



Исследование резистоста микробных сообществ человека с помощью таргетной панели генов антибиотикорезистентности у пациентов с COVID-19

О.О. Янушевич¹, И.В. Маев¹, Н.И. Крихели¹, О.В. Левченко¹, Ю.С. Галеева², Е.В. Старикова², Д.Н. Андреев¹, Ф.С. Соколов³, А.К. Фоменко¹, М.К. Девкота¹, Н.Г. Андреев¹, А.В. Заборовский¹, В.В. Евдокимов¹, С.В. Царегородцев¹, Е.Н. Ильина², В.М. Говорун², П.А. Белый¹, Е.А. Сабельникова^{1,3}, А.А. Солодов¹, С.В. Черёмушкин^{1,4}, Р.И. Шабуров^{1,4}, А.Л. Кебина¹

¹ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, Москва, Россия;

²ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва, Россия;

³ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логанова» Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия;

⁴ЧУЗ «Центральная клиническая больница "РЖД-Медицина"», Москва, Россия

Аннотация

Цель. Изучение совокупности генов лекарственной устойчивости (резистоста) в микробиоме кишечника человека и изменений, происходящих с такими генами на фоне терапии COVID-19 в условиях стационара.

Материалы и методы. Проведено одноцентровое ретроспективное когортное исследование. Анализу подлежали только случаи с лабораторно подтвержденной детекцией РНК вируса SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции в образцах оро-/назофарингеального мазка. Из общего списка ретроспективных данных исключены пациенты с документированной (по анамнестическим данным и/или по данным обследования в период госпитализации) органической патологией со стороны гепатобилиарной системы, злокачественными новообразованиями любой локализации, системными и аутоиммунными заболеваниями, а также беременные. У всех участников исследования производился сбор кала для последующего проведения метагеномного секвенирования. Итоговая когорта разделена на 2 группы в зависимости от динамики течения заболевания: легкое течение (группа 1) и тяжелое течение (группа 2). Внутри группы 2 сформированы 5 подгрупп в зависимости от наличия приема антибактериальных препаратов (АБП): группа 2А (с приемом АБП), группа 2АС (прием АБП до госпитализации), группа 2AD (прием АБП во время госпитализации), группа – 2АЕ (прием АБП во время и до госпитализации), группа 2В (без приема АБП).

Результаты. Медиана количества генов антибиотикорезистентности – АБР (кумулятивное во всех временных точках) оказалась достоверно выше в группе пациентов, принимавших АБП: 81,0 (95% доверительный интервал – ДИ 73,8–84,5) против 51,0 (95% ДИ 31,1–68,4). В группе пациентов, принимавших АБП (2А), среднее количество генов множественной лекарственной устойчивости (эффлюксные системы) оказалось значимо выше, чем у лиц контроля (группа 2В): 47,0 (95% ДИ 46,0–51,2) против 21,5 (95% ДИ 7,0–43,9). У пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции отмечалась тенденция к выявлению более высокой медианы количества генов АБР, однако без статистической достоверности. Пациенты из группы с тяжелым течением COVID-19, не принимавшие АБП до момента госпитализации и не имеющие среди назначений АБП, тоже обладали большим числом генов резистентности, чем пациенты противоположной группы.

Заключение. Настоящее исследование демонстрирует, что в группе с более легкой динамикой течения заболевания выявлено меньшее количество генов АБР, чем в группе с более тяжелым течением заболевания, где отмечалось увеличение генов АБР, среди которых доминировали отдельные 5 генов (*SUL1*, *MSRC*, *ACRE*, *EFMA*, *SAT*).

Ключевые слова: коронавирус, COVID-19, SARS-CoV-2, антибиотикорезистентность, тяжесть течения заболевания, ген, резистом, секвенирование, эффлюксный насос

Для цитирования: Янушевич О.О., Маев И.В., Крихели Н.И., Левченко О.В., Галеева Ю.С., Старикова Е.В., Андреев Д.Н., Соколов Ф.С., Фоменко А.К., Девкота М.К., Андреев Н.Г., Заборовский А.В., Евдокимов В.В., Царегородцев С.В., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Белый П.А., Сабельникова Е.А., Солодов А.А., Черёмушкин С.В., Шабуров Р.И., Кебина А.Л. Исследование резистоста микробных сообществ человека с помощью таргетной панели генов антибиотикорезистентности у пациентов с COVID-19. Терапевтический архив. 2023;95(12):1103–1111. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202490

© ООО «КОНСИЛИУМ МЕДИКУМ», 2023 г.

Информация об авторах / Information about the authors

[✉]Соколов Филипп Сергеевич – преподаватель каф. фармакологии лечебного фак-та НОИ «Высшая школа клинической медицины им. Н.А. Семашко» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». E-mail: phlppsokolov@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2813-6498

Янушевич Олег Олегович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., ректор, зав. каф. пародонтологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-4293-8465

Маев Игорь Вениаминович – акад. РАН, д-р мед. наук, проф., зав. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0001-6114-564X

Крихели Нателла Ильинична – д-р мед. наук, проф., зав. каф. клинической стоматологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-8035-0638

Левченко Олег Валерьевич – д-р мед. наук, проф., зав. каф. нейрохирургии и нейрореанимации ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0003-0857-9398

Галеева Юлия Сергеевна – мл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0001-6304-4607

[✉]Philipp S. Sokolov. E-mail: phlppsokolov@gmail.com; ORCID: 0000-0003-2813-6498

Oleg O. Yanushevich. ORCID: 0000-0002-4293-8465

Igor V. Maev. ORCID: 0000-0001-6114-564X

Natella I. Krikheli. ORCID: 0000-0002-8035-0638

Oleg V. Levchenko. ORCID: 0000-0003-0857-9398

Julia S. Galeeva. ORCID: 0000-0001-6304-4607

Study of the resistome of human microbial communities using a targeted panel of antibiotic resistance genes in COVID-19 patients

Oleg O. Yanushevich¹, Igor V. Maev¹, Natella I. Krikheli¹, Oleg V. Levchenko¹, Julia S. Galeeva², Elizaveta V. Starikova², Dmitry N. Andreev¹, Philipp S. Sokolov^{2,3}, Aleksei K. Fomenko¹, Mikhail K. Devkota¹, Nikolai G. Andreev¹, Andrew V. Zaborovsky¹, Vladimir V. Evdokimov¹, Sergey V. Tsaregorodtsev¹, Elena N. Ilina², Vadim M. Govorun², Petr A. Bely¹, Elena A. Sabelnikova^{1,3}, Aleksandr A. Solodov¹, Sergei V. Cheremushkin^{1,4}, Rafik I. Shaburov^{1,4}, Anastasii L. Kebina¹

¹Russian University of Medicine, Moscow, Russia;

²Research Institute for Systems Biology and Medicine, Moscow, Russia;

³Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow, Russia;

⁴Central Clinical Hospital «Russian Railways Medicine», Moscow, Russia

Abstract

Aim. To study overall drug resistance genes (resistome) in the human gut microbiome and the changes in these genes during COVID-19 in-hospital therapy.

Materials and methods. A single-center retrospective cohort study was conducted. Only cases with laboratory-confirmed SARS-CoV-2 RNA using polymerase chain reaction in oro-/nasopharyngeal swab samples were subject to analysis. The patients with a documented history of or current comorbidities of the hepatobiliary system, malignant neoplasms of any localization, systemic and autoimmune diseases, as well as pregnant women were excluded. Feces were collected from all study subjects for subsequent metagenomic sequencing. The final cohort was divided into two groups depending on the disease severity: mild (group 1) and severe (group 2). Within group 2, five subgroups were formed, depending on the use of antibacterial drugs (ABD): group 2A (receiving ABD), group 2AC (receiving ABD before hospitalization), group 2AD (receiving ABD during hospitalization), group 2AE (receiving ABD during and before hospitalization), group 2B (not receiving ABD).

Results. The median number of antibiotic resistance (ABR) genes (cumulative at all time points) was significantly higher in the group of patients treated with ABD: 81.0 (95% CI 73.8–84.5) vs. 51.0 (95% CI 31.1–68.4). In the group of patients treated with ABD (2A), the average number of multidrug resistance genes (efflux systems) was significantly higher than in controls (group 2B): 47.0 (95% CI 46.0–51.2) vs. 21.5 (95% CI 7.0–43.9). Patients with severe coronavirus infection tended to have a higher median number of ABR genes but without statistical significance. Patients in the severe COVID-19 group who did not receive ABD before and during hospitalization also had more resistance genes than the patients in the comparison group.

Conclusion. This study demonstrated that fewer ABR genes were identified in the group with a milder disease than in the group with a more severe disease associated with more ABR genes, with the following five being the most common: *SUL1*, *MSRC*, *ACRE*, *EFMA*, *SAT*.

Keywords: coronavirus, COVID-19, SARS-CoV-2, antibiotic resistance, disease severity, gene, resistome, sequencing, efflux pump

For citation: Yanushevich OO, Maev IV, Krikheli NI, Levchenko OV, Galeeva JS, Starikova EV, Andreev DN, Sokolov PhS, Fomenko AK, Devkota MK, Andreev NG, Zaborovsky AV, Evdokimov VV, Tsaregorodtsev SV, Ilina EN, Govorun VM, Bely PA, Sabelnikova EA, Solodov AA, Cheremushkin SV, Shaburov RI, Kebina AL. Study of the resistome of human microbial communities using a targeted panel of antibiotic resistance genes in COVID-19 patients. *Terapevticheskiy Arkhiv (Ter. Arkh.)*. 2023; 95(12):1103–1111. DOI: 10.26442/00403660.2023.12.202490

Информация об авторах / Information about the authors

Старикова Елизавета Валентиновна – науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0001-6582-210X

Elizaveta V. Starikova. ORCID: 0000-0001-6582-210X

Андреев Дмитрий Николаевич – канд. мед. наук, доц., доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-4007-7112

Dmitry N. Andreev. ORCID: 0000-0002-4007-7112

Фоменко Алексей Константинович – преп. каф. фармакологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-1794-7263

Aleksei K. Fomenko. ORCID: 0000-0002-1794-7263

Девкота Михаил Кумарович – преп. каф. фармакологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-3736-4196

Mikhail K. Devkota. ORCID: 0000-0002-3736-4196

Андреев Николай Германович – канд. мед. наук, доц., доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-5136-0140

Nikolai G. Andreev. ORCID: 0000-0002-5136-0140

Заборовский Андрей Владимирович – д-р мед. наук, доц., зав. каф. фармакологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-7923-9916

Andrew V. Zaborovsky. ORCID: 0000-0002-7923-9916

Евдокимов Владимир Вячеславович – д-р мед. наук, проф. каф. клинической функциональной диагностики ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0001-9281-579X

Vladimir V. Evdokimov. ORCID: 0000-0001-9281-579X

Царегородцев Сергей Вадимович – преп. каф. фармакологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-0254-0516

Sergey V. Tsaregorodtsev. ORCID: 0000-0002-0254-0516

Илина Елена Николаевна – чл.-кор. РАН, проф. РАН, д-р биол. наук, гл. науч. сотр. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-0130-5079

Elena N. Ilina. ORCID: 0000-0003-0130-5079

Введение

Антибиотикорезистентность

Устойчивость бактериальной флоры к противомикробным препаратам, возникающая на фоне терапии антибиотиками (АБ), становится одной из значимых проблем медицины XXI в. На распространение устойчивых бактерий во время пандемии влияют такие факторы, как чрезмерное назначение АБ, самолечение и отсутствие диагностических тестов для определения конкретной причины заболевания [1, 2].

По данным крупного исследования по устойчивости к противомикробным препаратам, инициированного премьер-министром Британии в июле 2014 г., антибиотикорезистентность (АБР) может стать причиной летальных исходов до 10 млн человек в год к 2050 г. [3, 4]. Результаты, полученные С. Мунгау и соавт., указывают на то, что 4,95 млн смертей во всем мире за 2019 г. связаны наличием АБР бактерий к назначаемым АБ [5]. Специалисты Всемирной организации здравоохранения и многочисленные исследователи также подчеркивают, что распространение АБР к противомикробным препаратам является актуальной проблемой, требующей глобального, скоординированного алгоритма действий, направленных на решение складывающейся ситуации [1, 6–9].

Согласно данным специального отчета о влиянии схем лечения COVID-19 в США на устойчивость к противомикробным средствам, опубликованного в 2022 г. [2], до октября 2020 г. почти 80% пациентов, госпитализированных с COVID-19, получали АБ, и только к концу 2021 г. назначения АБ-препаратов (АБП) начали сокращать. По данным W. Song и соавт. установлено, что общий показатель назначения АБ пациентам с COVID-19 снизился с 82,3 до 39,7% в период с декабря 2019 по июнь 2020 г. и с июня 2020 по март 2021 г. соответственно [6].

Некоторые исследования показали более высокую распространенность бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью у пациентов с коронавирусной инфекцией по сравнению с пациентами, не страдающими COVID-19, особенно в отделениях интенсивной терапии (74,2% против 60,3%; $p=0,052$) [8]. Согласно систематическому обзору В. Langford и соавт. (2023 г.), частота бактериальных инфекций, устойчивых к противомикробным препаратам, у госпитализированных пациентов с COVID-19 и бактериальными инфекциями составила примерно 60,8%, также установлено, что приблизительно 37,5% бактериальных изолятов тоже проявляли устойчивость [7].

Эти данные подчеркивают необходимость глобальных скоординированных действий для решения проблемы АБР.

Цель исследования – изучение совокупности генов лекарственной устойчивости (резистомы) в микробиоме кишечника человека и изменений, происходящих с такими генами на фоне терапии COVID-19 в условиях стационара.

Материалы и методы

Дизайн исследования

В Клиническом центре COVID-19 на базе клинического медицинского центра «Кусково» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» проведено проспективное сравнительное исследование в 2 параллельных когортах (группах).

В исследование включены 60 пациентов, госпитализированных в период с апреля по июнь 2021 г. с верифицированным диагнозом COVID-19 на основании лабораторно подтвержденной детекции РНК вируса SARS-CoV-2 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в образцах оро-/назофарингеального мазка. Пациенты с подозрением на COVID-19 на основании одних только симптомов или

Информация об авторах / Information about the authors

Говорун Вадим Маркович – акад. РАН, д-р биол. наук, проф., дир. ФБУН НИИ СБМ. ORCID: 0000-0003-0837-8764

Белый Петр Александрович – канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0001-5998-4874

Сабельникова Елена Анатольевна – д-р мед. наук, проф. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», зам. дир. по научной работе ГБУЗ «МКНЦ им. А.С. Логинова». ORCID: 0000-0001-7519-2041

Солодов Александр Анатольевич – д-р мед. наук, дир. НОИ «Высшая школа клинической медицины им. Н.А. Семашко» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-8263-1433

Черёмушкин Сергей Викторович – канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та НОИ «Высшая школа клинической медицины им. Н.А. Семашко» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», зам. гл. врача по терапевтической деятельности ЧУЗ «ЦКБ "РЖД-Медицина"». ORCID: 0000-0002-0982-2006

Шабуров Рафик Исакович – канд. мед. наук, доц. каф. пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии лечебного фак-та НОИ «Высшая школа клинической медицины им. Н.А. Семашко» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины», гл. врач ЧУЗ «ЦКБ "РЖД-Медицина"». ORCID: 0000-0001-9741-0150

Кебина Анастасия Леонидовна – зам. глав. врача НОИ «Высшая школа клинической медицины им. Н.А. Семашко» Университетской клиники, ассистент каф. терапии, клинической фармакологии и скорой медицинской помощи ФГБОУ ВО «Российский университет медицины». ORCID: 0000-0002-7570-9650

Vadim M. Govorun. ORCID: 0000-0003-0837-8764

Petr A. Bely. ORCID: 0000-0001-5998-4874

Elena A. Sabelnikova. ORCID: 0000-0001-7519-2041

Aleksandr A. Solodov. ORCID: 0000-0002-8263-1433

Sergei V. Cheremushkin. ORCID: 0000-0002-0982-2006

Rafik I. Shaburov. ORCID: 0000-0001-9741-0150

Anastasii L. Kebina. ORCID: 0000-0002-7570-9650

данных компьютерной томографии (КТ) без верификации вируса методом ПЦР в исследовании не включались.

Пациенты соответствовали всем перечисленным критериям включения в исследование:

- мужчины и женщины в возрасте от 18 лет с подтвержденным диагнозом «U07.2 Коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2» по данным ПЦР (оро-/назофарингеальный мазок);
- легкая и тяжелая динамика течения коронавирусной инфекции (1–3-я степень тяжести пневмонии по данным КТ);
- подписанное добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Пациента не включали в исследование или исключали из него, если он соответствовал хотя бы одному из приведенных критериев невключения/исключения:

- злокачественные новообразования любой локализации;
- хронические заболевания печени инфекционной и неинфекционной этиологии;
- хронические заболевания почек;
- хроническая печеночная и почечная недостаточность;
- системные и аутоиммунные заболевания;
- сопутствующие тяжелые соматические и психические патологии;
- беременность;
- участие в другом клиническом исследовании в настоящее время или в последние 30 дней;
- любые другие причины медицинского и немедицинского характера, которые, по мнению врача, могут препятствовать участию пациента в исследовании.

Пациенты распределялись на 2 группы исходя из тяжести течения заболевания на пациентов со стабильной динамикой, более легким течением заболевания (группа 1) и пациентов с более тяжелым течением и эпизодами отрицательной динамики (прогрессирование пневмонии по данным КТ, развитие осложнений заболевания, перевод пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии, летальный исход, клинические состояния, требующие усиления фармакотерапии и применения интервенционных методов лечения, включая дополнительную инсуффляцию кислорода и искусственную вентиляцию легких – группа 2); **рис. 1**.

Критерии оценки тяжести, схемы лечения, как и интерпретация клинических данных, основывались на актуальных на тот момент временных методических рекомендациях от Минздрава России (версия 10, 08.02.2021).

Классификация COVID-19 по степени тяжести

Легкое течение (группа 1): T тела $>38^{\circ}\text{C}$, кашель, слабость, боли в горле; одышка при физических нагрузках; отсутствие критериев тяжелого течения; $\text{SpO}_2 < 95\%$; С-реактивный белок сыворотки крови >10 мг/л, повышение до 60 мг/л; изменения в легких при КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения; степень поражения КТ-1–2.

Тяжелое течение (группа 2): частота дыхательных движений >30 /мин; $\text{SpO}_2 \leq 93\%$; $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ мм рт. ст.; снижение уровня сознания, агитация; нестабильная гемодинамика (систолическое артериальное давление менее 90 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление менее 60 мм рт. ст., диурез – менее 20 мл/ч); С-реактивный белок – повышение >60 мг/л; изменения в легких при КТ (рентгенографии), типичные для вирусного поражения; степень поражения КТ 3–4.

Внутри группы 2 сформированы 4 подгруппы в зависимости от наличия приема АБП: группа 2А (с приемом АБП), группа 2АС (прием АБП до госпитализации), груп-

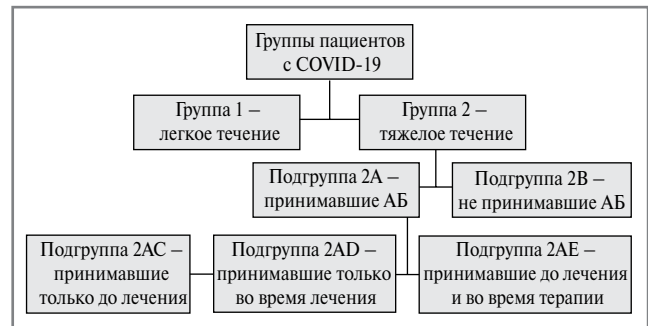


Рис. 1. Распределение пациентов по группам.

Fig. 1. Distribution of patients by groups.

па 2АД (прием АБП во время госпитализации), группа – 2АЕ (прием АБП во время и до госпитализации); из когорты выделена группа 2В (без приема АБП).

При анализе данных также учитывалась длительность госпитализации, количество АБП, которые могли назначаться 1 пациенту, и общее количество лекарственных препаратов за весь курс госпитализации на 1 пациента. Длительность госпитализации составляла от 6 до 19 дней в зависимости степени тяжести заболевания.

Образцы

Сбор образцов кала производился у пациентов в момент поступления в госпиталь. Образец кала объемом от 5 до 15 мл помещался в стерильный контейнер и хранился при -70°C .

Выделение ДНК, подготовка библиотек и секвенирование

Выделение ДНК производилось с помощью набора MagMAX™ Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit и KingFisher™ Purification System согласно инструкции производителя. Выделенная ДНК (100 нг) использована для приготовления библиотек с использованием KAPA HyperPlus Kit (Roche, Switzerland) и KAPA HyperExplore MAX (Roche, Switzerland) согласно инструкции производителя.

Высокопроизводительное секвенирование полученных библиотек выполнено на платформе MGI DNBSEQ-G400 с использованием наборов реагентов MGIEasy Universal Library Conversion Kit (App-A), High-throughput Sequencing Primer Kit-C (App-C), DNBSEQ-G400RS High-throughput Rapid Sequencing Kit (FCS PE100) и DNBSEQ-G400RS Rapid Sequencing Flow Cell (FCS) в соответствии с протоколом производителя.

Контроль качества и деконтаминация

Удаление адаптеров и фильтрация ридов по качеству производилась с применением инструмента Trimmomatic (v.0.39-2) со следующими параметрами: SLIDINGWINDOW:10:20, LEADING:20, TRAILING:20, MINLEN:75. Таким образом, в дальнейшем анализе использовались только риды длиннее 75 п.н.

Для удаления контаминантных последовательностей риды картировались на последовательность генома человека GTCh38 (hg38) с применением инструмента bowtie2 (v2.4.2). Риды, картировавшиеся на последовательность генома человека, удаляли и не использовали в дальнейшем анализе.

Представленность генов АБП

Риды, не картировавшиеся на последовательность генома человека, картировались на референсную базу из 4937 последовательностей детерминант АБП. Последовательно-

сти, картировавшиеся амбивалентно на разные гены АР (например, *ERMB* и *ERMF*), удаляли и не использовали в дальнейшем анализе.

Для каждого из 646 генов, представленных в 4937 геновариантах, получены значения суммы ридов, картировавшихся на все геноварианты данного гена. Эти значения использовались в дальнейшем анализе дифференциальной представленности последовательностей детерминант АБР.

Производили фильтрацию, в ходе которой отбрасывали редко встречающиеся гены, представленные менее чем в 20% образцов, как неинформативные для проведения сравнительного анализа между группами. В сравнительном анализе использовали 185 генов АБР, присутствующих более чем в 20% образцов.

Сравнение представленности генов АБР между группами пациентов

Мы произвели сравнение групп пациентов «легкое течение» и «тяжелое течение» с применением DeSeq2 (Differential Expression analysis for Sequence Count data) с помощью R-пакета DESeq2. Данный метод позволяет анализировать дифференциальную представленность последовательностей в биологических образцах 2 групп и более. Данный метод использует нормализацию данных, при которой учитываются различия в глубине покрытия каждого образца и дисперсия, также производится поправка на множественные сравнения по методу Бенджамини–Хохберга.

Таргетная панель зондов на основе базы MEGARes 2.0

Разработана таргетная панель зондов на основе базы данных MEGARes 2.0, которая содержит информацию об устойчивости микроорганизмов к противомикробным препаратам. Из базы отобрано 4937 генов, детерминирующих устойчивость к основным АБ, используемым в клинической практике. С использованием панели отсекарованы образцы мазков фекалий.

Проанализирована совокупность генов устойчивости к АБ в микробных сообществах кишечника (резистом), что позволило определить принадлежность микроорганизмов к определенному классу, порядку, семейству, роду и иногда виду на основе различия в последовательности генов, кодирующих бактериальную рРНК.

Общая длина 4937 нуклеотидных последовательностей составила 4 803 602 п.н. На основе 4937 последовательностей получено 5277 зондов: 4621 последовательность покрытия 1 зондом, 294 последовательности покрытия 2 зондами, 20 последовательностей покрытия 3 зондами и 2 последовательности покрытия 4 зондами.

Лекарственные препараты и схемы лечения пациентов

Перечень лекарственных групп, используемых в стандартных схемах лечения пациентов с диагнозом COVID-19 в больнице «Кусково» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины»:

1. Ингибиторы протонной помпы (омепразол).
2. Глюкокортикостероиды – ГКС (дексаметазон).
3. Антикоагулянты (эноксапарин натрия, аторвастатин, гепарин).
4. Муколитики (АЦЦ®).
5. АБП (пенициллины, цефалоспорины, макролиды, фторхинолоны).
6. Противовирусные средства (Арбидол®).
7. Гипотензивные средства (β-адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы кальциевых каналов, антагонисты альдостероновых рецепторов).

каторы кальциевых каналов, антагонисты альдостероновых рецепторов).

8. Гипогликемические средства (Актрапид®, инсулин гларгин).

9. Пробиотики (Энтерол®, Линекс®).

10. Анальгетические средства/нестероидные противовоспалительные препараты (парацетамол, Нурофен).

Список АБП, применяемых самостоятельно пациентами до госпитализации: пенициллины, цефалоспорины, макролиды, фторхинолоны.

Стандартная схема лечения для пациентов с легким течением заболевания включала ГКС, муколитик, противовирусное средство, антикоагулянты, нестероидные противовоспалительные препараты, а также другую симптоматическую терапию. У пациентов с тяжелым течением увеличивали дозировки ГКС и антикоагулянтов, при присоединении бактериальной инфекции добавляли АБ.

Статистический анализ

Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием специального программного обеспечения MedCalc 22.014 (Бельгия) в среде Microsoft Windows 11 (США). Проверку статистических гипотез проводили с помощью непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни и *T*-критерия Уилкоксона, а также параметрического критерия Фишера. Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Популяция пациентов

В проспективное сравнительное исследование включены 60 пациентов с верифицированным диагнозом «U07.2 Коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2» согласно критериям включения/невключения. Средний возраст обследованных больных составил 56,0 года (95% доверительный интервал – ДИ 53,8–58,0), в гендерном составе преобладали женщины ($n=34$, 57%) над мужчинами ($n=26$, 43%).

Состояние пациентов оценивалось по шкале оценки тяжести состояния пациента по версии ECOG/WHO PS (The Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organization Performance Status) следующим образом:

0 баллов – пациент полностью активен, способен выполнять те же действия, что и до заболевания;

1 балл – пациент не может выполнять тяжелую, но может выполнять легкую или сидячую работу;

2 балла – пациент лечится амбулаторно, способен к самообслуживанию, но не может выполнять работу, более 50% времени бодрствования проводит активно, в вертикальном положении;

3 балла – пациент способен только к ограниченному самообслуживанию, проводит в кресле или постели более 50% времени бодрствования;

4 балла – инвалид, не способен к самообслуживанию, прикован к креслу или кровати;

5 баллов – пациент мертв.

Оценивали также степень поражения легких на основании данных КТ следующим образом: КТ-1 – не более 25% легких вовлечено в патологические процессы, связанные с COVID-19; КТ-2 – не более 50% легких вовлечено в патологические процессы, связанные с COVID-19; КТ-3 – не более 75% легких вовлечено в патологические процессы, связанные с COVID-19; КТ-3 – более 75% легких вовлечено в патологические процессы, связанные с COVID-19.

На основании данных шкалы оценки тяжести состояния пациента по версии ECOG/WHO PS и данных о степени

Таблица 1. Распределение пациентов 2 групп в зависимости от оценки тяжести состояния пациента по шкале ECOG/WHO PS и степени поражения легких по данным КТ

Table 1. Distribution of patients of study groups depending on the severity of the patient's condition according to the ECOG/WHO PS scale and the degree of lung damage according to CT

Балл ECOG/WHO PS	Степень по КТ	Пациенты, абс.	Степень тяжести состояния пациента
0	1	3	Легкая
	2	1	Легкая
1	1	2	Легкая
	2	3	Легкая
2	3	1	Тяжелая
	1	20	Легкая
3	2	16	Тяжелая
	3	2	Тяжелая
	1	3	Тяжелая
4	2	6	Тяжелая
	3	3	Тяжелая

Таблица 2. Результаты сравнения представленности генов АБР в 2 группах пациентов методом DESeq2

Table 2. Comparison of the representation of antibiotic resistance genes in two groups of patients using the DESeq2 method

Ген	log2foldchange	Группа	p (значение с поправкой)
ARR	7,37192	2	0,00090996
IBCR	5,80273	2	0,00090996
EFMA	5,74948	2	0,0000201884
FLOR	3,98372	2	0,0164373
MSRC	3,91812	2	0,00227008
ACI	3,61031	2	0,0309283
OXA	3,33427	2	0,00090996
MPRF	3,07489	2	0,0338557
QACE	2,96247	2	0,0327348
ERMIR	2,83844	2	0,011262
SAT	2,72467	2	0,00654748
SULI	2,47976	2	0,011262
MVRC	2,20784	2	0,00654748
ACRE	1,91187	2	0,0288561
LSAC	-2,29444	1	0,0243637

поражения легких (КТ) состояние пациентов ранжировано на «легкое» и «тяжелое» следующим образом (табл. 1, рис. 2). С учетом указанных параметров в группу 1 пациентов отобраны 29 человек, а в группу 2 – 31 больной.

Сравнение представленности генов АБР между группами пациентов

В результате анализа значений покрытия генов с помощью DESeq2 нами выявлено 15 генов, дифференциально

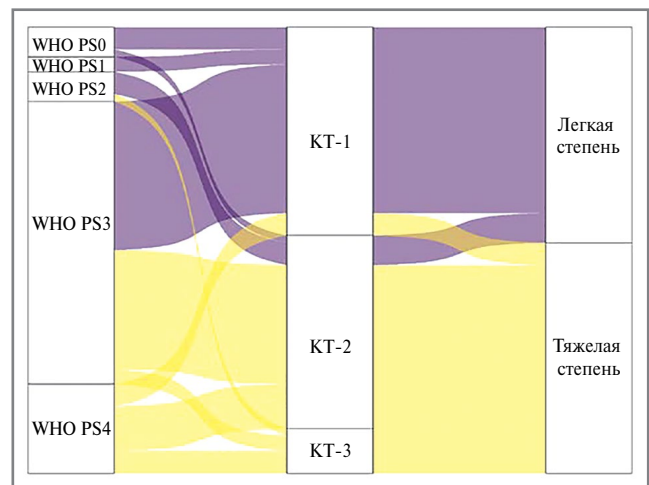


Рис. 2. Распределение пациентов 2 групп в зависимости от оценки тяжести состояния пациента по шкале ECOG/WHO PS и степени поражения легких по данным КТ.

Fig. 2. Distribution of patients of study groups depending on the severity of the patient's condition according to the ECOG/WHO PS scale and the degree of lung damage according to CT.

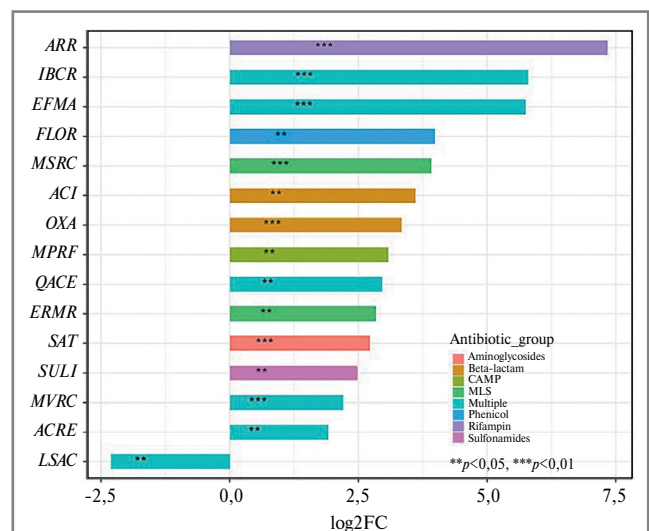


Рис. 3. Значения log2foldchange, полученные в результате анализа с помощью DESeq2. Положительные значения log2FC (справа) соответствуют генам, перепредставленным в группе 2 (тяжелое течение) больных, отрицательные значения log2FC (слева) соответствуют генам, перепредставленным в группе 1 (легкое течение) больных.

Fig. 3. The log2foldchange values obtained from the DESeq2 analysis. Positive log2FC values (right) correspond to genes overrepresented in group 2 (severe) patients, and negative log2FC values (left) correspond to genes overrepresented in group 1 (mild) patients.

представленных между 2 группами с уровнем значимости 0,05. Из них 14 генов перепредставлены в группе тяжелых больных и 1 – в группе легких (табл. 2, 3, рис. 3). Аннотации выявленных детерминант устойчивости и список соответствующих им АБ приведены в табл. 4.

Для каждого из 15 генов, дифференциально представленных между 2 группами пациентов, мы рассчитали их количество и долю от общего числа ридов, приходящегося

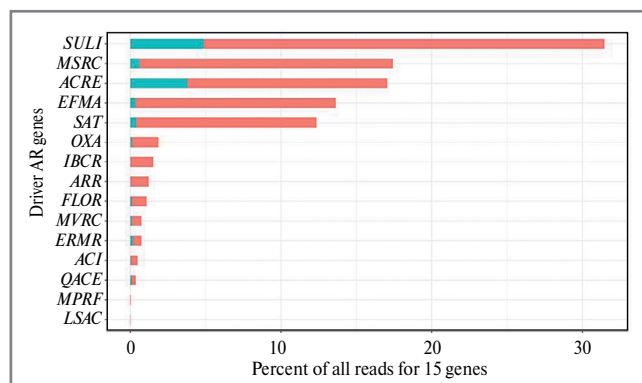


Рис. 4. Доля прочтений, картировавшихся на каждый из 15 генов, значимо различающихся в представленности между 2 группами больных [красный – прочтения, относящиеся к образцам из группы 2 (тяжелое течение) больных, голубой – прочтения, относящиеся к группе 1 (легкое течение) больных].

Fig. 4. The proportion of readings mapped to each of 15 genes with significantly different representation between two groups of patients [red – readings related to samples from group 2 (severe) patients, blue – readings related to group 1 (mild) patients].

Таблица 3. Распределение количества прочтений, картировавшихся на 15 генов, дифференциально представленных между группами пациентов

Table 3. Distribution of the number of readings mapped to 15 genes differentially represented between patient groups

Ген	Группа 1		Группа 2	
	прочтения		прочтения	
	абс.	%	абс.	%
ARR	7	0,0002	38 945	1,2169
IBCR	47	0,0015	48 466	1,5144
EFMA	9869	0,3083	426 536	13,3279
FLOR	1894	0,0592	33 130	1,0352
MSRC	18 669	0,5833	539 004	16,8422
ACI	490	0,0153	14 992	0,4684
OXA	2755	0,0861	57 153	1,7858
MPRF	30	0,0009	1035	0,0323
QACE	1818	0,0568	9892	0,3091
ERMР	4874	0,1523	18 698	0,5842
SAT	12 041	0,3762	383 459	11,9819
SULI	154 412	4,8249	852 222	26,6292
MVRC	2088	0,0652	21 673	0,6772
ACRE	120 379	3,7615	425 264	13,2881
LSAC	372	0,0116	106	0,0033

на все 15 генов (всего 3 200 320). Количество и доля прочтений для каждого из генов в образцах разных групп приведены в табл. 3 и на рис. 4.

Клиническая интерпретация полученных данных

На основании проведенных исследований продемонстрировано, что в группе 1 с более легкой динамикой течения заболевания, без выраженных осложнений выявлено

Таблица 4. Выявленные детерминанты устойчивости и список соответствующих им АБП

Table 4. The identified determinants of stability and the list of corresponding antibacterial drugs (ABDs)

Ген	Группа АБ	Механизм устойчивости (по базе MEGARes)	Число геновариантов в базе MEGARes
ARR	Рифампицин	Rifampin_ADP-ribosyltransferase	16
IBCR	Устойчивость к ряду соединений	MDR_acetyltransferase	1
EFMA	Устойчивость к ряду соединений	Drug_and_biocide_MFS_efflux_pumps	1
FLOR	Хлорамфеникол	Phenicol_resistance_MFS_efflux_pumps	21
MSRC	MLS (макролиды, линкозамиды, стрептограммины)	MLS_resistance_ABC_efflux_pumps	2
ACI	β-лактамы АБ	Class_A_betalactamases	1
OXA	β-лактамы АБ	Class_D_betalactamases	894
MPRF	Катионные антимикробные пептиды	Defensin-resistant_mprF	4
QACE	Устойчивость к ряду соединений	Drug_and_biocide_SMR_efflux_pumps	2
ERMР	MLS (макролиды, линкозамиды, стрептограммины)	23S_rRNA_methyltransferases	2
SAT	Нуклеозиды	Streptothricin_acetyltransferase	14
SULI	Сульфонамиды	Sulfonamide-resistant_dihydropteroate_synthases	38
MVRC	Устойчивость к ряду соединений	Drug_and_biocide_SMR_efflux_pumps	1
ACRE	Устойчивость к ряду соединений	Drug_and_biocide_RND_efflux_pumps	1
LSAC	Устойчивость к ряду соединений	Multi-drug_ABC_efflux_pumps	1

меньшее количество генов АБП, чем в группе 2 с более тяжелым течением заболевания, где отмечалось увеличение генов АБП, среди которых доминировали отдельные 5 генов (SULI, MSRC, ACRE, EFMA, SAT); рис. 5. Вместе с тем мы можем говорить только о найденной тенденции на границе статистической достоверности ($p=0,0773$).

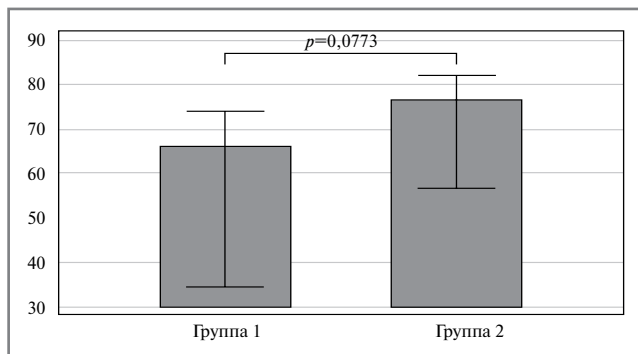


Рис. 5. Медиана количества генов АБР (кумулятивное во всех временных точках) у пациентов с легким (группа 1) и тяжелым течением коронавирусной инфекции (группа 2).

Fig. 5. The median number of antibiotic resistance genes (cumulative at all time points) in patients with mild (group 1) and severe coronavirus infection (group 2).

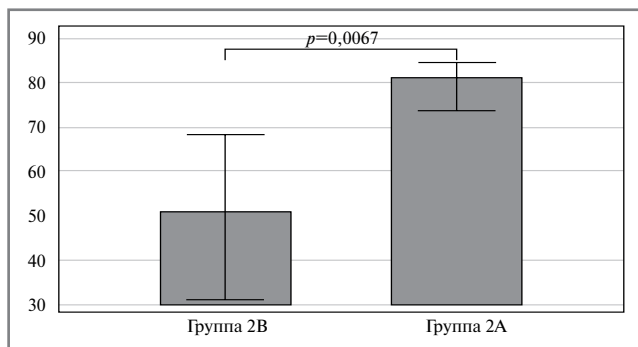


Рис. 6. Медиана количества генов резистентности в группе пациентов, принимавших АБП (группа 2А) и пациентов, не принимавших АБП (группа 2В).

Fig. 6. The median number of resistance genes in patients of group 2A (receiving ABD) and group 2B (not receiving ABD).

У пациентов с тяжелым течением коронавирусной инфекции (группа 2) отмечалась тенденция к выявлению более высокой медианы количества генов АБР (кумулятивное во всех временных точках), однако без статистической достоверности (см. рис. 5).

Медиана количества генов резистентности оказалась достоверно выше в группе тяжелых пациентов, принимавших АБП (группа 2А): 81,0 (95% ДИ 73,8–84,5) против 51,0 (95% ДИ 31,1–68,4); **рис. 6.** При этом у части пациентов группы 2 с тяжелым течением заболевания, получавших АБП до прибытия и во время госпитализации в стационар на протяжении 7–10 дней (группа 2АЕ), количество генов резистентности было значительно выше, чем у пациентов этой же группы, которые принимали АБП только в рамках текущей госпитализации (группа 2АД): 94,0 (95% ДИ 90,5–112,1) против 82,0 (95% ДИ 74,9–90,0); **рис. 7.**

На этом основании выдвинута гипотеза о том, что за этот временной промежуток происходит закрепление генов резистентности в микробиоте желудочно-кишечного тракта. На фоне предшествующей «премедикации» такое состояние микробиоты этих пациентов на момент госпитализации в ряде случаев могло приводить к менее выраженному ответу на таргетную терапию в рамках стандартных протоколов лечения в специализированном стационаре.

Вместе с тем во время проведения исследования отмечено, что пациенты группы 2В, не принимавшие АБП как

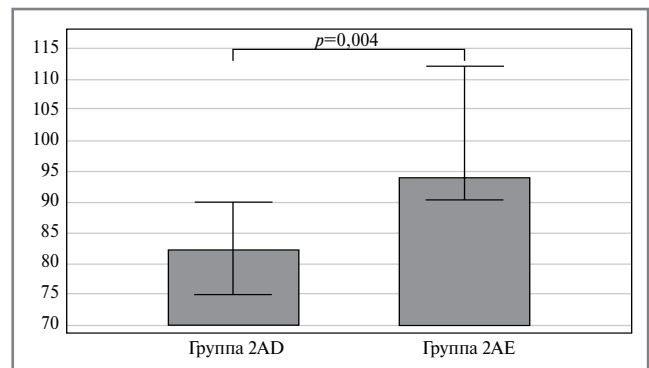


Рис. 7. Медиана количества генов резистентности в группе пациентов 2АЕ и 2АД.

Fig. 7. The median number of resistance genes in patients of group 2AE and 2AD.

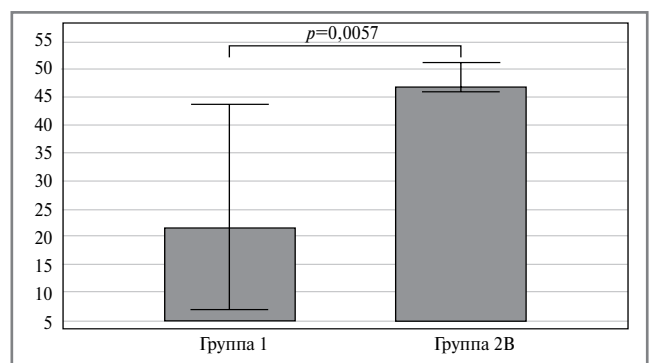


Рис. 8. Медиана количества генов множественной лекарственной устойчивости (эффлюксные системы) в контрольной группе 1 и группе 2В.

Fig. 8. The median number of multidrug resistance genes (efflux systems) in control patients group 1 and group 2B.

до момента госпитализации, так и во время пребывания в стационаре, все равно имели большее число генов АБР по сравнению с пациентами группы 1, что во многом определялось количеством генов, ответственных за активацию эффлюксных насосов (ACRE, EFMA); **рис. 8.**

В группе пациентов с тяжелым течением заболевания, не принимавших АБП (группа 2В), среднее количество генов множественной лекарственной устойчивости (эффлюксные системы) оказалось значимо выше, чем у лиц контроля: 47,0 (95% ДИ 46,0–51,2) против 21,5 (95% ДИ 7,0–43,9); **см. рис. 8.**

Литературные источники не привязывают увеличение этих генов к конкретным АБП, а скорее к общему действию лекарственной терапии.

В группе 2 с более тяжелым клиническим течением COVID-19 пациенты получали до 20 мг ГКС в сутки, для уменьшения рисков венозных тромбозомболических осложнений (тромбоземболии легочной артерии, тромбоза глубоких вен) назначали антикоагулянты (гепарин до 7500 ед). Кроме этого, у 6 пациентов на фоне отрицательной динамики респираторных показателей возникла потребность в подключении аппарата искусственной вентиляции легких. Возможно, более интенсивная терапия и высокие дозировки лекарственных препаратов, которые назначали пациентам группы 2, могли повлиять на потребность бактерий приобретать дополнительные гены эффлюксных насосов за счет горизонтального переноса. Таким образом, вместе с ними в составе единой каскады могла осуществляться передача генов АБР.

Заключение

Настоящее исследование демонстрирует, что в группе с более легкой динамикой течения заболевания выявлено меньшее количество генов АБР, чем в группе с более тяжелым течением заболевания, где отмечалось увеличение генов АБР, среди которых доминировали отдельные 5 генов (*SULI*, *MSRC*, *ACRE*, *EFMA*, *SAT*).

Стоит принимать во внимание тот факт, что более интенсивная лекарственная терапия у пациентов с тяжелым течением заболевания может способствовать получению дополнительных генов эффлюксных насосов бактериальной флорой больных в ходе горизонтального переноса генов, что приводит к приобретению генов АБР. Длительное получение лекарственных препаратов, включая антибиотики на протяжении 7–10 дней до момента госпитализации, приводит к менее ощутимому отклику на получаемую терапию из-за сформировавшейся АБР микробиоты таких пациентов.

Раскрытие интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Disclosure of interest. The authors declare that they have no competing interests.

Вклад авторов. Авторы декларируют соответствие своего авторства международным критериям ICMJE. Все авторы в равной степени участвовали в подготовке публикации: разработка концепции статьи, получение и анализ фактических данных, написание и редактирование текста статьи, проверка и утверждение текста статьи.

Authors' contribution. The authors declare the compliance of their authorship according to the international ICMJE criteria. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Авторы декларируют отсутствие внешнего финансирования для проведения исследования и публикации статьи.

Funding source. The authors declare that there is no external funding for the exploration and analysis work.

Информированное согласие на публикацию. Пациенты подписали форму добровольного информированного согласия на публикацию медицинской информации.

Consent for publication. Written consent was obtained from the patients for publication of relevant medical information.

Соответствие принципам этики. Исследование подготовлено и проведено в соответствии с законодательными, нормативными, отраслевыми стандартами и приемлемыми этическими требованиями. Протокол исследования был одобрен решением независимого междисциплинарного комитета по этической экспертизе клинических исследований (выписка из протокола №01-21 от 28.01.2021). Одобрение и процедуру проведения протокола получали по принципам Хельсинкской конвенции.

Ethics approval. The study was designed and conducted in accordance with legal, regulatory, and industry standards and acceptable ethical principles. The study protocol was approved by the decision of the Independent Interdisciplinary Committee for Ethical Evaluation of Clinical Studies (extract from Minutes No. 01-21 dated January 28, 2021). The approval and procedure for the protocol were obtained in accordance with the principles of the Helsinki Convention.

Благодарность. Авторы выражают благодарность уважаемым коллегам из Клинического центра COVID-19 ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» за оказанную помощь в проведении исследования.

Gratitude. The authors express their gratitude to our distinguished colleagues from the Clinical Center COVID-19 of the Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry for the assistance provided in the conduct of this study.

Список сокращений

АБ – антибиотик

АБП – антибактериальные препараты

АБР – антибиотикорезистентность

ГКС – глюкокортикостероиды

КТ – компьютерная томография

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ECOG/WHO PS – шкала оценки тяжести состояния пациента (The Eastern Cooperative Oncology Group/World Health Organization Performance Status)

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Pérez Jorge G, Rodrigues Dos Santos Goes IC, Gontijo MTP. Les misérables: A parallel between antimicrobial resistance and COVID-19 in Underdeveloped and developing countries current infectious disease reports. *Curr Infect Dis Rep.* 2022;24(11):175-86. DOI:10.1007/s11908-022-00788-z
- National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases. COVID-19: U.S. Impact on Antimicrobial Resistance, Special Report 2022. Available at: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/119025>. Accessed: 10.10.2023.
- O'Neill J. Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. 2016. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf. Accessed: 10.10.2023.
- O'Neill J. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. The Review on Antimicrobial Resistance, 2014. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Accessed: 10.10.2023.
- Murray CJL, Ikuta KSh, Sharara F, et al.; Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet.* 2022;399(10325):629-55. DOI:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- Cong W, Stuart B, Alhusein N, et al. Antibiotic use and bacterial infection in COVID-19 patients in the second phase of the SARS-CoV-2 pandemic: A scoping review. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(8):991. DOI:10.3390/antibiotics11080991
- Langford BJ, So M, Simeonova M, et al. Antimicrobial resistance in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2023;4(3):e179-91. DOI:10.1016/S2666-5247(22)00355-X
- Serapide F, Quirino A, Scaglione V, et al. Is the pendulum of antimicrobial drug resistance swinging back after COVID-19? *Microorganisms.* 2022;10(5):957. DOI:10.3390/microorganisms10050957
- WHO: Antimicrobial resistance. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Accessed: 10.10.2023.

Статья поступила в редакцию / The article received: 10.10.2023



OMNIDOCTOR.RU