

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

# **ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**Васильева О.В., Волынкина А.С., Ульшина Д.В.,  
Писаренко С.В., Куличенко А.Н.**

**Ростов-на-Дону, 2024**

**Метагеномное секвенирование – молекулярно-генетический метод исследования, используемый для анализа всех нуклеиновых кислот в исследуемом материале в т.ч. совокупности ДНК/РНК микроорганизмов (вирусов, бактерий, простейших)**

**Основные преимущества:**

- **возможность индикации и идентификации широкого спектра микроорганизмов, в том числе атипичных форм;**
- **выявление некультивируемых и труднокультивируемых микроорганизмов;**
- **открытие новых бактерий и вирусов;**
- **получение новых данных о видовом спектре и генетической гетерогенности микроорганизмов;**
- **отсутствие необходимости выделения культуры.**

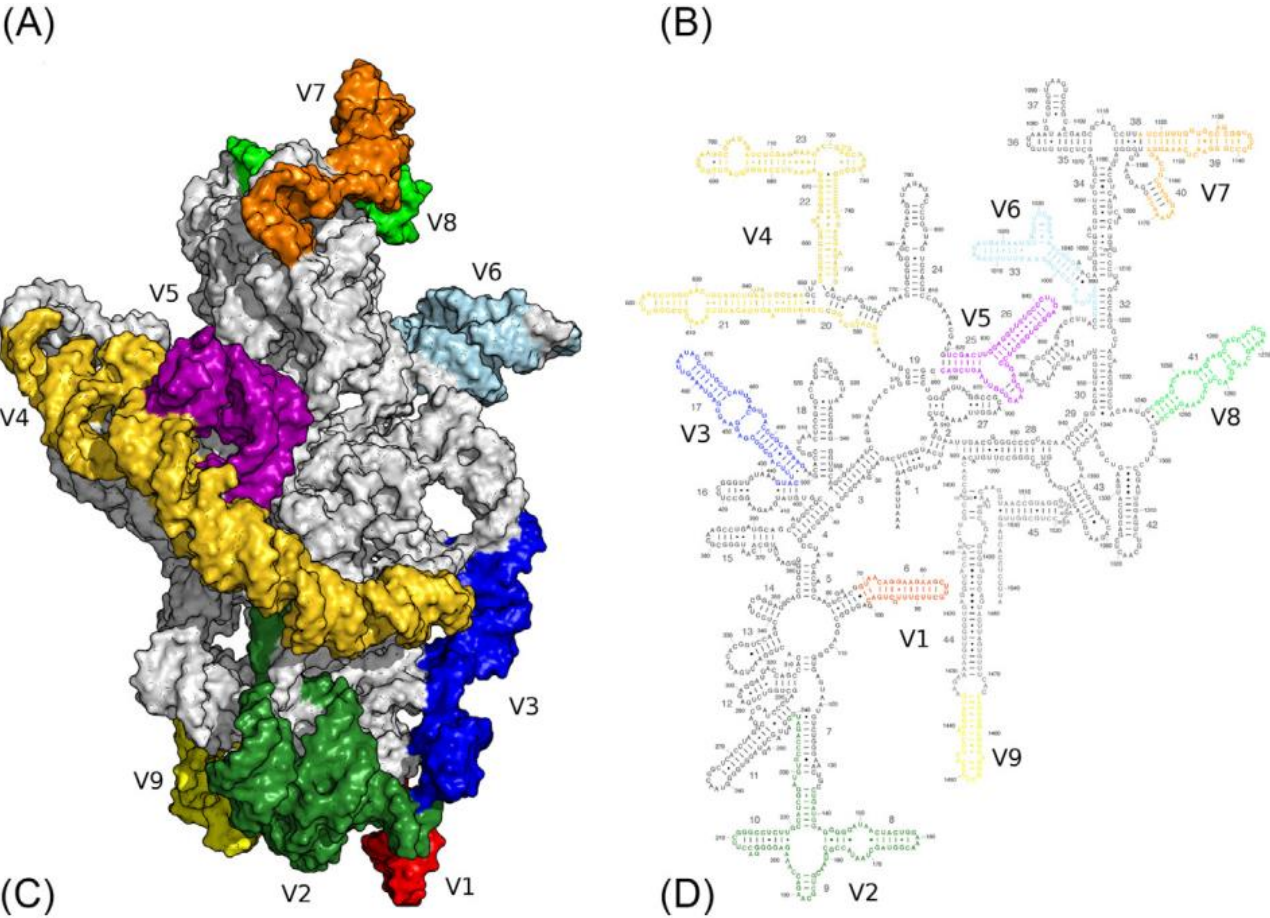
# Основные подходы к проведению метагеномного секвенирования:

- Секвенирование фрагментов ДНК, кодирующих эволюционно-консервативные гены (таргетное секвенирование, ампликонное секвенирование);
- Секвенирование полного метагенома или «полногеномное секвенирование» (секвенирование суммарной ДНК/РНК).

# Преимущества и недостатки основных методов метагеномного секвенирования

Методы метагеномных исследований	Преимущества	Недостатки
Секвенирование фрагментов ДНК, кодирующих эволюционно консервативные гены (последовательность гена 16S РНК и др. генов)	<ul style="list-style-type: none"><li>• проведение таксономической классификации без применения значительных вычислительных мощностей</li><li>• незначительные материальные и временные расходы</li><li>• охват широкого спектра бактериальных таксонов</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• видовая идентификация не всегда возможна</li><li>• отсутствие достоверной информации о структуре сообщества</li></ul>
Секвенирование полного метагенома	<ul style="list-style-type: none"><li>• способность выявлять весь спектр микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы и простейшие)</li><li>• получение данных о наличии факторов патогенности, генов антибиотикоустойчивости</li><li>• позволяет идентифицировать геноварианты выявленных микроорганизмов</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• высокая стоимость</li><li>• повышенные требования к качеству пробоподготовки</li><li>• сложный биоинформационный анализ</li></ul>

# Схематичное изображение вариабельных регионов V1-V9 в структуре гена 16S рРНК



Маркировка фрагмента	Позиции в гене (начало и конец фрагмента)	Длина фрагмента, п.о.
V1-V2	27-338	311
V1-V3	27-534	507
V3-V4	241-748	404
V4	515-806	293
V4-V5	515-944	429
V6-V8	939-1378	439
V7-V9	1115-1492	377

## Цель:

Определить возможность детекции, идентификации и предел обнаружения возбудителей природно-очаговых инфекций *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum* в образцах полевого и клинического материала с различной нагрузкой ДНК методом метагеномного секвенирования гена 16S рРНК.

## Материалы и методы:

16 проб полевого и клинического материала, в которых методом ПЦР обнаружили возбудителей ПОИ.

## Методы исследования:

- Подготовка полевого и клинического материала (МУ 3.1.0322-23);
- Экстракция нуклеиновых кислот (Набор реагентов «РИБО-преп» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия), использовался согласно инструкции производителя);
- Амплификация фрагментов гена 16S рРНК (Смесь праймеров (V1-V2, V1-V3, V3-V4, V4, V4-V5, V6-V8, V7-V9) Abellan-Schneyder с соавт. (2021).;
- Электорофоретическая визуализация продуктов амплификации (1% агарозный гель);
- Очистка продуктов амплификации: набор CleanMag DNA (Евроген, Россия);
- Измерение концентрации продуктов амплификации (флуорометр Qubit, набор реагентов Qubit™ 1X dsDNA High Sensivity и Broad Range (BR);
- Подготовка библиотек ДНК и секвенирование (Протокол IonXpress™ Plus gDNA Fragment Library Preparation (Revision K.0) с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit. Секвенирование смесей ампликонов выполняли с использованием высокопроизводительного секвенатора Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific Inc) по протоколу Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Chef (Revision D.0);
- Бионформационный анализ (проводился в режиме on-line с помощью ресурса EasyMAP).

Результаты эксперимента 1.

Детекция и идентификация возбудителей ПОИ в образцах полевого материала методом метагеномного секвенирования

№ п/п	Данные о пробе	Результат ПЦР	Ct	Результаты 16Sp РНК метагеномного секвенирования	
1	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	21,8	<b><i>Borrelia spp.</i></b>	<i>Flavobacterium haoranii</i> , <i>Morganella psychrotolerans</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Pedobacter mendelii</i> , <i>Cellulophaga baltica</i> , <i>Adhaeribacter swui</i>
2	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	22,1	<b><i>Borrelia spp.</i></b>	<i>Flavobacterium hercynium</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Serratia fonticola</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas encheleia</i> , <i>Aeromonas salmonicida</i> , <i>Alcanivorax dieselolei</i> , <i>Pedobacter roseus</i> , <i>Pedobacter miscanthi</i>
3	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. burgdorferi s.l.</i>	21,1	<b><i>Borrelia spp.</i></b>	<i>Flavobacterium hercynium</i> , <i>Flavobacterium saccharophilum</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Aeromonas encheleia</i>
4	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	31,4	<b>Не обнаружено</b>	<i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i> , <i>Bradyrhizobium amphicarphaeae</i> , <i>Staphylococcus chromogenes</i>
5	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	23,4	<b>Не обнаружено</b>	<i>Candidatus Midichloria mitochondrii</i> , <i>Staphylococcus agnetis</i> , <i>Sphingopyxis sp. MG</i> , <i>Rhizorhabdus dicambivorans</i>
6	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>Rickettsia spp.</i>	17,18	<b><i>R. aeschlimannii</i></b>	<i>Coxiella endosymbiont of Dermacentor marginatus</i> , <i>Arsenophonus nasoniae</i> , <i>Candidatus Midichloria sp. B9</i>
7	<i>Boophilus annulatus</i>	<i>Rickettsia spp.</i>	32,3	<b><i>R. aeschlimannii</i></b>	<i>Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator</i> , <i>Candidatus Coxiella mudrowiae</i> , <i>Staphylococcus agnetis</i> , <i>Sphingopyxis sp. MG</i> , <i>Rhizorhabdus dicambivorans</i>
8	<i>Dermacentor marginatus</i>	<i>F. tularensis</i>	26,6	<b><i>Francisella spp.</i></b>	<i>Pseudomonas spp.</i> , <i>uncultured Hymenobacter sp.</i>
9	Полевка обыкновенная (смыв)	<i>F. tularensis</i>	10,1	<b><i>F. tularensis</i></b>	<i>Desulfovibrio fairfieldensis</i> , <i>Ruminococcus champanellensis</i> , <i>Corynebacterium segmentosum</i> , <i>Eubacterium rangiferina</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Rikenella microfus</i>



# Установление микст-инфицирования возбудителями ПОИ иксодовых клещей методом метагеномного секвенирования

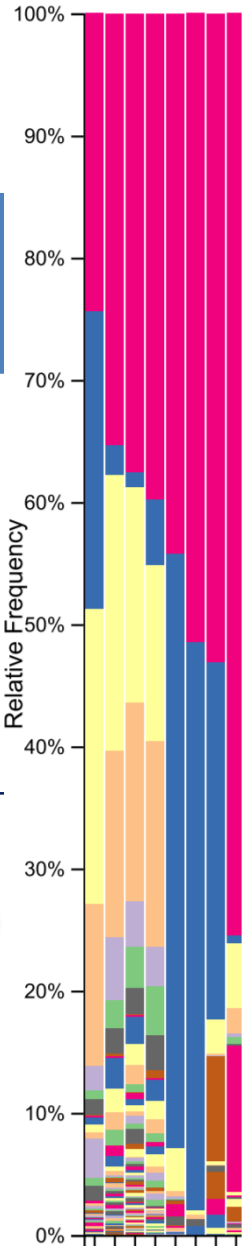
№ п/п	Данные о пробе	Результат ПЦР	Ct	Результаты 16S рРНК метагеномного секвенирования	
1	<i>Hyalomma aegyptium</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	20,24	<i>Borrelia turcica</i> , <i>Borrelia hispanica</i>	<i>Francisella orientalis</i> , <i>Francisella salina</i> <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> sp, <i>Micrococcus</i> sp.
		<i>Rickettsia</i> spp	16,29	<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	
2	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,4	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Flavobacterium</i> spp., <i>Pseudomonas</i> sp. S49, <i>Bradyrhizobium</i> sp. SK17, <i>Methylobacterium</i> sp. NI91, <i>Citrobacter gillenii</i> , uncultured <i>Rickettsiella</i> sp.
		<i>Rickettsia</i> spp.	17	<i>Rickettsia</i> spp.	
3	<i>Ixodes ricinus</i>	<i>B. burgdorferi</i> s.l.	25,7	<i>Borrelia valaisiana</i>	<i>Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator</i> , <i>Flavobacterium</i> sp. Nj-25, <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Bradyrhizobium</i> sp. SK17, <i>Serratia</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp. M55-6N, <i>Rhodococcus corynebacterioides</i> , uncultured <i>Rickettsiella</i> sp.
		<i>Rickettsia</i> spp.	18,79	<i>Rickettsia</i> spp.	
4	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>F. tularensis</i>	25,5	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Francisella persica</i> , <i>Francisella frigiditurreis</i> , <i>Francisella orientalis</i> , <i>Rickettsiella endosymbiont of Pandinus imperator</i> , <i>Spirosoma aureum</i> , uncultured <i>Rickettsiella</i> sp.
		<i>Rickettsia</i> spp.	17,23	<i>Rickettsia aeshlimannii</i>	
5	<i>Dermacentor reticulatus</i>	<i>F. tularensis</i>	12,62	<i>Francisella tularensis</i>	<i>Francisella persica</i> , uncultured <i>Francisella</i> sp. <i>Rickettsia endosymbiont of Bemisia tabaci</i> , <i>Spirosoma litoris</i> , <i>Spirosoma agri</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Bradyrhizobium</i> spp., <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Piscirickettsia salmonis</i> , uncultured <i>Deinococcus</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp., <i>Nocardioides aquaticus</i> , uncultured <i>Rickettsia</i> sp.
		<i>Rickettsia</i> spp	21,05	<i>Rickettsia</i> spp	

Результаты эксперимента 3.

Детекция и идентификация возбудителей ПОИ

в клиническом материале методом метагеномного секвенирования

№ п/п	Данные о пробе	Результат ПЦР	Ct	Результаты 16S рРНК метагеномного секвенирования	
1	Человек (сыворотка крови)	<i>C. burnetii</i>	21,4	<i>C. burnetii</i>	<div><div></div>D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Rhizobiales;D_4__Methylobacteriaceae;D_5__Methylobacterium;D_6__<div></div>D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae;D_5__Streptococcus;D_6__uncultured organism<div></div>D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Gammaproteobacteria;D_3__Pseudomonadales;D_4__Pseudomonadaceae;D_5__Pseudomonas;<div></div>D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Alphaproteobacteria;D_3__Sphingomonadales;D_4__Sphingomonadaceae;D_5__Sphingobium;_<div></div>D_0__Bacteria;D_1__Proteobacteria;D_2__Betaproteobacteria;D_3__Rhodocyclales;D_4__Rhodocyclaceae;D_5__Dechloromonas;_<div></div>D_0__Bacteria;D_1__Firmicutes;D_2__Bacilli;D_3__Lactobacillales;D_4__Streptococcaceae;D_5__Streptococcus;D_6__uncultured bacterium</div>
2	Человек (сыворотка крови)	<i>C. burnetii</i>	21,3	<i>C. burnetii</i>	<div><div></div>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Staphylococcaceae;g__Staphylococcus;_<div></div>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Alphaproteobacteria;o__Sphingomonadales;f__Sphingomonadaceae;g__Sphingomonas;s__yabuuchiae<div></div>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Staphylococcaceae;g__Staphylococcus;s__haemolyticus<div></div>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;f__Alicyclobacillaceae;g__Alicyclobacillus;s__<div></div>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Bacillales;__;__;<div></div>k__Bacteria;p__Firmicutes;c__Bacilli;o__Lactobacillales;f__Aerococcaceae;g__Alloiococcus;s__<div></div>k__Bacteria;p__Proteobacteria;c__Betaproteobacteria;o__Burkholderiales;f__Comamonadaceae;__;__</div>



РЕЗУЛЬТАТЫ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПОИ В ОБРАЗЦАХ ПОЛЕВОГО И КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА С РАЗЛИЧНОЙ НАГРУЗКОЙ ДНК МЕТОДОМ МЕТАГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА 16S рРНК

Возбудитель, подтвержденный методом ПЦР	Значение Ct	Количество ридов	Результаты 16Sp РНК метагеномного секвенирования
<i>Borrelia burgdorferi s.l.</i>	20,24	16336	<i>B. turcica, B. hispanica</i>
	21,1	10627	<i>Borrelia spp.</i>
	21,8	5822	<i>Borrelia spp.</i>
	22,1	20236	<i>Borrelia spp.</i>
	25,4	11506	<i>Borrelia spp.</i>
	25,7	5952	<i>B. valaisiana</i>
<i>Franciella tularensis</i>	12,62	40969	<i>F. tularensis</i>
	10,1	40161	<i>F. tularensis</i>
	26,5	1127	<i>Francisella spp.</i>
<i>Coxiella burnetti</i>	21,3	7223	<i>C. burnetii</i>
	21,4	8926	<i>C. burnetii</i>
<i>Rickettsia spp</i>	16,29	16336	<i>R. aeschlimannii</i>
	17,18	8239	<i>R. aeschlimannii</i>
	17,23	17945	<i>R. aeschlimannii</i>
	18,79	5952	<i>Rickettsia spp.</i>
	21,05	16336	<i>Rickettsia spp.</i>
	32,32	22324	<i>R. aeschlimannii</i>

# Результаты и выводы

- Показана эффективность применения метода метагеномного секвенирования гена 16S рРНК для детекции и идентификации возбудителей ПОИ в пробах клинического и полевого материала.
- Подтверждена возможность идентификации до рода для микроорганизмов *Borrelia*, *Francisella*, *Coxiella*, *Rickettsia*.
- Проведена идентификация до вида: *R. aeschlimannii*, *C. burnetii*, *F. tularensis*, *B. turcica*, *B. hispanica* и *B. valaisiana*

Метод может быть рекомендован в качестве дополнительного для детекции и идентификации возбудителей в случае атипичной картины заболевания, а также для установления случаев микст-инфицирования.

# Вопросы, требующие проведения научных исследований, в т.ч. экспериментальных. Перспективы продолжения исследований

1. Оценка эффективности детекции и идентификации возбудителей ПОИ в различных типах образцов при использовании метагеномного секвенирования.
2. Разработка и совершенствование протоколов пробоподготовки образцов биоматериала (сыворотка крови, органы мелких млекопитающих, суспензии эктопаразитов).
3. Разработка и совершенствование протоколов анализа данных метагеномного секвенирования.
4. Адаптация протоколов метагеномного секвенирования к различным платформам для генетического анализа.
5. Создание унифицированных протоколов анализа и внедрение их в практику для этиологической расшифровки сложных случаев инфекционных заболеваний.

**Благодарю за внимание!**