannii* № CriePig87 их отличали 32 единичные нуклеотидные замены. Важно отметить, что два из этих штаммов – №№ 39442 и 39924 – были выделены от пациентов в момент поступления в стационар, в то время как штамм № 168 был выделен из смыва с объектов внешней среды. Сходные данные получены группой авторов при изучении штаммов *A. baumannii* из различных стационаров – были выявлены совпадающие PFGE-типы между клиническими изолятами и штаммами из окружающей среды [25].

Подробный биоинформационный анализ позволил выявить у двух штаммов *A. baumannii*

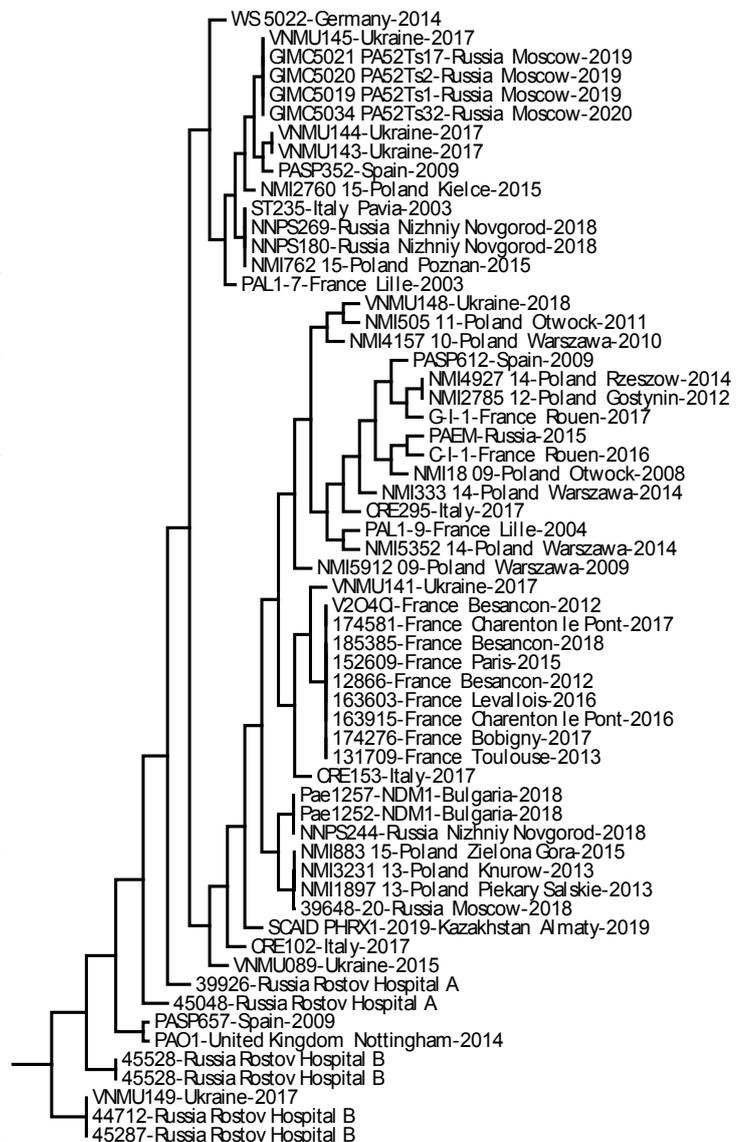


Рис. 2. Дендрограмма, отражающая филогенетические связи между изучаемыми штаммами *P. aeruginosa*

Fig. 2. Dendrogram showing phylogenetic relationships between the studied *P. aeruginosa* strains

Таблица 2. Некоторые гены плазмиды NC11MDR19

Table 2. Some genes of plasmid NC11MDR19

№	Название гена / Gene	Описание / Description
1	Chloramphenicol efflux MFS transporter Cmx	Устойчивость к хлорамфениколу / Resistance to chloramphenicol
2	Dihydropteroate synthase	Устойчивость к сульфаниламидам / Resistance to sulfonamides
3	Mercury (II) reductase	Устойчивость к ртути содержащим препаратам / Resistance to mercury-containing drugs
4	Beta-lactamase OXA-2	Беталактамаза широкого спектра действия / Extended spectrum beta-lactamase
5	Aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-II	Ацетилтрансфераза, устойчивость к аминогликозидам / Acetyltransferase, resistance to aminoglycosides
6	QacAΔ1	Устойчивость к дезинфектантам / Resistance to disinfectants

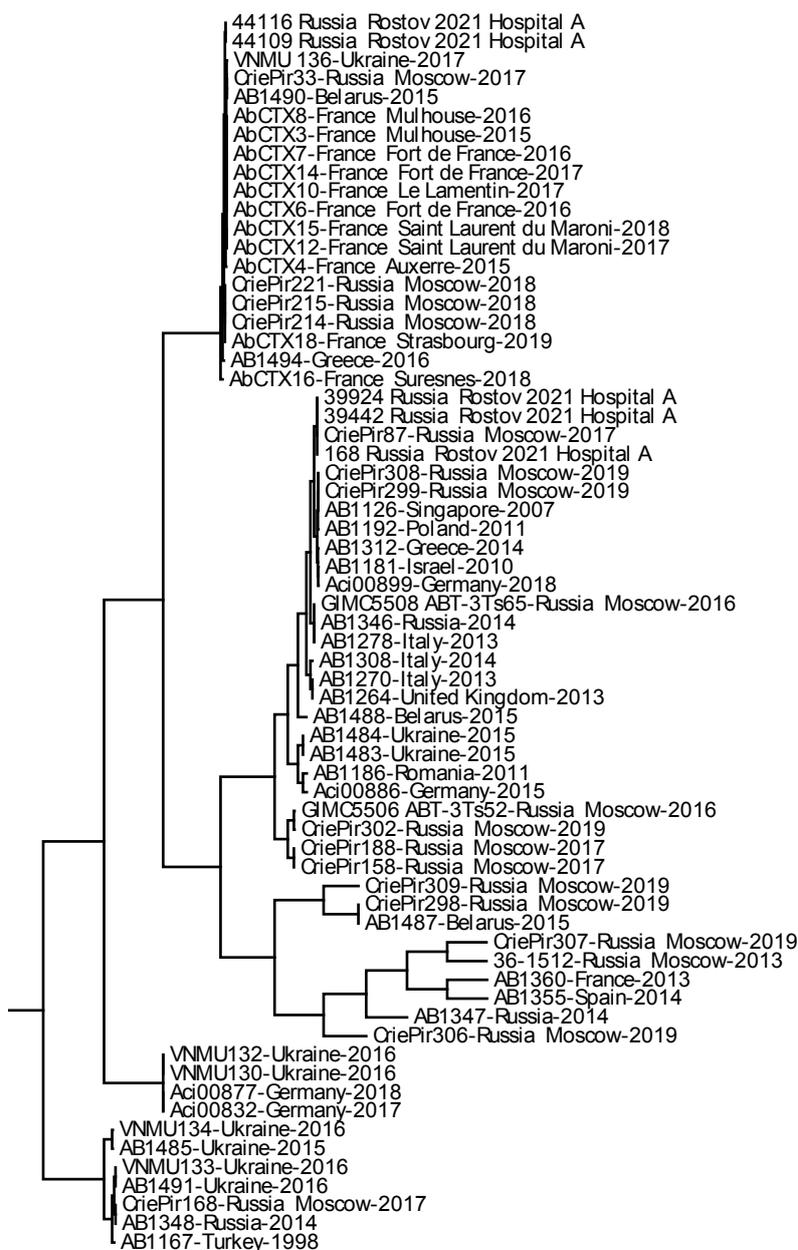


Рис. 3. Дендрограмма, отражающая филогенетические связи между изучаемыми штаммами *A. baumannii*
 Fig. 3. Dendrogram showing phylogenetic relationships between the studied *A. baumannii* strains

№№ 44116 и 44109 конъюгативную плазмиду NC16MDR19 размером 11 194 п.о., несущую ген устойчивости к карбопенемам/пенициллинам. Учитывая, что подобные плазмиды не встречаются у природных штаммов, ее наличие в изучаемых изолятах подтверждает их внутрибольничное происхождение.

Заключение

Таким образом, в ходе проведенного исследования установлен спектр этиологических агентов бактериальной природы, вызывающих развитие вторичной инфекции на фоне COVID-19. По результатам полногеномного секвенирования 10 возбудителей пневмонии, выделенных от пациентов с новой коронавирусной инфекцией, выявлена клональность отдельных штаммов. Доказано внутрибольничное происхождение двух изолятов *P. aeruginosa* и двух – *A. baumannii*, в свою очередь анализ плазмидного состава подтвердил их внутрибольничное происхождение.

Присоединение вторичной бактериальной инфекции у пациентов, находящихся на лечении, может быть обусловлено разными сценариями, одним из которых является патологическое развитие доминирующей микрофлоры слизистых верхних дыхательных путей, обеспечивающей нормобиоценоз у здоровых людей, чему способствует назначение пациентам стероидов и ингибиторов провоспалительных цитокинов, а также эмпирическое применение антибактериальных препаратов широкого спектра действия у пациентов с внебольничными пневмониями, в том числе ассоциированными с COVID-19. В то же время несоблюдение в должном объеме принципов противоэпидемического режима и инфекционной безопасности в медицинских организациях в отношении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), также может служить причиной развития внутрибольничных инфекций у пациентов. Очевидно, что данная ситуация не уникальна, ИСМП являются одной из ведущих проблем здравоохранения. В свою очередь всестороннее изучение и обсуждение факторов регистрации ИСМП, условий, приводящих к их возникновению и распространению в медицинских организациях, в конечном итоге способствуют совершенствованию мероприятий в рамках обеспечения инфекционной безопасности в стационарах.

Список литературы

- Durán-Manuel EM, Cruz-Cruz C, Ibáñez-Cervantes G, et al. Clonal dispersion of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit designed to patients COVID-19. *J Infect Dev Ctries*. 2021;15(1):58–68. doi: 10.3855/jidc.13545
- Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*. 2020;72(10):2097–2111. doi: 10.1002/iub.2356
- Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect*. 2020;104(1):4–11. doi: 10.1016/j.jhin.2019.09.021
- Mohd Sazly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. The global prevalence of multi-drug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. *J Infect*. 2019;79(6):593–600. doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.012
- Эсауленко Н.Б., Ткаченко О.В. Изменение чувствительности бактериальной флоры у больных Covid-19. Результаты собственных исследований // Клиническая лабораторная диагностика. 2021. Т. 66. № S4. С. 80.
- Бисенова Н.М., Ергалиева А.С. Микробиологические показатели пациентов с подтвержденной инфекцией Covid-19 // Наука и Здравоохранение. 2020. № 6. С. 5–10.
- Perez S, Innes GK, Walters MS, et al. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* Infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions – New Jersey, February–July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(48):1827–1831. doi: 10.15585/mmwr.mm6948e1
- Baiou A, Elbuzidi AA, Bakdach D, et al. Clinical characteristics and risk factors for the isolation of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria from critically ill patients with COVID-19. *J Hosp Infect*. 2021;110:165–171. doi: 10.1016/j.jhin.2021.01.027
- Wieland K, Chhatwal P, Vonberg RP. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *Am J Infect Control*. 2018;46(6):643–648. doi: 10.1016/j.ajic.2017.12.014
- Ronda VE, Alcaraz SR, Torregrosa PR, et al. Application of validated severity scores for pneumonia caused by SARS-CoV-2. *Med Clin (Barc)*. 2021;157(3):99–105. doi: 10.1016/j.medcli.2021.01.002
- Acosta F, Fernández-Cruz A, Maus SR, et al. In-depth study of a nosocomial outbreak caused by extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using whole genome sequencing coupled with a polymerase chain reaction targeting strain-specific single nucleotide polymorphisms. *Am J Epidemiol*. 2020;189(8):841–849. doi: 10.1093/aje/kwaa025
- Makke G, Bitar I, Salloum T, et al. Whole-genome-sequencing-based characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* hospital outbreak. *mSphere*. 2020;5(1):e00934–19. doi: 10.1128/mSphere.00934-19
- Hujer AM, Higgins PG, Rudin SD, et al. Nosocomial outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates containing *bla*_{OXA-237} carried on a plasmid. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11):e00797–17. doi: 10.1128/AAC.00797-17
- Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640. doi: 10.1016/j.drup.2019.07.002
- Loraine J, Heinz E, Soontarach R, et al. Genomic and phenotypic analyses of *Acinetobacter baumannii* isolates from three tertiary care hospitals in Thailand. *Front Microbiol*. 2020;11:548. doi: 10.3389/fmicb.2020.00548
- Khatun MN, Farzana R, Lopes BS, Shamsuzzaman SM. Molecular characterization and resistance profile of nosocomial *Acinetobacter baumannii* intensive care unit of tertiary care hospital in Bangladesh. *Bangladesh Med Res Counc Bull*. 2015;41(2):101–107. doi: 10.3329/bmrcb.v41i2.29991
- Murata K, Inoue Y, Kaiho M, et al. Genomic analysis of antibiotic resistance for *Acinetobacter baumannii* in a critical care center. *Acute Med Surg*. 2019;7(1):e445. doi: 10.1002/ams2.445
- Wareth G, Brandt C, Sprague LD, Neubauer H, Pletz MW. Spatio-temporal distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany – A comprehensive systematic review of studies on resistance development in humans (2000–2018). *Microorganisms*. 2020;8(3):375. doi: 10.3390/microorganisms8030375
- Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В. и др. Особенности этиологии внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19. Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 4. С. 99–105. doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
- Водопьянов А.С., Писанов П.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвени-

- рования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. Т. 97. № 6. С. 587–593. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9
23. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
 24. Яковлев С.В. Внебольничная пневмония у пожилых: особенности этиологии, клинического течения и антибактериальной терапии // Русский Медицинский Журнал № 16 от 16.08.1999. С. 763.
 25. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser İÇK; Acinetobacter Study Group [Corporate Author]. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):19. doi: 10.1186/s12941-019-0319-8

References

1. Durán-Manuel EM, Cruz-Cruz C, Ibáñez-Cervantes G, et al. Clonal dispersion of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit designed to patients COVID-19. *J Infect Dev Ctries.* 2021;15(1):58–68. doi: 10.3855/jidc.13545
2. Mirzaei R, Goodarzi P, Asadi M, et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life.* 2020;72(10):2097–2111. doi: 10.1002/iub.2356
3. Nasr P. Genetics, epidemiology, and clinical manifestations of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect.* 2020;104(1):4–11. doi: 10.1016/j.jhin.2019.09.021
4. Mohd Sazly Lim S, Zainal Abidin A, Liew SM, Roberts JA, Sime FB. The global prevalence of multidrug-resistance among *Acinetobacter baumannii* causing hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia and its associated mortality: A systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2019;79(6):593–600. doi: 10.1016/j.jinf.2019.09.012
5. Esaulenko NB, Tkachenko OV. [Change in bacterial flora sensitivity in Covid-19 patients. Results of own research.] *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika.* 2021;66(S4):80. (In Russ.)
6. Bissenova NM, Yergaliyeva AS. Microbiological indicators of patients with confirmed infection Covid-19. *Nauka i Zdravookhranenie.* 2020;22(6):5–10. (In Russ.) doi: 10.34689/SH.2020.22.6.001
7. Perez S, Innes GK, Walters MS, et al. Increase in hospital-acquired carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infection and colonization in an acute care hospital during a surge in COVID-19 admissions – New Jersey, February–July 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2020;69(48):1827–1831. doi: 10.15585/mmwr.mm6948e1
8. Baiou A, Elbuzidi AA, Bakdach D, et al. Clinical characteristics and risk factors for the isolation of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria from critically ill patients with COVID-19. *J Hosp Infect.* 2021;110:165–171. doi: 10.1016/j.jhin.2021.01.027
9. Wieland K, Chhatwal P, Vonberg RP. Nosocomial outbreaks caused by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: Results of a systematic review. *Am J Infect Control.* 2018;46(6):643–648. doi: 10.1016/j.ajic.2017.12.014
10. Ronda VE, Alcaraz SR, Torregrosa PR, et al. Application of validated severity scores for pneumonia caused by SARS-CoV-2. *Med Clin (Barc).* 2021;157(3):99–105. doi: 10.1016/j.medcli.2021.01.002
11. Acosta F, Fernández-Cruz A, Maus SR, et al. In-depth study of a nosocomial outbreak caused by extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* using whole genome sequencing coupled with a polymerase chain reaction targeting strain-specific single nucleotide polymorphisms. *Am J Epidemiol.* 2020;189(8):841–849. doi: 10.1093/aje/kwaa025
12. Makke G, Bitar I, Salloum T, et al. Whole-genome-sequencing-based characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* hospital outbreak. *mSphere.* 2020;5(1):e00934–19. doi: 10.1128/mSphere.00934-19
13. Hujer AM, Higgins PG, Rudin SD, et al. Nosocomial outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates containing *bla_{OXA-237}* carried on a plasmid. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(11):e00797–17. doi: 10.1128/AAC.00797-17
14. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat.* 2019;44:100640. doi: 10.1016/j.drug.2019.07.002
15. Loraine J, Heinz E, Soontarach R, et al. Genomic and phenotypic analyses of *Acinetobacter baumannii* isolates from three tertiary care hospitals in Thailand. *Front Microbiol.* 2020;11:548. doi: 10.3389/fmicb.2020.00548
16. Khatun MN, Farzana R, Lopes BS, Shamsuzzaman SM. Molecular characterization and resistance profile of nosocomial *Acinetobacter baumannii* intensive care unit of tertiary care hospital in Bangladesh. *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 2015;41(2):101–107. doi: 10.3329/bmrcb.v41i2.29991
17. Murata K, Inoue Y, Kaiho M, et al. Genomic analysis of antibiotic resistance for *Acinetobacter baumannii* in a critical care center. *Acute Med Surg.* 2019;7(1):e445. doi: 10.1002/ams2.445
18. Wareth G, Brandt C, Sprague LD, Neubauer H, Pletz MW. Spatio-temporal distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany – A comprehensive systematic review of studies on resistance development in humans (2000–2018). *Microorganisms.* 2020;8(3):375. doi: 10.3390/microorganisms8030375
19. Popova AYU, Ezhlova EB, Demina YuV, et al. Features of etiology of community-acquired pneumonia associated with COVID-19. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy.* 2020;(4):99–105. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2020-4-99-105
20. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
21. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
22. Vodopianov AS, Pisanov RV, Vodopianov SO, Oleynikov IP. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii.* 2020;97(6):587–593. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-9
23. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121
24. Yakovlev SV. [Community-acquired pneumonia in the elderly: features of etiology, clinical course and antibacterial therapy.] *Russkiy Meditsinskiy Zhurnal.* 1999;(16):763. (In Russ.) Accessed December 10, 2021. https://www.rmj.ru/articles/geriatriya/Vnebolnichnaya_pnevmoniya_u_poghilyh_osobennosti_etiologii_klinicheskogo_techeniya_i_antibakterialnoy_terapii/
25. Boral B, Unaldi Ö, Ergin A, Durmaz R, Eser İÇK; Acinetobacter Study Group [Corporate Author]. A prospective multicenter study on the evaluation of antimicrobial resistance and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections in intensive care units with clinical and environmental features. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2019;18(1):19. doi: 10.1186/s12941-019-0319-8

