

МЕТАГЕНОМНЫЙ АНАЛИЗ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА МОКРОТЫ У ПАЦИЕНТОВ С ПНЕВМОНИЕЙ МЕТОДОМ ТАРГЕТНОГО NGS СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Строчков В.М.¹, Оркара Ш.Д.¹, Белоусов В.Ю.², Соломадин М.В.³, Егоров С.В.⁴, Лавриненко А.В.³, Сандыбаев Н.Т.¹

¹ Казахстанско-Японский инновационный центр, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет», пр. Абая, 8, г. Алматы, 050051, Республика Казахстан.

² Генетическая лаборатория «Treegene», ул. Ауэзова, 60, г. Алматы, 050024, Республика Казахстан.

³ Научно-исследовательская лаборатория, НАО Медицинский университет Караганды, ул. Гоголя, 40, Караганда, 100000, Республика Казахстан.

⁴ Макмастерский университет (McMaster University), 1280 Main St W, Hamilton, ON L8S 4L8, г. Гамильтон, Канада.

*Corresponding author: orkara.shynggys@kaznaru.edu.kz

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты анализа микробиома мокроты у 46 пациентов с диагнозом пневмония с использованием таргетного NGS секвенирования гена 16S рРНК.

В результате проведенных исследований идентифицированы 114 вида бактерий, принадлежащих к 47 родам и 29 семействам.

На основе полученных данных выявлены потенциальные патогены, ассоциированные с развитием пневмонии, а также проведен количественный анализ их распространения среди пациентов. На уровне вида в 26 пробах был обнаружен *Streptococcus pneumoniae* (56,5%). В 10 пробах (21,7%) выявили *Acinetobacter baumannii*. *Klebsiella pneumoniae* была обнаружена в 9 пробах (19,5%), в 8 пробах (17,4%) были выявлены бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Другими видами, которые могут принимать участие в развитии пневмонии были бактерии *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* и *Staphylococcus aureus* в 7 (15,2%), 5 (10,87%) и 4 (8,7%) пробах соответственно.

Также в 5 пробах была выявлена *Neisseria meningitidis* (10,8%). В двух пробах была обнаружена *Stenotrophomonas maltophilia*.

Полученные результаты могут способствовать более глубокому пониманию микробиомных сообществ, связанных с пневмонией, и обогатить знания о микробиоме верхних дыхательных путей. Эти данные могут быть полезны для разработки новых стратегий диагностики и лечения пневмонии, а также для оптимизации профилактических мероприятий.

Ключевые слова: микробиом, пневмония, бактерий, секвенирование, 16sRNA, мокрота.

ВВЕДЕНИЕ

Пневмония остается одним из наиболее распространенных и серьезных заболеваний респираторной системы, представляя значительную угрозу здоровью и жизни пациентов по всему миру. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, ежегодно пневмония становится причиной смерти более 2 миллионов человек, особенно среди детей младше 5 лет и пожилых людей.

Заболевание в целом подразделяется на внебольничную пневмонию (ВП) и внутрибольничную пневмонию (ГП), которая включает вентиляционно-ассоциированную пневмонию (ВАП). Наиболее распространенными возбудителями ВП являются: *Streptococcus pneumoniae*, респираторные вирусы, *Haemophilus influenzae* и другие бактерии, такие как *Mycoplasma pneumoniae* и *Legionella pneumophila*. Наиболее частыми микроорганизмами при ГП являются *Staphylococcus aureus*, *Enterobacterales*, неферментирующие грамотрицательные палочки (например, *Pseudomonas aeruginosa*) и *Acinetobacter spp.* [1,2].

Данные исследования Global Burden of Diseases (GBD) 2019 года показали, что инфекциями нижних дыхательных путей (ИНДП), включая пневмонию и бронхолит, страдают 489 миллионов человек во всем мире. Данное исследование также показало, что инфекции нижних дыхательных путей (ИНДП) были причиной более 2,49 миллиона смертей по всему миру. Эти данные показывают,

что смертность от ИНДП выше, чем смертность от туберкулеза (1,18 миллиона смертей) и ВИЧ (864 000 смертей), что делает ИНДП ведущей причиной смертности от инфекционных заболеваний во всем мире [3-5].

Микробиом мокроты играет ключевую роль в патогенезе пневмонии, определяя ее течение, эффективность терапии и прогноз. Традиционные методы идентификации микроорганизмов, такие как культурные и микроскопические подходы, вносят важный вклад в диагностику пневмонии. Однако они имеют ряд ограничений, таких как низкая чувствительность и специфичность, а также неспособность обнаруживать некоторые виды бактерий, особенно те, которые трудно культивировать в лабораторных условиях. Это может приводить к недооценке реального разнообразия микроорганизмов в образцах и затруднять точную диагностику и лечение.

В то же время, молекулярные методы, включая методы секвенирования нового поколения (NGS), открывают новые горизонты в исследовании микробиома мокроты. Эти методы обладают высокой чувствительностью и специфичностью, позволяют анализировать образцы без предварительного культивирования, и предоставляют более полное таксономическое и геномное описание бактерий, включая информацию о геноме, что особенно важно для мониторинга и эпидемиологического контроля.

В данной работе мы представляем результаты ана-

лиза микробиома мокроты у пациентов с пневмонией, проведенного с использованием метагеномного анализа и секвенирования 16S рРНК. Наше исследование направлено на идентификацию разнообразия бактерий в мокроте у пациентов с пневмонией, а также на оценку их количественного распределения. Полученные результаты могут способствовать лучшему пониманию микробиомных сообществ, связанных с пневмонией и помочь в разработке более эффективных стратегий диагностики, лечения и профилактики этого заболевания.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Выборка пациентов и сбор образцов мокроты

Исследования проведены в период с августа 2023 года по март 2024 года на базе лаборатории «Зеленая биотехнология и клеточная инженерия» Казахстанско-Японского инновационного центра, НАО «Казахский национальный аграрный исследовательский университет» и научно-исследовательской лаборатории НАО «Медицинский университет Караганды» (МУК). Исследование было одобрено Этической комиссией Казахского национального аграрного исследовательского университета от 10 ноября 2022 года.

Критерии отбора включали взрослых мужчин и женщин старше 18 лет. Образцы мокроты (n=46) были собраны на базе трех клиник г. Караганды (клиника НАО МУК, центр гематологии и центр кардиологии) у пациентов с верифицированным диагнозом пневмония и подписанным информированным согласием от каждого пациента. Образцы мокроты были взяты в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Центра контроля и профилактики заболеваний (CDC). Образцы были помещены в специальную транспортную среду для обеспечения сохранности исходного состава микробиома мокроты и хранились при -70 °C.

2.2. Выделение ДНК

В каждую пробирку объемом 1,5 мл добавляли 500 мкл СТАБ буфера, 4 мкл протеиназы К (20 мг/мл), 10 мкл лизоцима (100 мг/мл) и 10 мкл РНКазы (10 мг/мл), после чего вносили 200 мкл исследуемых проб. Пробы инкубировали в термошейкере при 65°C на скорости 900 оборотов в минуту в течение 1 ч. Далее в каждую пробирку добавляли по 700 мкл хлороформ-изоамилового спирта (1:1) и вортиксовали в течение 1 мин. Пробы центрифугировали в течение 5 мин при скорости 13000 x g. Полученный супернатант объемом 500 мкл переносили в чистую пробирку, к которому добавляли 1/10 объема ацетата натрия и 500 мкл изопропанола, после чего смесь перемешивали и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее пробы снова центрифугировали в течение 15 мин при скорости 13000 x g. Супернатант убирали, избегая задевания осадка. Производили промывку, добавляя 1000 мкл 70% этанола и перемешивая на вортексе в течение 5 с. Пробы снова центрифугировались в течение 5 мин при скорости 13000 x g. Снова убирали супернатант, избегая задевания осадка. Осадок ДНК высушивали в течение 10-15 мин, избегая пересушивания. Добавляли 50 мкл 1x TE буфера, вортиксовали и оставляли на 2-3 мин. Полученные пробы ДНК хранили при темпе-

ратуре -20°C.

2.3 Подготовка библиотек и секвенирование 16S рРНК

Для идентификации бактериальных организмов по нуклеотидной последовательности рибосомальной 16S рРНК применяли исследовательскую панель – Ion AmpliSeq Pan-Bacterial Research (ThermoFischer). Данная панель применяется для таргетного NGS секвенирования и представлен двумя пулами праймеров. Первый пул позволяет обнаруживать гены, связанные с устойчивостью к 31 различному классу антибиотиков, оценивая наличие 364 генов устойчивости к антибиотикам. Второй пул содержит праймеры для амплификации 16S rRNA гена.

Для амплификации использовали 10 нг выделенной ДНК и набор Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 в соответствии с инструкцией изготовителя. Процесс амплификации проводили следующим образом: нагревали до 99°C на протяжении 2 мин. Затем проводили 15 циклов: нагревали до 99°C на протяжении 15 с, затем удерживали при 60°C в течение 8 мин.

Процедуру расщепления ампликонов проводили при охлажденных условиях. К каждому образцу добавляли по 2 мкл реагента FuPa, после чего тщательно перемешивали и помещали в амплификатор. Процесс проводили при следующих температурных режимах:

Нагревали до 50°C на протяжении 10 мин, поддерживали температуру 55°C в течение 10 мин, затем увеличивали температуру до 60°C и удерживали на этом уровне в течение 20 мин.

К ДНК ампликонам добавляли следующие компоненты: Switch Solution - 4 мкл, IonCode адаптер - 2 мкл, ДНК лигаза - 2 мкл. Процесс лигирования осуществляли при следующих температурных режимах: инкубацию проводили при 22°C в течение 30 мин, нагревали до 68°C на протяжении 5 мин, затем удерживали при 72°C в течение 5 мин. Завершали процесс, удерживая образцы при 10°C.

После лигирования адаптеров проводили очистку библиотек по следующему протоколу. Переносили весь объем реакции в новую 1,5 мл пробирку, добавляли 45 мкл AMPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, США), смешивали пипетированием и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Помещали пробирку на магнит на 3 мин, затем удаляли супернатант. Повторяли процедуру очистки, добавляя 70% этанола, а затем сушили осадок. Добавляли 50 мкл буфера Low TE, перемешивали пипетированием и вортиксованием, после чего перемещали супернатант в новые пробирки.

Для определения концентрации приготовленных библиотек использовали набор Ion Library TaqMan® Quantitation Kit. На основании полученных данных, готовили разведения библиотек до концентрации 100 пмоль, затем объединяли библиотеки в равных количествах.

Приготовление проб и секвенирование проводили на приборах Ion Chef and Ion Torrent S5 с использованием набора Ion 540 Sequencing kit и 540 Chip.

2.4 Анализ микробиома

Анализ полученных ридов, фильтрация, удаление праймеров, выравнивание и таксономическая класси-

фикация были проведены на Ion Torrent Server с использованием PanBacterialAnalysis plugin (<https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/publiclib/plugins>) и базы данных GreenGenes v.13_5 [6].

Для анализа данных использовалась среда RStudio версии 2024.04.1+748 и конвейер EasyAmplicon на базе R [7]. Необработанные последовательности были отфильтрованы по качеству и дереплицированы с использованием подкоманд VSEARCH v.2.21.1 -fastx_filter и -derep_fulllength соответственно [8]. Нередуцированные последовательности были преобразованы в варианты последовательностей ампликонов (ASV) с помощью USEARCH v11.0.667 [9] (через -unoise3). Химеры были удалены с помощью VSEARCH -uchime_ref с использованием базы данных SILVA [10]. Таблицы признаков были созданы с помощью vsearch -usearch_global. Таксономия объектов была классифицирована с помощью алгоритма USEARCH syntax в SILVA v123.

Анализ разнообразия проводили с использованием пакета vegan v2.6–6.1 (<https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/>), а визуализацию с помощью пакета ggplot2 v3.5.1

(<https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/>) в пакете R v4.4.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунке 1 представлена общая схема подготовки образцов для секвенирования и проведения биоинформатического анализа проб мокроты от пациентов с пневмонией.

Метагеномный анализ микробных сообществ мокроты выявил значительное разнообразие бактерий в образцах от пациентов с пневмонией.

Для 46 образцов мокроты, после фильтрации и дерепликации были получены 257048 ридов, которые были объединены в 3026 ASV.

В результате исследования идентифицировали 114 вида бактерий, принадлежащих к 47 родам и 29 семействам.

В основном они были представлены филами *Firmicutes* (37,8%), *Proteobacteria* (27,3%), *Bacteroidetes* (17,4%), *Actinobacteria* (9%) и *Fusobacteria* (4,5%) (рисунок 2).

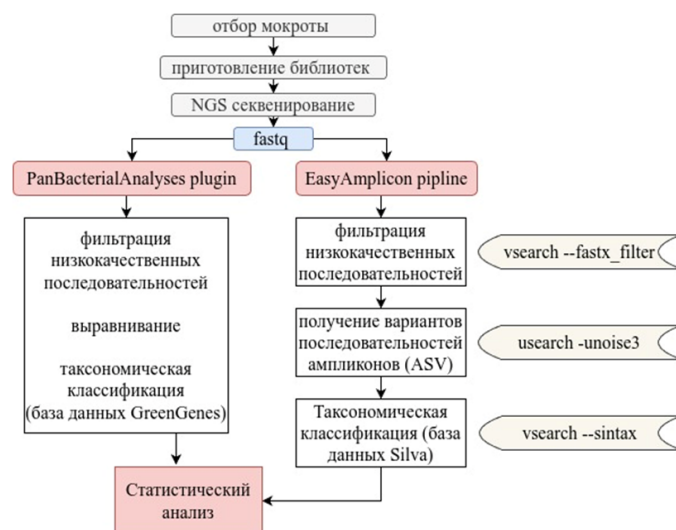


Рисунок 1. Схема биоинформатической обработки последовательностей ампликонов гена 16S рРНК образцов пациентов.

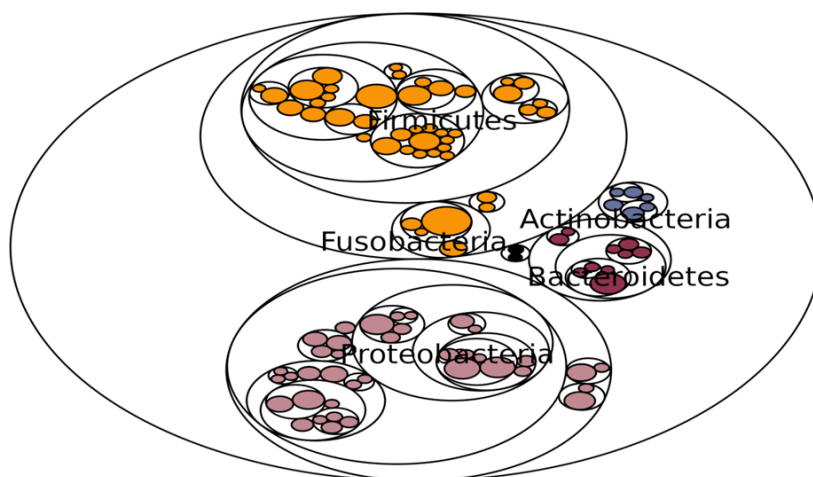


Рисунок 2. Филы бактерий, преобладающие в мокроте пациентов с пневмонией

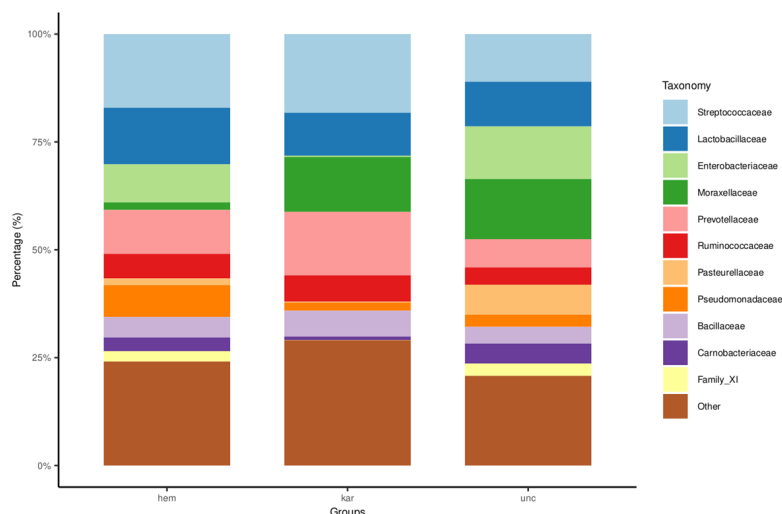


Рисунок 3. Распределение бактериальных семейств по клиникам
hem - центр гематологии, kar - центр кардиологии, unc - клиника НАО МУК.

Firmicutes были представлены семействами *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Veillonellaceae* и *Carnobacteriaceae*.

Proteobacteria представлены семействами *Neisseriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* и *Lysobacteriaceae*.

Bacteroidetes представлены семействами *Prevotellaceae* и *Flavobacteriaceae*. *Actinobacteria* были представлены *Actinomycetaceae* и *Bifidobacteriaceae*.

В отборе проб мокроты от больных пневмонией были задействованы три медицинских учреждения г. Караганды: клиника НАО МУК (n=27), центр гематологии (n=16) и центр кардиологии (n=3). В связи с этим проведен сравнительный анализ по бактериальному составу мокроты от пациентов из разных медицинских учреждений г. Караганды. Результаты представлены на рисунке 3.

Как видно из представленных данных по сравнительному анализу бактериального состава обнаружено снижение бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Carnobacteriaceae* и увеличение уровня *Prevotellaceae* у пациентов из центра кардиологии по сравнению с другими клиниками.

Оценка α -разнообразия не выявила статистически значимого различия микробного разнообразия в пробах по индексу Шеннона ($H=1.09$, $p\text{-value}=0.57$), как показано на рисунке 4.

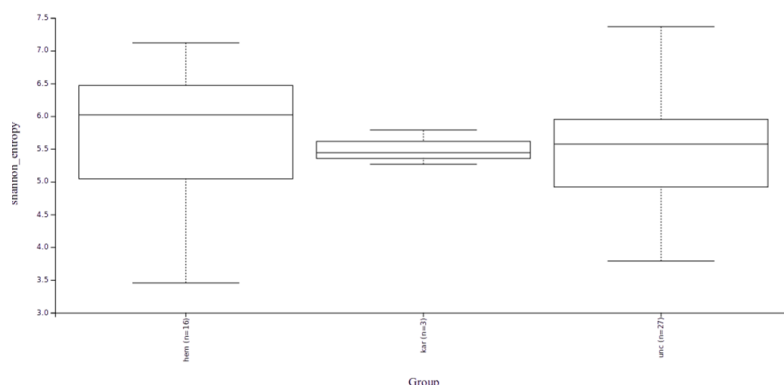


Рисунок 4 — Индекс разнообразия Шеннона микробиома у пациентов с пневмонией

На рисунке 5 представлена диаграмма Венна, показывающая пересечение ASV между образцами мокроты из разных клиник. Диаграмма иллюстрирует общее количество и уникальные ASV, обнаруженные в каждой группе.

Определение видового состава микробиоты проводили

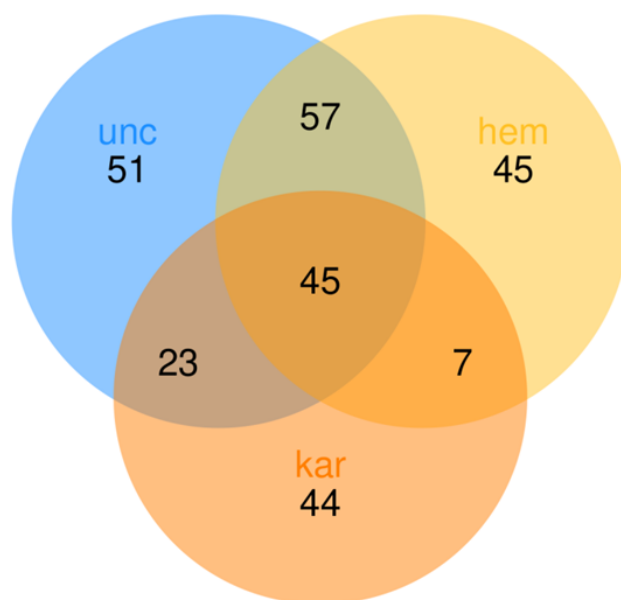


Рисунок 5. Диаграмма Венна для основных ASV обнаруженных от пациентов из разных клиник

с использованием плагина PanBacterialAnalysis plugin. На уровне вида в 26 пробах был обнаружен *Streptococcus pneumoniae* (56,5%). В 10 пробах (21,7%) выявили *Acinetobacter baumannii*. *Klebsiella pneumoniae* была обнаружена в 9 пробах (19,5%), в 8 (17,4%) пробах были выявлены бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Другими видами, которые возможно принимают участие в развитии пневмонии были бактерии *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* и *Staphylococcus aureus* в 7 (15,2%), 5 (10,87%) и 4 (8,7%) пробах соответственно.

Также в 5 пробах была выявлена *Neisseria meningitidis* (10,8%). В двух пробах была обнаружена *Stenotrophomonas maltophilia*.

Семейство *Actinomycetaceae* в основном было представлено видом *Actinomyces odontolyticus* 19 проб (41,3%).

В отдельных пробах обнаружены комбинации до 4 патогенных микроорганизмов. В пробе №1 - *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, в пробе №12 - *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, в пробе №22 - *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*. В других пробах мокрот идентифицированы два или три патогена одновременно.

В то же время имеются пробы (7 проб, 14,5%) где не было выявлено потенциальных опасных патогенов, что возможно может говорить о вирусной природе пневмонии.

ОБСУЖДЕНИЕ

Бактериальная пневмония является одной из наиболее серьезных проблем общественного здравоохранения из-за высоких медицинских и экономических затрат, которые приводят к увеличению заболеваемости и смертности среди людей всех возрастов во всем мире [11]. Бактериальная пневмония характеризуется продуктивным кашлем, лихорадкой с ознобом, одышкой, резкой болью в груди при глубоком вдохе, учащением дыхания и спутанностью сознания, что может быть наиболее заметным симптомом у пожилых людей [12]. Основной целью данного исследования являлось определение совокупной распространенности бактериальных возбудителей, являющиеся возможной причиной развития пневмонии у исследуемых больных.

Результаты таргетного NGS секвенирования 16S рПНК показали, что в 46 пробах мокроты в большинстве случаев обнаружена бактерия *Streptococcus pneumoniae* (56,5%), которая является основным и частым возбудителем пневмонии, выявляемым при внебольничных инфекциях [2].

Следующими по частоте встречаемости были бактерии *Acinetobacter baumannii* (18,75%), *Klebsiella pneumoniae* (18,75%) и *Pseudomonas aeruginosa* (16,66%), которые в основном выявляются при внутрибольничных инфекциях [13].

В некоторых пробах (№ 1, 12, 22) обнаружены до четырех патогенов одновременно. В основном они представлены бактериями *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* и

Stenotrophomonas maltophilia. Обнаруживаемый в пробах *Streptococcus pneumoniae* возможно является основным возбудителем пневмонии. Проблемой данной бактерии является трудность культивирования и не всегда обнаруживают в микробиологии. *Haemophilus influenzae* может также быть причиной пневмонии, однако она также трудно культивируемая бактерия. *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* способны вызывать пневмонию, встречаются в медицинских учреждениях и могут быть частой причиной внутрибольничных инфекций. Бактерии *Neisseria* присутствует в ротовой полости как нормальная микрофлора. Обнаруживаемая кишечная палочка *Escherichia coli* довольно редко вызывает воспаление легких, тем не менее, такие случаи иногда происходят.

В то же время в 7 пробах не было выявлено потенциальных бактериальных патогенов, которые могли бы быть причиной пневмонии. Данный факт может говорить либо о возможных пробелах при отборе мокроты, либо у пациентов пневмония вирусной этиологии. В наших исследованиях идентификацию вирусов не проводили.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствует о необходимости индивидуализированного подхода к диагностике и лечению каждого пациента, что может способствовать более целевому назначению антибиотиков и улучшению прогноза заболевания.

Метод секвенирования 16S рПНК, использованный в данном исследовании, обладает более высокой чувствительностью по сравнению с классическими методами культивирования, что позволяет выявлять труднокультивируемые микроорганизмы.

Полученные результаты способствуют лучшему пониманию микробиомных сообществ, связанных с пневмонией, и могут быть полезны для разработки более эффективных стратегий диагностики и лечения этого заболевания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан в рамках грантового проекта № AP19677743 «Исследование устойчивости к противомикробным препаратам и метаболомный анализ при бактериальных пневмониях методом NGS».

ЛИТЕРАТУРА

1. Diallo, O.O., et al. Antibiotic resistance surveillance systems: A review // J Glob Antimicrob Resist. – 2020. Vol. 23. – P. 430-438.
2. Torres, A., Cilloniz, C., Niederman, M.S., et al. Pneumonia // Nat Rev Dis Primers. – 2021. – Vol. 7, No. 25. – doi: 10.1038/s41572-021-00259-0.
3. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // Lancet. – 2020. – Vol. 396. – P. 1204-1222.

4. Lamping, D.L., et al. The community-acquired pneumonia symptom questionnaire: a new, patient-based outcome measure to evaluate symptoms in patients with community-acquired pneumonia // *Chest*. – 2002. – Vol. 122. P. – 920–929.
5. Metlay, J.P., et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2019. – Vol. 200. – P. e45–e67.
6. McDonald, D., Jiang, Y., Balaban, M., et al. Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree // *Nat Biotechnol*. – 2024. – Vol. 42. – P. 715–718.
7. Liu, Y.X., Chen, L., Ma, T., et al. EasyAmplicon: an easy-to-use, open-source, reproducible, and community-based pipeline for amplicon data analysis in microbiome research // *IMeta*. – 2023. – Vol. 2, No. 1. – P. e83.
8. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. – 2016. – Vol. 4. – P. e2584.
9. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2010. – Vol. 26, No. 19. – P. 2460–2461.
10. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res*. – 2013. – Vol. 41, No. Database issue. – P. D590–596.
11. Peyrani, P., et al. The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance // *Expert Rev Respir Med*. – 2019. – Vol. 13, No. 2. – P. 139–152.
12. Teja, G.R.A., et al. Detection and classification of pneumonia in chest X-ray images using deep learning techniques // *J Eng Sci*. – 2023. – Vol. 14, No. 3.
13. Abdalla, J.S., Albarrak, M., Alhasawi, A., Al-Musawi, T., Alraddadi, B.M., Al Wali, W., Elhoufi, A., Habashy, N., Hassanien, A.M., Kurdi, A. Narrative Review of the Epidemiology of Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia in Gulf Cooperation Council Countries // *Infect Dis Ther*. – 2023. – Vol. 12, No. 7. – P. 1741–1773. doi: 10.1007/s40121-023-00834-w.
5. Metlay, J.P., et al. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An Official Clinical Practice Guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. – 2019. – Vol. 200. – P. e45–e67.
6. McDonald, D., Jiang, Y., Balaban, M., et al. Greengenes2 unifies microbial data in a single reference tree // *Nat Biotechnol*. – 2024. – Vol. 42. – P. 715–718.
7. Liu, Y.X., Chen, L., Ma, T., et al. EasyAmplicon: an easy-to-use, open-source, reproducible, and community-based pipeline for amplicon data analysis in microbiome research // *IMeta*. – 2023. – Vol. 2, No. 1. – P. e83.
8. Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C., Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics // *PeerJ*. – 2016. – Vol. 4. – P. e2584.
9. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // *Bioinformatics (Oxford, England)*. – 2010. – Vol. 26, No. 19. – P. 2460–2461.
10. Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res*. – 2013. – Vol. 41, No. Database issue. – P. D590–596.
11. Peyrani, P., et al. The burden of community-acquired bacterial pneumonia in the era of antibiotic resistance // *Expert Rev Respir Med*. – 2019. – Vol. 13, No. 2. – P. 139–152.
12. Teja, G.R.A., et al. Detection and classification of pneumonia in chest X-ray images using deep learning techniques // *J Eng Sci*. – 2023. – Vol. 14, No. 3.
13. Abdalla, J.S., Albarrak, M., Alhasawi, A., Al-Musawi, T., Alraddadi, B.M., Al Wali, W., Elhoufi, A., Habashy, N., Hassanien, A.M., Kurdi, A. Narrative Review of the Epidemiology of Hospital-Acquired Pneumonia and Ventilator-Associated Pneumonia in Gulf Cooperation Council Countries // *Infect Dis Ther*. – 2023. – Vol. 12, No. 7. – P. 1741–1773. doi: 10.1007/s40121-023-00834-w.

REFERENCES

1. Diallo, O.O., et al. Antibiotic resistance surveillance systems: A review // *J Glob Antimicrob Resist*. – 2020. Vol. 23. – P. 430–438.
2. Torres, A., Cilloniz, C., Niederman, M.S., et al. Pneumonia // *Nat Rev Dis Primers*. – 2021. – Vol. 7, No. 25. – doi: 10.1038/s41572-021-00259-0.
3. GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet*. – 2020. – Vol. 396. – P. 1204–1222.
4. Lamping, D.L., et al. The community-acquired pneumonia symptom questionnaire: a new, patient-based outcome measure to evaluate symptoms in patients with community-acquired pneumonia // *Chest*. – 2002. – Vol. 122. P. – 920–929.

METAGENOMIC ANALYSIS OF THE SPUTUM MICROBIAL COMMUNITY IN PNEUMONIA PATIENTS USING TARGETED NGS SEQUENCING**Strochkov V.M.¹, Orkara Sh.D.¹, Belousov V.Yu.², Solomadin M.V.³, Yegorov S.V.⁴, Lavrinenko A.V.³, Sandybayev N.T.¹**¹Kazakhstan-Japan Innovation Center, NJSC «Kazakh National Agrarian Research University», 8 Abay Ave., Almaty, 050051, Republic of Kazakhstan.²Genetic Laboratory «Treegene», 60 Auezova St., Almaty, 050024, Republic of Kazakhstan.³Research Laboratory, NJSC Medical University of Karaganda, 40 Gogol St., Karaganda, 100000, Republic of Kazakhstan.⁴McMaster University, 1280 Main St W, Hamilton, ON L8S 4L8, Hamilton, Canada.

*Corresponding author: orkara.shynggys@kaznaru.edu.kz

ABSTRACT

This study presents the results of analyzing the sputum microbiome of 46 patients diagnosed with pneumonia using targeted NGS sequencing of the 16S rRNA gene.

As a result of the study, 114 species of bacteria belonging to 47 genera and 29 families were identified. Based on the obtained data, potential pathogens associated with the development of pneumonia were identified, and a quantitative analysis of their prevalence among patients was conducted. At the species level, *Streptococcus pneumoniae* was detected in 26 samples (56.5%). *Acinetobacter baumannii* was found in 10 samples (21.7%). *Klebsiella pneumoniae* was detected in 9 samples (19.5%), and *Pseudomonas aeruginosa* was found in 8 (17.4%) of samples. Other species that may be involved in the development of pneumonia included *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus aureus* in 7 (15.2%), 5 (10.87%), and 4 (8.7%) of samples, respectively. Additionally, *Neisseria meningitidis* was detected in 5 samples (10.8%), and *Stenotrophomonas maltophilia* was found in two samples.

The obtained results can contribute to a deeper understanding of microbiome communities associated with pneumonia and enrich knowledge about the microbiome of the upper respiratory tract. These data may be useful for developing new strategies for the diagnosis and treatment of pneumonia, as well as for optimizing preventive measures.

Keywords: microbiome, pneumonia, bacteria, sequencing, 16S rRNA, sputum.

ТАРГЕТТІК NGS СЕКВЕНИРЛЕУ ӘДІСІМЕН ПНЕВМОНИЯМЕН АУЫРАТЫН НАУҚАСТАРДАҒЫ ҚАҚЫРЫҚТЫҢ МИКРОБТЫҚ ҚАУЫМДАСТЫҒЫНЫҢ МЕТАГЕНОМДЫҚ ТАЛДАУЫ**Строчков В.М.¹, Орқара Ш.Д.¹, Белоусов В.Ю.², Соломадин М.В.³, Егоров С.В.⁴, Лавриненко А.В.³, Сандыбаев Н.Т.¹**¹Қазақстан-Жапон инновациялық орталығы, «Қазақ ұлттық аграрлық зерттеу университеті» КЕАҚ, Абай даңғылы, 8, Алматы қ., 050051, Қазақстан Республикасы.²«TreeGene» генетикалық зертханасы, Әуезов көшесі, 60, Алматы қ., 050024, Қазақстан Республикасы.³Ғылыми-зерттеу зертханасы, Қарағанды медицина университеті КЕАҚ, Гоголь көшесі, 40, Қарағанды, 100000, Қазақстан Республикасы.⁴Макмастер университеті (McMaster University), 1280 Main St W, Hamilton, ON L8S 4L8, Гамильтон, Канада.

*Corresponding author: orkara.shynggys@kaznaru.edu.kz

АННОТАЦИЯ

Бұл жұмыста 16s рРНҚ генінің таргеттік NGS секвенирлеуін пайдалана отырып, пневмония диагнозы қойылған 46 пациенттің қақырық микробиомасын талдау нәтижелері көрсетілген.

Жүргізілген зерттеулер нәтижесінде 47 ұрпаққа және 29 отбасына жататын бактериялардың 114 түрі анықталды.

Алынған мәліметтер негізінде пневмонияның дамуымен байланысты ықтимал қоздырғыштар анықталды, сонымен қатар олардың пациенттер арасында таралуына сандық талдау жасалды. Түр деңгейінде 26 сынамада *Streptococcus pneumoniae* (56,5%) табылды. 10 сынамада (21,7%) *Acinetobacter baumannii* анықталды. *Klebsiella Pneumonia* 9 сынамада (19,5%) табылды, 8 сынамада (17,4%) - *Pseudomonas aeruginosa* бактериялары анықталды. Пневмонияның дамуына қатысты басқа бактерия түрлері де болды *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* және *Staphylococcus aureus* 7 (15,2%), сәйкесінше 5 (10,87%) және 4 (8,7%) сынама саны.

Сондай-ақ, 5 сынамада *Neisseria meningitidis* (10,8%) анықталды. Екі сынамада *Stenotrophomonas maltophilia* табылды.

Нәтижелер пневмониямен байланысты микробиомалық қауымдастықтарды тереңірек түсінуге және жоғарғы тыныс жолдарының микробиомасы туралы білімді байытуға ықпал етуі мүмкін. Бұл деректер пневмонияны диагностикалау мен емдеудің жаңа стратегияларын әзірлеуде және алдын алу шараларын оңтайландыруда пайдалы болуы мүмкін.

Түйін сөздер: микробиом, пневмония, бактериялар, секвенирлеу, 16sRNA, қақырық.