



ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕТАГЕНОМИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНТРААБДОМИНАЛЬНОГО СЕПСИСА (КЛИНИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ)

В.В. Гостев^{1,2}, С.А. Шляпников³, Е.В. Базиян¹, Г.А. Пичугина³, Л.И. Железова¹,
О.С. Калиногорская¹, А.А. Иголкина¹, В.Ю. Плешков^{1,3}, И.А. Цветкова^{1,4}, О.В. Голева¹,
В.А. Агеевец¹, Н.Р. Насер^{2,3}, С.В. Сидоренко^{1,2}

¹Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней, Санкт-Петербург, Россия

²Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

⁴Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

Implementation of clinical metagenomics for pathogen identification in intra-abdominal sepsis: A case report

V.V. Gostev^{1,2}, S.A. Shlyapnikov³, E.V. Bazian¹, G.A. Pichugina³, L.I. Gelezova¹, O.S. Kalinogorskaya¹, A.A. Igolkina¹, V.Yu. Pleshkov^{1,3}, I.A. Tsvetkova^{1,4}, O.V. Goleva¹, V.A. Ageevets¹, N.R. Naser^{2,3}, S.V. Sidorenko^{1,2}

¹Federal Scientific and Clinical Center of Infectious Diseases, Saint-Petersburg, Russia

²North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint-Petersburg, Russia

³Saint-Petersburg Research Institute of Emergency Medicine named after I.I. Dzhanelidze, Saint-Petersburg, Russia

⁴Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Резюме

Методы клинической метагеномики в значительной степени расширяют возможности этиологической диагностики, особенно в тех случаях, когда не удается выявить возбудителей при использовании культуральных методов. В статье описан клинический случай острого гангренозно-перфоративного аппендицита, осложненного тяжелым сепсисом и полиорганной недостаточностью. Посевы образцов крови на протяжении всей госпитализации были отрицательными, что послужило основанием для метагеномного секвенирования цельной крови и плазмы, полученных у пациента на 1-е и 7-е сутки заболевания. Использовались 2 платформы секвенирования – MGI и Oxford Nanopore (ONT). Было получено 28,2–58,6 млн парных ридов на платформе MGI и 0,54–5,1 млн ридов на платформе ONT. Соотношение фрагментов ДНК *Homo sapiens* и ДНК микроорганизмов составляло 99 % и <1 % соответственно. В образцах плазмы крови были выявлены фрагменты внеклеточной ДНК (cfDNA – cell-free DNA) анаэробов: *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Phocaeicola vulgatus* и *Barnesiella intestinihominis*, которые входят в состав кишечной микробиоты человека, но способны вызывать тяжелый сепсис с высокой летальностью. Во всех образцах было выявлено большое количество фрагментов ДНК вируса герпеса *Roseolovirus human beta 6a*, что, скорее всего, свидетельствует о его реактивации и возможной роли в утяжелении инфекционного процесса. Информация о потенциальных патогенах, полученная методами метагеномного секвенирования, может быть использована для обоснования тактики этиотропной терапии.

Abstract

Clinical metagenomics methods significantly expand diagnostic capabilities, especially in cases where pathogens cannot be identified using traditional methods. This study describes a clinical case of acute gangrenous-perforated appendicitis complicated by severe sepsis and multiple organ failure. Blood cultures were negative throughout hospitalization, which served as the basis for metagenomic sequencing of whole blood and plasma obtained from the patient on the first and seventh days of illness. Two sequencing platforms were used: MGI and Oxford Nanopore (ONT). A total of 28.2 million to 58.6 million paired reads were obtained on the MGI platform, and 0.54 to 5.1 million reads on the ONT platform. The ratio of *Homo sapiens* DNA fragments to microbial DNA fragments was 99 % and <1 %, respectively. Cell-free DNA (cfDNA) fragments of anaerobes *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Phocaeicola vulgatus*, and *Barnesiella intestinihominis*, which are part of the human intestinal microbiota but can cause severe sepsis with high mortality, were detected in blood plasma samples. Many DNA fragments of the herpes virus *Roseolovirus human beta 6a* were detected in all samples, likely indicating its reactivation and possible role in the severity of the infection. Information on potential pathogens obtained through metagenomic sequencing methods can be used to inform etiotropic treatment strategies.

Ключевые слова: сепсис, перитонит, молекулярная диагностика, клиническая метагеномика, cfDNA.

Key words: sepsis, peritonitis, molecular diagnostics, clinical metagenomics, cfDNA.

Введение

Своевременная и качественная этиологическая диагностика составляет основу эффективной терапии инфекционных болезней и, прежде всего, их тяжелых форм и сепсиса. Однако возможности культуральных методов по выявлению патогенов далеко не всегда соответствуют современным требованиям. Одним из наиболее сложных видов микробиологических исследований является исследование крови, предполагающее детекцию как распространенных, так и редких и/или трудно культивируемых бактерий, таких как анаэробы, а также грибов и вирусов. Современные методы диагностики бактериемии и фунгемии основаны на использовании автоматизированных систем, осуществляющих непрерывное наблюдение за маркерами микробного роста (накоплением CO_2) во флаконах с питательными средами оптимизированного состава после внесения в них образцов крови [1]. Поскольку обсемененность крови даже при сепсисе может быть невысокой, повышение чувствительности достигается за счет увеличения объема исследуемой крови. Оптимальным считается исследование 40 мл крови: внесение по 10 мл в 2 флакона с бульонной средой, оптимизированной для культивирования аэробных бактерий, и по 10 мл в 2 флакона со средой, оптимизированной для культивирования анаэробных бактерий.

В значительном проценте случаев рост микрорганизмов во флаконах удается детектировать в течение первых 12–24 ч инкубации, однако в ряде случаев этот период может увеличиться до 5 сут и более. При получении сигнала о начале микробного роста жидкость из флакона используется для микроскопии и посева на плотные питательные среды. Единичные колонии бактерий и грибов на плотных питательных средах используют для идентификации культур классическими биохимическими методами или с помощью MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) масс-спектрометрии. Общая длительность исследований по выявлению возбудителей бактериемии колеблется в пределах 50–70 ч. Результаты идентификации патогенов могут быть использованы для обоснования эмпирической терапии, но для точной оценки чувствительности выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам понадобится еще 18–20 ч. Очевидно, что указанные сроки проведения исследований не позволяют своевременно назначить антибактериальную терапию пациентам с тяжелым сепсисом, при этом каждый час задержки с назначением ан-

тибиотиков связан с увеличением летальности на 7–10% [2].

Отдельной проблемой является выявление анаэробной этиологии бактериемии. Одной из наиболее частых причин анаэробной бактериемии оказываются тяжелые интраабдоминальные инфекции, сопровождающиеся сепсисом [3]. Существует точка зрения о незначительной роли анаэробов в этиологии бактериемии, ее сторонники подвергают сомнению целесообразность исследования крови на наличие анаэробов [4]. На практике в Российской Федерации флаконы для культивирования анаэробных бактерий часто не включают в стандартные исследования по экономическим соображениям. Однако частота анаэробной бактериемии колеблется в широких пределах от 1% до 17%, что не позволяет игнорировать проблему [5]. Представляется вполне вероятным, что в определенной части случаев отрицательные результаты исследований на бактериемию связаны с анаэробной этиологией инфекционного процесса.

Частота положительных результатов детекции бактериемии в значительной степени зависит от существующей в учреждении практики назначения классических культуральных методов, но, по данным большинства исследований, колеблется в пределах 10–15%.

У пациентов с сепсисом частота выявления бактериемии выше и колеблется в широких пределах от 20–30% до 50% случаев, данные о связи наличия бактериемии и исхода инфекции противоречивы. По одним наблюдениям неблагоприятные исходы у пациентов с клинически установленным сепсисом чаще наблюдаются при бактериемии, а по другим – при ее отсутствии [6–8]. Вполне возможно, что в последних случаях большая тяжесть течения инфекции связана с невыявленными эпизодами анаэробной и сопутствующей вирусной инфекцией, например, с реактивацией герпес-вирусной инфекции, на фоне широкой инфицированности герпес-вирусами взрослого населения.

Таким образом, вполне очевидна настоятельная потребность существенного повышения эффективности расшифровки этиологии тяжелых инфекций и сепсиса, прежде всего, за счет быстрой детекции крови максимально широкого круга патогенов.

Принципиально новым подходом к решению этой проблемы является «диагностика без клинической гипотезы» (hypothesis-free testing), основанная на методах метагеномного (тотального) секвенирования всех нуклеиновых кислот в био-

логическом образце (metagenomic Next Generation Sequencing, mNGS). Среди платформ, реализующих указанный подход, доминирующее положение занимают Illumina (США), MGI (Китай), использующие технологию параллельного секвенирования с получением коротких прочтений ДНК, и Oxford Nanopore (ONT, Великобритания) с технологией длинных прочтений. Показана возможность детекции на этих платформах всех ДНК-содержащих патогенов в различных биологических образцах (кровь, ликвор, содержимое абсцессов и др.), при этом чувствительность и специфичность превосходит культуральные и стандартные ПЦР-методы.

В статье описан случай применения методов метагеномного секвенирования для расшифровки этиологии тяжелого интраабдоминального сепсиса.

Клинический случай

Пациентка, 76 лет с отягощенным преморбидным фоном (ожирение III степени, гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, атеросклеротическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа, хронический панкреатит, хронический холецистит) была доставлена экстренно в стационар с жалобами на боли в правом подреберье и мезогастринии. При поступлении состояние было расценено как средней тяжести. В ходе динамического наблюдения и обследования выявлены – выраженный лейкоцитоз до $18,24 \times 10^9/\text{л}$ со сдвигом влево, повышение креатинина до 336 мкмоль/л, С-реактивного белка $> 444 \text{ мг/л}$, прокальцитонина до 44,11 нг/мл. Была выполнена экстренная диагностическая лапароскопия. При операции выявлен ретроцекально расположенный гангренозно-перфоративный аппендицит с периаппендикулярным абсцессом и аппендикулярным инфильтратом. Отмечался местный неотграниченный серозно-фибринозный перитонит. Выполнена аппендэктомия, дренирование брюшной полости. Послеоперационный период осложнился развитием тяжелого сепсиса с синдромом полиорганной недостаточности (по шкале SOFA – 7, по APACHE – 19). Отмечалось снижение уровня сознания до 14 баллов по шкале Глазго. Пациентка была переведена на искусственную вентиляцию легких в отделение реанимации и интенсивной терапии. Была назначена следующая антибактериальная терапия: имипенем/циластатин, линезолид, ванкомицин, метронидазол.

По результатам микробиологического исследования из раневого отделяемого брюшной полости была выделена *Escherichia coli*, из нижних дыхательных путей – *E. coli*, из мочи – *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. При этом

гемокультуры, собранные в 2 флакона с интервалом 30 мин, были отрицательными. Повторное исследование образцов крови на стерильность через 2 сут пребывания пациентки в ОРИТ не выявило положительного роста. На фоне проводимого лечения отмечена положительная динамика: регресс дыхательной и почечной недостаточности, стабилизация гемодинамики, улучшение уровня сознания. К 4-м суткам наблюдения в ОРИТ балл SOFA снизился до 2. Состояние стабилизировалось, и пациентка была переведена в профильное хирургическое отделение для дальнейшего наблюдения. После 10 дней пациентка выписана из стационара в удовлетворительном состоянии.

Ввиду того, что у пациентки после проведенной аппендэктомии развился тяжелый сепсис, но не было получено положительных результатов при исследовании крови на стерильность, было принято решение использовать метагеномное секвенирование образцов цельной крови и плазмы для выявления возможных патогенов.

Метагеномное секвенирование

Для метагеномного секвенирования использовалась цельная кровь и плазма, взятые у пациента на 1-е сутки заболевания, а также цельная кровь, взятая на 7-е сутки. Дополнительно в качестве контроля использовали образец цельной крови здорового донора, куда вносили жизнеспособный штамм *Streptococcus pneumoniae* в концентрации 10^5 КОЕ/мл . Выделение ДНК из цельной крови в объеме 0,5 мл осуществляли с помощью набора MagPure Blood DNA Kit (Magen, Китай). Выделение свободно-клеточной циркулирующей ДНК (cfDNA, cell-free DNA) из 1 мл плазмы крови проводили с помощью набора MagMAX™ Cell-Free DNA Isolation Kit (Applied Biosystems, США). Метагеномное секвенирование проводили на 2 платформах – MGI (цельная кровь и cfDNA на 1-е сутки) и ONT (цельная кровь на 1-е и 7-е сутки). ДНК-библиотеки коротких прочтений на платформе MGI были приготовлены с помощью набора MGIEasy FS DNA Library Prep Set. Секвенирование проводили на приборе DNBSEQ-G400RS с использованием набора DNBSEQG400RS High-throughput Sequencing Set PE150 по протоколу производителя (MGI Tech, Китай). Для подготовки библиотек ONT использовался набор Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Для секвенирования использовали ячейки версии R10.4.1 (FLO-MIN114) и прибор GridION (Oxford Nanopore, Великобритания). Секвенирование осуществлялось с функцией adaptive sampling в режиме деплеции для фильтрации фрагментов *Homo sapiens* (использовалась сборка человеческого генома версии GRCh38.p14).

Анализ данных метагеномного секвенирования

Полученные прочтения анализировали с помощью программ NanoPlot (для ONT) и FastQC (для MGI). В биоинформационическом анализе проводили удаление фрагментов человеческого генома (против референс-генома GRCh38.p14) с использованием программ minimap2 (для прочтений ONT) и bowtie2 (для прочтений MGI). Классификацию ДНК-прочтений осуществляли с помощью программы kraken2 с использованием базы данных standard PlusPF. Для проверки и подтверждения результатов классификации целевые прочтения экстрагировались с помощью набора скриптов KrakenTools и загружались в NCBI BLAST с осуществлением поиска против базы данных core_nt в режиме megablast. Интерпретацию осуществляли, используя следующие критерии: абсолютное количество уникальных идентифицированных прочтений более 10; отсутствие уникальных идентифицированных прочтений в контрольном образце; подтверждение идентификации через BLAST-поиск.

Выявление антител IgM и IgG класса к вирусу герпеса человека 6 типа

Для детекции антител IgM и IgG класса к вирусу герпеса человека 6 типа использовали коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Результат выражался коэффициентом позитивности (КП) в условных единицах (у.е.). При КП>1 результат считался положительным согласно инструкции производителя тест-системы.

Определение авидности IgG антител к вирусу ВГЧ-6 выполнялось согласно разработанному способу определения авидности иммуноглобулинов класса G к вирусу герпеса 6 типа (патент на изобретение RU 2 596 794 C1). Низкоавидными антитела считались при индексе авидности (ИА)≤50%; значение ИА≥60% указывало на наличие высокоавидных антител; ИА в интервале 50–60% расценивался как граничный результат.

После секвенирования образцов цельной крови и cfDNA было получено 58,6 млн и 28,2 млн парных прочтений (ридов) длиной 160 нуклеотидов на платформе MGI, соответственно. На платформе ONT было получено 0,54 млн ридов (образец, собранный в 1-е сутки) и 5,1 млн ридов (7-е сутки) с медианой длиной 374–320 нуклеотидов. При анализе данных было установлено, что независимо от платформы секвенирования соотношение человеческих прочтений и бактериальных, вирусных было ожидаемо высоким и составляло 99% и <1% соответственно. В контрольном образце выявлены фрагменты *S. pneumoniae*. При удалении всех последовательностей, не удовлетворяющих заданным критериям, было идентифицировано несколько микроорганизмов (табл.).

При исследовании цельной крови на 1-е и 7-е сутки как на платформе MGI, так и на платформе ONT количество положительных результатов было минимальным. На 7-е сутки на платформе ONT было детектировано 4 фрагмента *Acinetobacter johnsonii*. Наибольшее количество бактериальных фрагментов было выявлено при секвенировании образца cfDNA из плазмы крови на платформе MGI. Так, были идентифицированы

Таблица

Результаты идентификации микроорганизмов с использованием нескольких подходов метагеномного секвенирования

Технология секвенирования						Идентификация	
ONT		MGI					
К-ль	K1	K7	К-ль	K1	П1		
29	0	0	212	0	0	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
0	0	0	0	0	20	<i>Lysobacter capsici</i>	
0	0	4	0	0	10	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	
0	0	0	0	0	24	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	
0	0	0	0	0	20	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	
0	0	0	0	0	30	<i>Barnesiella intestinihominis</i>	
0	12	280	0	6228	2492	<i>Roseolovirus human beta 6a</i>	
0	0	56	0	250	114	<i>Human parvovirus 4 G1</i>	

MG — технология коротких прочтений; ONT — технология длинных прочтений (Oxford Nanopore Technology). Образцы: К-ль — контрольный образец крови с внесенным бактериальным штаммом *Streptococcus pneumoniae*; K1 — цельная кровь на 1-е сутки поступления пациента; П1 — образец cfDNA, выделенный из плазмы крови на 1-е сутки; K7 — цельная кровь на 7-е сутки. Отмечено абсолютное количество ридов.

следующие виды: *Lysobacter capsici*, *Acinetobacter johnsonii*, анаэробные бактерии: *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Phocaeicola vulgaris* и *Barnesiella intestinihominis*. Выявленные бактериальные фрагменты отсутствовали в контрольном образце.

На обеих платформах в цельной крови и плазме на 1-е и 7-е сутки были выявлены фрагменты ДНК вируса герпеса *Roseolovirus human beta 6a* (ВГЧ-6А) (12 – 6228 прочтений). Обнаружение фрагментов вируса герпеса было подтверждено методом ПЦР с использованием наборов АмплиСенс® ННВ6-скрин-титр-FL (Россия), при этом отмечалась высокая вирусная нагрузка с показателем циклов амплификации (*Ct*) 20 – 25, требующая оценки активности вирусного инфекционного процесса в организме обследуемой пациентки и степени его вклада в развитие патологического состояния. При серологическом исследовании IgM-антитела к ВГЧ-6А обнаружены не были, тогда как IgG-антитела определялись в высокой концентрации КП = 9,4 у.е. Индекс avidности антител IgG-класса составил 55%. Отсутствие антител IgM-класса на фоне высоких уровней антител IgG-класса указывало на перенесенную инфекцию, однако показатель ИА имел пограничное значение, что могло быть связано с поздней первичной инфекцией (более 1 мес. от начала заболевания) или реактивацией вируса на фоне основного заболевания.

В 3 образцах выявлены фрагменты вируса *Human parvovirus 4 G1*, который может рассматриваться как контаминаント, часто выявляемый в образцах цельной крови и препаратах крови для переливания [9].

Полученные вирусные прочтения из всех запусков на платформе MGI были экстрагированы и выравнены на референс-геномы. Так, среднее покрытие геномов составляло: для вируса герпеса $\times 11,12$ и для парвовируса $\times 12,11$. Для сборок, полученных после выравнивания на референс-геномы, в программе Vclust был рассчитан индекс ANI (average nucleotide index), который составил 96 – 98%, что говорит о высоком уровне видовой идентификации.

Обсуждение

В статье был рассмотрен клинический случай острого гангренозно-перфоративного аппендицита, осложненного тяжелым сепсисом и полиорганной недостаточностью, на фоне коморбидной патологии. Посев образцов крови не выявил каких-либо патогенов, при этом из брюшной полости и мокроты была выделена *Escherichia coli*, из мочи – *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Перечисленные патогены не были рассмотрены как этиологически значимые. Поскольку методы клинической метагеномики в значительной степени повышают уровень расшифров-

ки бактериемий и возбудителей сепсиса [10], для выявления потенциальных патогенов ретроспективно было проведено метагеномное секвенирование ДНК в цельной крови и плазме.

Наибольшее количество патогенов было выявлено при секвенировании ДНК из плазмы крови на платформе MGI на 1-е сутки. В настоящее время выявление как бактериальных, так и вирусных фрагментов ДНК возбудителей в образцах cfDNA является одним из эффективных способов метагеномной диагностики [11]. В исследовании была выявлена ДНК 3 видов грамотрицательных анаэробных бактерий: *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Phocaeicola vulgaris* и *Barnesiella intestinihominis*. Стоит также отметить, что в рутинном исследовании крови на стерильность в рассматриваемом клиническом случае не использовались специализированные флаконы для выявления анаэробов. Приведенные бактерии относятся к 1 порядку *Bacteroidales*. *B. thetaiotaomicron*, *P. vulgaris* (старое видовое название *Bacteroides vulgaris*) таксономически более близки между собой, они относятся к одному семейству *Bacteroidaceae*. Детекция ДНК анаэробных микроорганизмов была ожидаемой, поскольку данные виды являются представителями кишечной микробиоты, в то же время известна их роль в этиологии перитонита и сепсиса при хирургической патологии брюшной полости [12, 13]. *Bacteroides* spp. и *Phocaeicola* spp. вызывают тяжелый сепсис с летальностью 15 – 60%, проявляют природную устойчивость к антибактериальным препаратам, включая многие бета-лактамы, но чувствительны к метронидазолу, тигециклину и карбапенемам [12, 14 – 16]. Другой представитель анаэробов – *B. intestinihominis* обнаруживается в составе кишечной микробиоты в незначительном количестве [17], его роль в инфекционной патологии человека в настоящее время недостаточно изучена. Оценивая совокупность полученных результатов и данные литературы, идентифицированные в крови в разгар болезни анаэробные бактерии следует признать возможными возбудителями сепсиса.

Выявленные в плазме крови фрагменты бактерии вида *Lysobacter capsici*, колонизирующие растения, по всей видимости, являются контаминаントом и не могут рассматриваться как потенциальный патоген. Фрагменты *Acinetobacter johnsonii* были выявлены в крайне малом количестве, данный микроорганизм чаще всего описывается как комменсал и может колонизировать разные биотопы человека, включая кишечник.

В целом, стоит отметить, что методы метагеномного секвенирования для выявления абдоминальных инфекций находят все большее применение и отмечается их высокая эффективность. В ряде работ показано что метагеномная диагностика

по сравнению с культуральной сокращает время, затрачиваемое на исследование, позволяет выявить существенно большее количество патогенов (в 90% случаев против 50% при использовании культуральных методов), включая редкие и трудно выявляемые, такие как микобактерии, пневмоцисты и вирусы [18–21].

При использовании mNGS-диагностики за счет корректной идентификации возбудителей исследователи отмечают снижение частоты назначений карбапенемных антибиотиков [22]. В рассматриваемом клиническом случае в качестве комбинированной антибактериальной терапии пациент получал имипенем/циластатин, линезолид, ванкомицин, метронидазол. Представляется достаточно вероятным, что при внедрении метагеномной диагностики в практику и формировании у клиницистов доверия к этому виду исследований в сходных ситуациях поученные результаты могли бы быть серьезным основанием для деэскалации антибактериальной терапии за счет линезолида, ванкомицина и метронидазола. Вполне адекватной была бы монотерапия имипенемом/циластатином.

Значительный интерес представляет выявление в крови у пациентки ДНК ВГЧ-6А при отсутствии антител IgM-класса, на фоне высокого уровня антител IgG-класса и пограничном значении индекса авидности, что может свидетельствовать о поздней первичной инфекции (более 1 мес. от начала заболевания) или реактивации вируса на фоне основного заболевания (сепсиса). В отделениях интенсивной терапии частота реактивации вируса HSV-1 при септическом шоке высока и составляет 32–68% [23], частота реактивации ВГЧ-6А ниже, но может достигать 10%, часто в сочетании с другими герпес-вирусами [24]. Реактивация может быть связанный с неизбежной реакцией иммунной системы на первичный патоген, даже у пациентов с нормальным иммунитетом [25]. Неясно, является ли ВГЧ-6А, выделенный из крови и плазмы, маркером тяжести заболевания или же фактическим патогеном, участвующим в развитии сепсиса. В этой связи неясен и вопрос о целесообразности противовирусной терапии, хотя имеются сообщения о положительном эффекте ацикловира у пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией и высокой HSV-вирусной нагрузкой [26]. Применение метагеномного секвенирования, позволяющего одновременно выявлять бактериальные и вирусные патогены, может способствовать существенному прогрессу в понимании взаимодействия этих патогенов при сепсисе.

Заключение

Методы клинической метагеномики в значительной степени расширяют возможности диагностики, особенно в тех случаях, когда не удается

выявить возбудителей при использовании классических методов. Проведенное исследование показало, что метагеномное секвенирование позволяет выявлять в крови пациентов как бактериальные, так и вирусные патогены, что, в свою очередь, крайне важно для обоснования этиотропной терапии. Для внедрения этих методов в практику необходимы масштабные исследования по оценке их чувствительности и специфичности.

Этическая экспертиза

Положительное заключение на проведение ретроспективного исследования было выдано локальным этическим комитетом Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней (протокол № 185 от 25.08.2025).

Литература

1. Wilson ML: Development of new methods for detecting bloodstream pathogens. *Clinical Microbiology and Infection* 2020, 26(3):319-324.
2. Kumar A: Early antimicrobial therapy in severe sepsis and septic shock. *Curr Infect Dis Rep* 2010, 12(5):336-344.
3. Gajdács M, Urbán E: Relevance of anaerobic bacteremia in adult patients: A never-ending story? *Eur J Microbiol Immunol (Bp)* 2020, 10(2):64-75.
4. Bartlett JG, Dick J: The controversy regarding routine anaerobic blood cultures. *The American Journal of Medicine* 2000, 108(6):505-506.
5. Brook I: The role of anaerobic bacteria in bacteremia. *Anaerobe* 2010, 16(3):183-189.
6. Yang L, Lin Y, Wang J, Song J, Wei B, Zhang X, Yang J, B. L: Comparison of Clinical Characteristics and Outcomes Between Positive and Negative Blood Culture Septic Patients: A Retrospective Cohort Study. *Infect Drug Resist* 2021, 14:4191-4142.
7. Leligdowicz A, Dodek PM, Norena M, Wong H, Kumar A, Kumar A: Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2014, 189(10):1204-1213.
8. Chang Y, Oh JH, Oh DK, Lee SY, Hyun D-g, Park MH, Lim C-M, Lim C-M, Hong S-B, Oh DK et al: Culture-negative sepsis may be a different entity from culture-positive sepsis: a prospective nationwide multicenter cohort study. *Critical Care* 2024, 28(1):385.
9. Jia J, Zhong Y, Zhang H, Yuan D, Ma L, Wang D, Zhang J, Ma Y: Identification of human parvovirus 4 genotypes 1 and 2 in Chinese source plasma pools. *Journal of medical virology* 2021, 93(8):4780-4785.
10. Liu Y, Qin S, Lan C, Huang Q, Zhang P, Cao W: Effectiveness of metagenomic next-generation sequencing in the diagnosis of infectious diseases: A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis* 2024, 142:106996.
11. Park SY, Chang EJ, Ledeboer N, Messacar K, Lindner MS, Venkatasubrahmanyam S, Wilber JC, Vaughn ML, Bercovicci S, Perkins BA et al: Plasma Microbial Cell-Free DNA Sequencing from over 15,000 Patients Identified a Broad Spectrum of Pathogens. *Journal of clinical microbiology* 2023, 61(8):e0185522.
12. Kierzkowska M, Markowska M, Kownacki J, Podsiad y E, Majewska A: Anaerobic bacteraemia – identification of *Bacteroides* and *Phocaeicola* in blood samples. Challenges in antimicrobial susceptibility testing. *The Microbe* 2025, 7(100374).
13. Pricop GR, Gheorghe I, Pircalabioru GG, Cristea V, Popa M, Marutescu L, Chifiriuc MC, Mihaescu G, Bezirtzoglou E: Re-

- sistance and Virulence Features of *Bacteroides* spp. Isolated from Abdominal Infections in Romanian Patients. *Pathogens* 2020, 9(11).
14. Miragliotta G, Del Gaudio T, Tajani E, Mosca A: *Bacteroides thetaiotaomicron* in posthysterectomy infection. *Anaerobe* 2006, 12(5-6):276-278.
 15. Agarwal N, Hansberry DR, Goldstein IM: Infection with *bacteroides thetaiotaomicron* during posterior decompression and dynamic stabilization of the lumbar spine: a case report and review of the literature. *The International journal of neuroscience* 2014, 124(8):621-625.
 16. Kim MG, Jeon JW, Ryu IH, Lee JJ, Kim JS, Choi JW, Cho BS, Yoon HJ: Mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *bacteroides thetaiotaomicron* and *acinetobacter lwoffii*: the first case in Korea. *Infection & chemotherapy* 2014, 46(1):54-58.
 17. Morotomi M, Nagai F, Sakon H, Tanaka R: *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinihominis* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2008, 58(Pt 12):2716-2720.
 18. Li D, Gai W, Zhang J, Cheng W, Cui N, Wang H: Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Microbiological Diagnosis of Abdominal Sepsis Patients. *Frontiers in microbiology* 2022, 13:816631.
 19. Zhu R, Hong X, Zhang D, Xiao Y, Xu Q, Wu B, Guo J, Han X, Yang Q, Zhao Y et al: Application of metagenomic sequencing of drainage fluid in rapid and accurate diagnosis of postoperative intra-abdominal infection: a diagnostic study. *International journal of surgery* 2023, 109(9):2624-2630.
 20. Mao JY, Li DK, Zhang D, Yang QW, Long Y, Cui N: Utility of paired plasma and drainage fluid mNGS in diagnosing acute intra-abdominal infections with sepsis. *BMC infectious diseases* 2024, 24(1):409.
 21. Shi P, Liu J, Liang A, Zhu W, Fu J, Wu X, Peng Y, Yuan S, Wu X: Application of metagenomic next-generation sequencing in optimizing the diagnosis of ascitic infection in patients with liver cirrhosis. *BMC infectious diseases* 2024, 24(1):503.
 22. Zheng L, Kang Z, Wang R, Lv M, Gao Z, Xu H, Wang M: Evaluation of the Diagnostic Performance of mNGS in Detecting Intra-Abdominal Infections of the Emergency Department Patients. *Infection and drug resistance* 2023, 16:1421-1432.
 23. Ong DSY, Bonten MJM, Spitoni C, Verduyn Lunel FM, Frencken JF, Horn J, Schultz MJ, van der Poll T, Klein Klouwenberg PMC, Cremer OL et al: Epidemiology of Multiple Herpes Viremia in Previously Immunocompetent Patients With Septic Shock. *Clinical Infectious Diseases* 2017, 64(9):1204-1210.
 24. Walton AH, Muenzer JT, Rasche D, Boomer JS, Sato B, Brownstein BH, Pachot A, Brooks TL, Deych E, Shannon WD et al: Reactivation of Multiple Viruses in Patients with Sepsis. *PLOS ONE* 2014, 9(6):e98819.
 25. Brenner T, Rosenhagen C, Hornig I, Schmidt K, Lichtenstern C, Mieth M, Bruckner T, Martin E, Schnitzler P, Hofer S et al: Viral infections in septic shock (VISS-trial)-crosslinks between inflammation and immunosuppression. *J Surg Res* 2012, 176(2):571-582.
 26. Schuierer L, Gebhard M, Ruf H-G, Jaschinski U, Berghaus TM, Wittmann M, Braun G, Busch DH, Hoffmann R: Impact of acyclovir use on survival of patients with ventilator-associated pneumonia and high load herpes simplex virus replication. *Critical Care* 2020, 24(1):12.

Авторский коллектив:

Гостев Владимир Валерьевич – старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; профессор кафедры медицинской микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, д.б.н.; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: guestvv11@gmail.com

Шляпников Сергей Алексеевич – руководитель отдела хирургических инфекций Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ; тел.: 8(812)774-86-75, e-mail: shlyapnikov@hotmail.com

Базиян Елена Владимировна – младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; тел.: + 7-911-229-07-85, e-mail: waz2107gen@yandex.ru

Пичугина Галина Александровна – заведующая ОРИТ № 7, старший научный сотрудник отдела хирургических инфекций Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, к.м.н.; тел.: + 7-921-368-99-19, e-mail: gal-gal2000@mail.ru

Железова Людмила Ильинична – старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней, к.м.н.; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: ludabac@list.ru

Калиногорская Ольга Серафимовна – научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней, к.м.н.; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: kalinogorskaya@bk.ru

Иголкина Александра Александровна – младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; тел.: + 7-981-151-60-10, e-mail: gribanovaalal@bk.ru

Плешков Вячеслав Юрьевич – лаборант-исследователь научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; младший научный сотрудник отдела хирургических инфекций Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе; тел.: + 7-904-582-30-00, e-mail: slavpyle@mail.ru

Цветкова Ирина Анатольевна – научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, к.б.н.; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: i.tsvetik@gmail.com

Голева Ольга Владимировна – старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела экспериментальной медицинской вирусологии, молекулярной генетики и биобанкинга Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней, к.б.н.; тел.: + 7-921-649-05-63, e-mail: golev.ao@mail.ru

Агеевец Владимир Андреевич – старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней, к.б.н.; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: ageevets@list.ru

Насер Надежда Рамезовна – профессор кафедры общей хирургии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова; старший научный сотрудник отдела хирургических инфекций, руководитель научно-методического отдела Санкт-Петербургского научно-исследовательского института скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, д.м.н., доцент; тел.: 8(812)774-86-75, e-mail: Nadegda_nasser@mail.ru

Сидоренко Сергей Владимирович – директор Института экспериментальной микробиологии и геномики микроорганизмов Федерального научно-клинического центра инфекционных болезней; профессор кафедры медицинской микробиологии Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова, д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН; тел.: 8(812)234-17-71, e-mail: sidorserg@gmail.com