

Применение секвенирования по Сэнгеру в этиологической диагностике бактериальных осложнений в стационаре

Н. Е. БАРАНЦЕВИЧ, *Е. П. БАРАНЦЕВИЧ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Актуальность. Необходимость точной видовой идентификации микроорганизмов, вызывающих инфекционные осложнения у госпитализированных пациентов, в современном здравоохранении не вызывает сомнений. **Цель.** Определение возможности применения секвенирования по Сэнгеру при рутинном микробиологическом обследовании пациентов в клинике внутренних болезней для повышения качества этиологической диагностики бактериальных осложнений. **Материал и методы.** Исследовали клинические изоляты микроорганизмов, выделенных у пациентов многопрофильного медицинского центра. Применяли классические микробиологические методы посева и идентификации культур, секвенирование по Сэнгеру. **Результаты.** Идентификация по Сэнгеру с применением системы MicroSeq (Applied Biosystems, США) обеспечила идентификацию всех 231 исследованных изолятов бактерий — возбудителей нозокомиальных инфекций. Для дифференциальной диагностики стрептококков и коагулазонегативных стафилококков в некоторых случаях, когда известные последовательности первых 500 нуклеотидов гена *16S rRNA* двух видов различались на 1–2 нуклеотида, повышение дискриминационного уровня видовой идентификации до 100% позволяло провести валидное определение видовой принадлежности изучаемого микроорганизма. Фенотипические методы не позволили выявить значительную часть видов (25,9%) возбудителей нозокомиальных инфекций и лишь 8 (13,8%) из них идентифицировали достоверно во всех случаях. Применение секвенирования по Сэнгеру для идентификации бактерий привело к долговременному эффекту, связанному с повышением квалификации врачей-лаборантов, улучшением дискриминационных возможностей визуальной оценки макроморфологии бактериальных культур, что важно для выявления всех видов микроорганизмов, присутствующих в биосубстратах. **Заключение.** Метод секвенирования по Сэнгеру является высокоэффективным и достаточно экономичным, по сравнению с широко применяемыми в клинической практике панелями биохимических тестов, методом «золотого стандарта» в этиологической диагностике бактериальных осложнений в клинике внутренних болезней.

Ключевые слова: видовой идентификация; ген *16S rRNA*; гипервариабельные участки; MicroSeq; фенотипические методы; молекулярные методы; MALDI-TOF масс-спектрометрия; внутрибольничные; госпитальные; инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи; последипломное образование

Для цитирования: Баранцевич Н. Е., Баранцевич Е. П. Применение секвенирования по Сэнгеру в этиологической диагностике бактериальных осложнений в стационаре. *Антибиотики и химиотерапия.* 2024; 69 (9–10): 17–23. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-17-23>. EDN: KUQACM.

Use of Sanger Sequencing in Etiological Diagnostics of Bacterial Complications in Hospital Environment

NATALIA E. BARANTSEVICH, *ELENA P. BARANTSEVICH

Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia

Abstract

Background. The precise identification of microorganism species that cause infectious complications in hospitalized patients is beyond doubt relevant in modern healthcare. **The aim of this study** was to determine the possibility of using Sanger sequencing in routine microbiological examination of patients in an Internal Medicine Clinic to improve the quality of etiologic diagnosis of bacterial complications. **Material and methods.** Clinical isolates of microorganisms isolated from patients of a multidisciplinary medical center were studied. The study used classical microbiological methods of seeding and identification of cultures, as well as Sanger sequencing. **Results.** Sanger identification using the MicroSeq system (Applied Biosystems, USA) ensured identification of all 231 studied bacterial isolates – causative agents of nosocomial infections. For differential diagnostics of streptococci and coagulase-negative staphylococci, in some cases, when the known sequences of the first 500 nucleotides of the *16S rRNA* gene of two species differed by 1–2 nucleotides, increasing the discrimination level of species identification to 100% allowed valid determination of the species affiliation of the studied microorganism. Phenotypic methods failed to identify a significant proportion of species (25.9%) of nosocomial infection

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: lenabara2003@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: lenabara2003@mail.ru

pathogens, and only 8 (13.8%) of them were reliably identified in all cases. The use of Sanger sequencing to identify bacteria led to a long-term effect associated with improved qualifications of laboratory doctors, and enhanced discriminatory capabilities of visual assessment of the macromorphology of bacterial cultures, which is important for identifying all types of microorganisms present in biosubstrates. **Conclusion.** The Sanger sequencing method is highly efficient and quite cost-effective, compared to the biochemical test panels widely used in clinical practice — the «gold standard» method in the etiological diagnosis of bacterial complications in the clinic of internal diseases.

Keywords: species identification; 16S rRNA gene; hypervariable regions; MicroSeq; phenotypic methods; molecular methods; MALDI-TOF mass spectrometry; nosocomial; hospital-acquired; healthcare-associated infections; postgraduate education

For citation: Barantsevich N. E., Barantsevich E. P. Use of Sanger sequencing in etiological diagnosis of bacterial complications in hospital environment. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2024; 69 (9–10): 17–23. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-17-23>. EDN: KUQACM.

Введение

История современной микробиологии началась в XVII в., когда А. ван Левенгук сконструировал прообраз современного светового микроскопа и смог первым опубликовать данные по микроморфологии бактерий [1, 2]. В течение следующих трёх веков идентификация микроорганизмов основывалась преимущественно на анализе их микро- и макроморфологии, физиологических особенностях возбудителей [3]. Поворотным моментом в развитии медицины в целом и микробиологии в частности стало открытие структуры молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) Д. Уотсоном и Ф. Криком в 1953 г. [4, 5], однако анализ последовательности нуклеотидов стал возможен только в 1977 г., когда Ф. Сэнгер предложил метод прочтения нуклеотидных последовательностей. Метод и сегодня, после ряда усовершенствований, разработки аппаратной базы и прикладных программ, остаётся, несмотря на развитие методов секвенирования нового поколения, незаменимым методом исследования последовательности нуклеотидов различных участков геномов бактерий, является актуальным и информативным методом этиологической диагностики бактериальных осложнений в клинике внутренних болезней [6–9].

Цель исследования — определение возможности применения секвенирования по Сэнгеру при рутинном микробиологическом обследовании пациентов в клинике внутренних болезней для повышения качества этиологической диагностики бактериальных осложнений.

Материал и методы

Этиологическую диагностику бактериальных осложнений проводили в клинике НМИЦ им В. А. Алмазова в клинической микробиологической лаборатории. Выделяли чистую культуру возбудителя при инфекциях различной локализации. Методика варьировала в зависимости от локуса инфекции и исследуемой биологической пробы. При подозрении на сепсис или бактериемию у пациентов забирали кровь в объёме 20 мл, 10 из которых вносили в анаэробный, 10 — в аэробный флаконы с питательной средой, содержащей полимерные гранулы сорбента антибиотиков (Biomerieux, Франция; Becton Dickinson, США). Флаконы помещали в бактериологические анализаторы VactAlert 120 (Biomerieux, Франция) или Vactec (Becton Dickinson, США). В случае детекции

роста микроорганизма во флаконе осуществляли посев на плотную питательную среду (кровяной агар, шоколадный агар, желточно-солевой агар, уроселект, среда Эндо). При подозрении на бактериальные инфекции, локализирующиеся в органах и тканях, не являющимися в норме стерильными, осуществляли прямой посев биосубстратов (bronхоальвеолярный лаваж, мокрота, отделяемое послеоперационной раны, моча, мазки из носоглотки, фекалии и другие) на плотную питательную среду (кровяной агар, шоколадный агар, желточно-солевой агар, уроселект, среда Эндо). Посевы инкубировали при 37°C в течение 18–24 ч (при необходимости время инкубации увеличивали до 48 ч). Выделение чистой культуры возбудителя проводили на кровяном или шоколадном агаре в течение 16–24 ч при 37°C. После выделения чистой культуры проводили видовую идентификацию фенотипическим и молекулярно-генетическим методом с использованием секвенирования по Сэнгеру. Идентификацию культуры, основанную на фенотипических признаках, проводили опытные бактериологи со стажем, превышающим 20 лет, с использованием методов, которые с наибольшей частотой применялись в клинических бактериологических лабораториях для определения видовой принадлежности микроорганизмов. Идентификацию начинали с изучения макроморфологии колоний и микроморфологии возбудителя. Применяли тест с 3-сахарным агаром, оценивали подвижность микроорганизма, проводили тесты с индолем и мочевиной. При необходимости применяли 16 дополнительных биохимических тестов (MICROLATEST, Erba Lachema, Чехия). Идентификацию культур методом секвенирования по Сэнгеру проводили одновременно с фенотипическими тестами. Для этого из чистой культуры выделяли ДНК с применением набора PrepMan Ultra (Applied Biosystems, США), после чего выполняли полимеразную цепную реакцию с применением праймеров, направленных на амплификацию первых 500 нуклеотидов гена 16S рPHK, которые включают в себя гипервариабельные участки V1, V2, V3, с использованием реагентов MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Applied Biosystems, США) и в соответствии с инструкцией производителя. Полученные ампликоны затем исследовали в соответствии с протоколом MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Kits Protocol (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя, полученные результаты оценивали с помощью программы MicroSeq ID Software v. 2.0. Эта программа оценивала качество проведения анализа — длину исследуемой последовательности ДНК, а также процент совпадения с последовательностью из закрытой референсной базы данных MicroSeq ID 16S rDNA 500 Library v2.0. Идентификация до вида расценивалась как корректная при совпадении не менее 99% нуклеотидных последовательностей исследуемой пробы с референсной последовательностью, а также при длине исследуемого фрагмента ДНК, составляющей не менее 80% от референсной.

Статистическая обработка результатов. Для категориальных переменных в статистическом анализе использовали критерий Фишера χ^2 . Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследовали 231 штамм бактерий, выделенных из биосубстратов госпитализированных пациентов в соответствии с локализацией инфекционного осложнения в клинике НМИЦ им. В. А. Алмазова, в том числе 47 (20,3%) изолятов, полученных из крови, 3 (1,3%) — из клапанов сердца, 20 (8,7%) — из бронхоальвеолярного лаважа, 35 (15,2%) — из мокроты, 5 (2,2%) — из плеврального экссудата, 4 (1,7%) — из ткани лёгкого, 45 (19,5%) — из мочи, 33 (14,3%) — из отделяемого послеоперационных ран, 23 (10,0%) — из отделяемого полости рта, 9 (3,9%) — из эндометрия, 5 (2,2%) — из фекалий. При применении метода секвенирования по Сэнгеру изученные культуры микроорганизмов были отнесены к 58 различным видам, принадлежащим к 27 родам бактерий.

Исследованные штаммы были представлены *Staphylococcus aureus* — 6 (2,5%), *S. haemolyticus* — 1 (0,4%), *S. epidermidis* — 11 (4,8%), *S. capitis* — 1 (0,4%), *S. hominis* — 3 (1,3%), *S. constellatus* — 1 (0,4%), *S. warneri* — 1 (0,4%), *Streptococcus salivarius* — 8 (3,2%), *S. mitis* — 13 (5,6%), *S. parasanguinis* — 5 (2,2%), *S. pneumoniae* — 1 (0,4%), *S. cristatus* — 1 (0,4%), *S. agalactiae* — 3 (1,3%), *S. oralis* — 4 (1,7%), *S. bovis* — 2 (0,9%), *Pediococcus pentosaceus* — 1 (0,4%), *Enterococcus faecium* — 7 (3,0%), *E. faecalis* — 39 (16,9%), *E. durans* — 1 (0,4%), *E. avium* — 1 (0,4%), *Lactococcus lactis* — 1 (0,4%), *Enterobacter hormaechei* — 3 (1,3%), *E. pyrinus* — 3 (1,3%), *E. asburiae* — 1 (0,4%), *E. cancerogenus* — 3 (1,3%), *Citrobacter freundii* — 2 (0,9%), *Achromobacter xylosoxidans* — 1 (0,4%), *Bacillus cereus* — 2 (0,9%), *B. thuringiensis* — 4 (1,7%), *B. pumilus* — 1 (0,4%), *Escherichia coli* — 17 (7,4%), *Klebsiella aerogenes* (ранее *Enterobacter aerogenes*) — 2 (0,9%), *K. pneumoniae* — 7 (3,0%), *Serratia marcescens* — 3 (1,3%), *Proteus mirabilis* — 6 (2,5%), *Chryseobacterium indologenes* — 1 (0,4%), *Rhizobium radiobacter* — 1 (0,4%), *Acinetobacter genomospecies 3* — 2 (0,9%), *A. genomospecies 14* — 2 (0,9%), *A. baumannii* — 25 (10,8%), *Stenotrophomonas maltophilia* — 5 (2,2%), *Pseudomonas aeruginosa* — 9 (3,9%), *P. monteilii* — 3 (1,3%), *P. stutzeri* — 1 (0,4%), *Morganella morganii* — 1 (0,4%), *Pragia fontium* — 1 (0,4%), *Serratia marcescens* — 3 (1,3%), *Corynebacterium xerosis* — 1 (0,4%), *C. urealyticum* — 1 (0,4%), *C. mucifaciens* — 1 (0,4%), *Shewanella putrefaciens* — 1 (0,4%), *Burkholderia cepacia* — 3 (1,3%), *Rothia mucilaginosa* — 1 (0,4%), *Haemophilus influenzae* — 1 (0,4%), *Cutibacterium acne* — 2 (0,9%) изолята. При использовании фенотипических методов те же микроорганизмы были отнесены к 19 видам, принадлежащим 15 родам бактерий ($p=0,040523$).

Среди изученных видов микроорганизмов восемь (13,8%) были корректно идентифицированы фенотипическими методами во всех случаях — *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae*, *E. fae-*

cium, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *C. acne*, *H. influenzae* (рисунок).

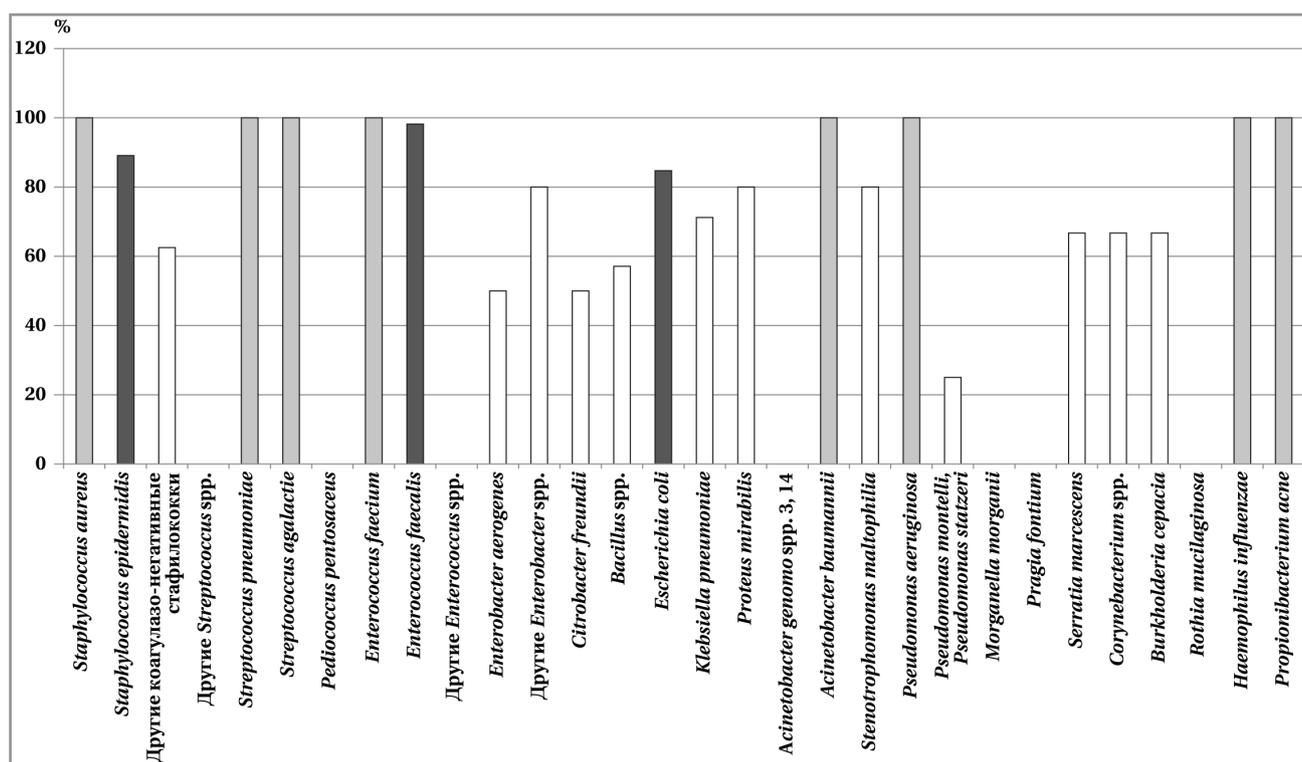
Для ряда микроорганизмов процент корректно идентифицированных до вида культур превышал уровень 70%, составляя, в порядке убывания, 98,2% для *E. faecalis*, 89,1% для *S. epidermidis*, 84,7% для *E. coli*, 80,0% для *Enterobacter* spp., 80% для *P. mirabilis*, 80% для *S. maltophilia*, 71,2% для *K. pneumoniae* (см. рисунок).

Среди исследованных культур 15 (25,9%) видов бактерий не были выявлены с применением фенотипических методов, включая *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. cristatus*, *S. agalactiae*, *S. oralis*, *S. bovis*, *P. pentosaceus*, *E. durans*, *E. avium*, *A. genomospecies 3* (*A. seifertii*), *A. genomospecies 14*, *M. morganii*, *P. fontium* (см. рисунок).

Обсуждение

Разработки в области медицинских технологий и фармакологии последних лет способствовали успешному лечению широкого спектра заболеваний, в том числе злокачественных новообразований кроветворной системы и солидных органов, которые ранее не поддавались терапии [10, 11]. Эти достижения привели к увеличению продолжительности и качества жизни [10–13]. Тем не менее, обратная сторона этих достижений, заключающаяся в резком увеличении числа пациентов, страдающих инфекционными осложнениями, поставила перед системой здравоохранения непростые задачи усовершенствования методов диагностики и лечения этих осложнений [10]. Этиологическая диагностика инфекций составляет важнейшую задачу клинических микробиологических лабораторий [14].

При интродукции метода секвенирования по Сэнгеру в рутинную практику клинической микробиологической лаборатории НМИЦ им. В. А. Алмазова были проведены тщательные экономические расчёты, которые показали, что стоимость одного исследования по идентификации бактерий на основе автоматических бактериологических анализаторов, широко используемых до настоящего времени в рутинной практике микробиологических лабораторий (Vitek 2, Biomerieux, Франция; Phoenix, BD, США; Microscan, Siemens, Германия), превышала стоимость реагентов, необходимых для проведения одного исследования последовательности первых 500 нуклеотидов гена *16S рРНК* в 1,2–1,6 раз в зависимости от компании-производителя. Использованные нами наборы биохимических тестов (MICROLATEST, Erba Lachema) не превышали стоимости секвенирования. Метод секвенирования по Сэнгеру гена *16S рРНК* был общепризнанным «золотым стандартом» идентификации бактериальных культур на момент внедрения и остаётся им до настоящего времени,



Процент корректно идентифицированных культур микроорганизмов с применением фенотипических методов.

Percentage of microbial cultures, correctly identified using phenotypic methods.

последовательность нуклеотидов именно этого региона лежит в основе идентификации микроорганизмов при исследовании разнообразия микробиоты методами секвенирования нового поколения. До настоящего времени в бактериологических лабораториях применяют методики фенотипического определения видовой принадлежности микроорганизмов, описанные в разделе «Материал и методы» и, соответственно, на этих методах основываются в значительной степени эпидемиологические данные по распространённости бактерий — этиологических агентов как внебольничных, так и госпитальных инфекций в различных регионах Российской Федерации. Нам представляется крайне важным подчеркнуть значение качества первичных микробиологических данных для адекватной оценки эпидемиологических данных в стационарах, при внебольничных инфекциях, что необходимо для принятия управленческих решений в органах здравоохранения различного уровня.

«Золотым стандартом» определения вида микроорганизма на современном этапе являются генетические методы [15, 16]. Первый этап признания генетических методик эталонными произошёл в 1987 г, когда Международный комитет по систематике бактерий (МКСБ, в последующем Международный комитет по систематике прокариот — МКСП) постановил, что в основе таксо-

номии бактерий должна лежать филогения, т. е. определение генетического родства микроорганизмов [17]. Это впоследствии нашло подтверждение в ведущих руководствах и трудах многочисленных исследователей [18–22].

В связи с изменением таксономии бактерий внедрение в клиническую практику дорогостоящих бактериологических анализаторов и методов, основанных на анализе комплекса биохимических реакций, то есть, фенотипических признаках, представляется недостаточно обоснованным. Применение секвенирования позволило получить достоверные данные по распространённости различных микроорганизмов среди возбудителей внутрибольничных инфекций.

Дальнейшие исследования показали, что в ряде случаев установленных дискриминационных критериев — 99% совпадений последовательности первых 500 пар нуклеотидов гена *16S rPHK* недостаточно для дифференциации видов некоторых микроорганизмов, как правило, некоторых коагулазонегативных стафилококков и стрептококков. Эта проблема может быть решена, по нашим наблюдениям, тремя путями: применением секвенирования иных генов, например, *groB*, или совокупности 4–7 генов «домашнего хозяйства» (мультилокусного сиквенс-анализа), повышением качества сиквенсов наряду с повышением уровня межвидовой дискриминации со стандарт-

ных 99 до 100% и/или применением доступной базы данных NCBI (Национального Центра биотехнологической информации) в случае отсутствия исследуемого вида микроорганизма в референсной базе данных [23–26].

Применение секвенирования по Сэнгеру имело незапланированный эффект, который был связан с повышением квалификации врачей бактериологов. Видовая идентификация выделенных микроорганизмов осуществлялась одновременно двумя методами — фенотипическим и методом «золотого стандарта», что позволяло сотрудникам в режиме реального времени сравнивать результаты, полученные при применении обеих методик. При этом врачи приобрели навыки определения видовой принадлежности ряда микроорганизмов, например, *V. serasia*, уже на этапе изучения макроморфологии колоний, выращенных на стандартных питательных средах.

Таким образом, сотрудники клинической микробиологической лаборатории научились в рутинной практике дифференцировать клинически важные микроорганизмы на предварительном этапе видовой идентификации, что актуально при оценке первичного посева, особенно при исследовании биосубстратов, для которых характерно наличие разнообразных возбудителей инфекций. Примером может служить исследование бронхоальвеолярного лаважа при нозокомиальных пневмониях, для которого характерно, согласно нашим наблюдениям, частое присутствие возбудителей из различных таксономических групп. Поэтому более точное понимание различий макроморфологии колоний и микроморфологии возбудителей инфекционных осложнений позволяет выявить весь комплекс микроорганизмов, которые вызвали заболевания у пациента и повысить качество оказания медицинской помощи за счёт рационального назначения антибактериальных препаратов.

Метод секвенирования по Сэнгеру, как правило, замещается в научно-практической работе другим молекулярным методом — MALDI-TOF масс-спектрометрией (времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), базирующейся на оценке белкового спектра микроорганизмов, который имеет ряд преимуществ по сравнению с методом «золотого стандарта» [27]. Эти преимущества — низкая стоимость, высокая скорость и высокая точность видовой идентификации разнообразных микроорганизмов; кроме того, методика не требует наличия высококвалифицированного персонала [16, 28–33]. Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в этиологической диагностике бактериальных осложнений, тем не менее, сопряжено с определёнными ограничениями, заключающимися в недостаточной точности определения видов ряда бактерий — возбудителей но-

зокомиальных инфекций (*Streptococcus* spp., *Neisseria* spp.), а также в невозможности контроля чистоты выделенной культуры [34–37]. Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, как и секвенирование по Сэнгеру, способен определять видовую принадлежность компонентов смешанной культуры при применении современных методик и программного обеспечения [36, 38–40].

Необходимо отметить, что возможности применения секвенирования по Сэнгеру в микробиологической практике не ограничиваются идентификацией микроорганизмов. Метод Сэнгера позволяет провести типирование возбудителей методами ПДРФ (полиморфизм длин рестриционных фрагментов), методом микросателлитного анализа и мультилокусного сиквенс-типирования, что крайне важно при расследовании вспышек внутрибольничных инфекций, а также в оценке распространения определённых сиквенс-типов актуальных возбудителей в различных стационарах и регионах [41, 42]. Метод позволяет типировать гены антимикробной резистентности, что может быть важно для подбора персонализированной антибактериальной терапии [43]. Примером может служить типирование гена *KPC* при выявлении карбапенеморезистентной *K. pneumoniae*, продуцирующей одноимённую карбапенемазу: высокоэффективный против гена *KPC 2* препарат цефтазидим-авибактам недостаточно эффективен против варианта гена *KPC 3*.

Заключение

Использование метода секвенирования по Сэнгеру — «золотого стандарта» идентификации микроорганизмов — позволяет точно определить видовую принадлежность возбудителей инфекционных осложнений в клинике внутренних болезней, а также подтвердить чистоту выделенной культуры микроорганизма. Применение его важно в образовательном процессе, особенно для последипломной подготовки высококвалифицированных кадров. Учитывая дополнительные возможности типировать микроорганизмы и гены антимикробной резистентности актуальных патогенов с помощью этого метода, он представляется полезным для практического использования как в клинической, так и учебной работе.

Дополнительная информация

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Баранцевич Наталья Евгеньевна — анализ антимикробной резистентности, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Баранцевич Елена Петровна — анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование, финальное утверждение рукописи.

Литература/References

1. *Cocquyt T, Zhou Z, Plomp J, van Eijk L.* Neutron tomography of Van Leeuwenhoek's microscopes. *Sci Adv.* 2021; 7 (20): eabf2402. doi: 10.1126/sciadv.abf2402.
2. *Wollman A. J., Nudd R., Hedlund E. G., Leake M. C.* From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *Open Biol.* 2015; 5 (4): 150019. doi: 10.1098/rsob.150019.
3. *Escobar-Zepeda A., Vera-Ponce de León A., Sanchez-Flores A.* The road to metagenomics: from microbiology to dna sequencing technologies and bioinformatics. *Front Genet.* 2015; 6: 348. doi: 10.3389/fgene.2015.00348.
4. *Watson J., Crick F.* Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature.* 1953; 171: 964–967/ doi: 10.1038/171964b0.
5. *Tan S. Y., McCoy A. N.* James Dewey Watson (1928): Co-discoverer of the structure of DNA. *Singapore Med J.* 2020; 61 (10): 507–508. doi: 10.11622/smedj.2020145.
6. *Maguin P., Marraffini L. A.* From the discovery of DNA to current tools for DNA editing. *J Exp Med.* 2021; 218 (4): e20201791. doi: 10.1084/jem.20201791.
7. *Heather J. M., Chain B.* The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016; 107 (1): 1–8. doi: 10.1016/j.ygeno.2015.11.003.
8. *Shendure J., Balasubramanian S., Church G. M., Gilbert W., Rogers J., Schloss J. A. et al.* DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature.* 2017; 9: 550 (7676): 345–353. doi: 10.1038/nature24286.
9. *Crossley B. M., Bai J., Glaser A., Maes R., Porter E., Killian M. L. et al.* Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest.* 2020; 32 (6): 767–775. doi: 10.1177/1040638720905833.
10. *Brooks H. J.* Modern microbiology — a quiet revolution with many benefits. *Australas Med J.* 2013; 6 (7): 378–381. doi: 10.4066/AMJ.2013.1830.
11. *Fuchs V. R.* New priorities for future biomedical innovations. *N Engl J Med.* 2010; 363: 704–706. doi: 10.1056/NEJMp0906597.
12. *Mishra S.* Does modern medicine increase life-expectancy: Quest for the Moon Rabbit? *Indian Heart J.* 2016; 68 (1): 19–27. doi: 10.1016/j.ihj.2016.01.003.
13. *Ranabhat C. L., Atkinson J., Park M. B., Kim C. B., Jakovljevic M.* The Influence of universal health coverage on Life Expectancy at Birth (LEAB) and Healthy Life Expectancy (HALE): a multi-country cross-sectional study. *Front Pharmacol.* 2018; 9: 960. doi: 10.3389/fphar.2018.00960.
14. *Miller J. M., Binnicker M. J., Campbell S., Carroll K. C., Chapin K. C., Gilligan P. H. et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the infectious diseases society of America and the American society for microbiology. *Clin Infect Dis.* 2018; 67 (6): e1–e94. doi: 10.1093/cid/ciy381.
15. *Peker N., Garcia-Croes S., Dijkhuizen B., Wiersma H. H., van Zanten E., Wisselink G. et al.* A comparison of three different bioinformatics analyses of the 16S-23S rRNA encoding region for bacterial identification. *Front Microbiol.* 2019; 10: 620. Published 2019 Apr 16. doi: 10.3389/fmicb.2019.00620.
16. *Barantsevich N. E., Vetokhina A. V., Ayushinova N. I., Orlova O. E., Barantsevich E. P.* *Candida auris* bloodstream infections in Russia. *Antibiotics (Basel).* 2020; 9 (9): 557. doi: 10.3390/antibiotics9090557.
17. *Wayne L. G., Brenner D. J., Colwell R., Grimont P., Krichevsky M., Moore L. H., et al.* Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1987; 37 (4): 463–464. doi: 10.1099/00207713-37-4-463.
18. *Bergey D. H., Holt J. G.* *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2000.
19. *CLSI Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing.* 29th Ed. CLSI guideline M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019.
20. *Sicheritz-Pontén T., Andersson S. G.* A phylogenomic approach to microbial evolution. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29 (2): 545–552. doi: 10.1093/nar/29.2.545.
21. *Romalde J. L., Balboa S., Ventosa A.* Editorial: microbial taxonomy, phylogeny and biodiversity. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1324. doi: 10.3389/fmicb.2019.01324.
22. *Palmer M., Steenkamp E. T., Coetzee M. P. A., Blom J., Venter S. N.* Genome-based characterization of biological processes that differentiate closely related bacteria. *Front Microbiol.* 2018; 9: 113. doi: 10.3389/fmicb.2018.00113.
23. *Bishop C. J., Aanensen D. M., Jordan G. E., Kilian M., Hanage W. P., Spratt B. G.* Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biol.* 2009; 7: 3. doi: 10.1186/1741-7007-7-3.
24. *Hanage W. P., Kaijalainen T., Herva E., Saukkoriipi A., Syrjänen R., Spratt B. G.* Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J Bacteriol.* 2005; 187 (17): 6223–6230. doi: 10.1128/JB.187.17.6223-6230.2005.
25. *Hoshino T., Fujiwara T., Kilian M.* Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (12): 6073–6085. doi: 10.1128/JCM.43.12.6073-6085.2005.
26. *Jensen A., Kilian M.* Delineation of *Streptococcus dysgalactiae*, its subspecies, and its clinical and phylogenetic relationship to *Streptococcus pyogenes*. *J Clin Microbiol.* 2012; 50 (1): 113–126. doi: 10.1128/JCM.05900-11.
27. *Агеев В. А., Сулян О. С., Авдеева А. А., Чулкова П. С., Гостев В. В., Агеев И. В., и др.* Сравнительная активность карбапенемных антибиотиков в отношении грамотрицательных продуцентов карбапенемаз различных групп. *Антибиотики и химиотер.* 2022; 67 (1–2): 9–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-9-15>. [Ageevets V. A., Sulian O. S., Avdeeva A. A., Chulkova P. S., Gostev V. V., Ageevets I. V. et al. Comparative activity of carbapenem antibiotics against gram-negative carbapenemase producers of different groups. *Antibiot Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2022; 67 (1–2): 9–15. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2022-67-1-2-9-15>. (in Russian)]
28. *Hou T. Y., Chiang-Ni C., Teng S. H.* Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal.* 2019; 27 (2): 404–414. doi: 10.1016/j.jfda.2019.01.001.
29. *Lin J. F., Ge MC, Liu T. P., Chang S. C., Lu J. J.* A simple method for rapid microbial identification from positive monomicrobial blood culture bottles through matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect.* 2018; 51 (5): 659–665. doi: 10.1016/j.jmii.2017.03.005.
30. *Tran A., Alby K., Kerr A., Jones M., Gilligan P. H.* Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2015; 53 (8): 2473–2479. doi: 10.1128/JCM.00833-15.
31. *Elbehiry A., Aldubaib M., Abalkhail A., Marzouk E., Albeloushi A., Moussa I. et al.* How M.A.LDI-TOF mass spectrometry technology contributes to microbial infection control in healthcare settings. *Vaccines (Basel).* 2022; 10 (11): 1881. doi: 10.3390/vaccines10111881.
32. *Баранцевич Е. П., Баранцевич Н. Е.* Применение MALDI-TOF масс-спектрометрии в клинической микробиологии. *Трансляционная медицина.* 2014; 3: 23–28. doi: <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2014-0-3-23-28>. [Barantsevich E. P., Barantsevich N. E. MALDI-TOF mass-spectrometry in clinical microbiology. *Translational Medicine.* 2014; (3): 23–28. doi: <https://doi.org/10.18705/2311-4495-2014-0-3-23-28>. (in Russian)]
33. *Calderaro A., Chezzi C.* MALDI-TOF MS: A reliable tool in the real life of the clinical microbiology laboratory. *Microorganisms.* 2024; 12 (2): 322. doi: <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020322>.
34. *Morel F., Jacquier H., Desroches M., Filhman V., Kumanski S., Cambau E., et al.* Use of Andromas and Bruker M.A.LDI-TOF MS in the identification of *Neisseria*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018; 37 (12): 2273–2277. doi: 10.1007/s10096-018-3368-6.
35. *Nybakken E. J., Oppegaard O., Gilhuus M., Jensen C. S., Mylvaganam H.* Identification of *Streptococcus dysgalactiae* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; refining the database for improved identification. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021; 99 (1): 115207. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115207.
36. *Mörtelmaier C., Panda S., Robertson I., Krell M., Christodoulou M., Reichardt N., et al.* Identification performance of MALDI-ToF-MS upon mono- and bi-microbial cultures is cell number and culture proportion dependent. *Anal Bioanal Chem.* 2019; 411 (26): 7027–7038. doi: 10.1007/s00216-019-02080-x.
37. *Hong E., Bakhalek Y., Taha M. K.* Identification of *Neisseria meningitidis* by MALDI-TOF MS may not be reliable. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25 (6): 717–722. doi: 10.1016/j.cmi.2018.09.015.
38. *Chen L., Gao W., Tan X., Han Y., Jiao F., Feng B., Xie J., Li B., Zhao H., Tu H., Yu S., Wang L.* MALDI-TOF MS is an effective technique to classify specific microbiota. *Microbiol Spectr.* 2023; 11: e00307–23. doi: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00307-23>.
39. *Yang Y., Lin Y., Qiao L.* Direct M.A.LDI-TOF MS Identification of Bacterial Mixtures. *Anal Chem.* 2018; 90 (17): 10400–10408. doi: 10.1021/acs.analchem.8b02258.
40. *Prakash S., Racovita A., Petrucci T., Galizi R., Jaramillo A.* qSanger: quantification of genetic variants in bacterial cultures by sanger sequencing. *Biodes Res.* 2023; 5: 0007. doi: 10.34133/bdr.0007.
41. *Tewolde R., Dallman T., Schaefer U., Sheppard C. L., Ashton P., Pichon B., et al.* MOST: a modified MLST typing tool based on short read sequencing. *Peer J.* 2016; 4: e2308. doi: <https://doi.org/10.7717/peerj.2308>.
42. *Nutman A., Marchaim D.* How to: molecular investigation of a hospital outbreak. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25 (6): 688–695. doi: 10.1016/j.cmi.2018.09.017.
43. *Баранцевич Е. П., Баранцевич Н. Е., Шляхто Е. В.* Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге. *Клиническая микробиология и антимикробная хи-*

миотерапия. 2016; 18 (3): 196–199. [Barantsevich E. P., Barantsevich N. E., Shlyakhto E. V. Production of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Saint-Petersburg. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2016; 18 (3): 196–199. (in Russian)]

Поступила / Received 17.09.2024
Принята в печать / Accepted 28.09.2024

Информация об авторах

Баранцевич Наталья Евгеньевна — научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. eLIBRARY: SPIN-код: 3914-4499. AuthorID: 785835. Scopus Author ID: 55880381000. ORCID ID: 0000-0002-1000-2240

Баранцевич Елена Петровна — д. м. н., Заведующая научно-исследовательским отделом микробиологии и внутрибольничных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия. eLIBRARY: SPIN-код: 3534-1010. AuthorID: 268934. Scopus Author ID: 6601955793. WOS Research ID S-1455-2016. ORCID ID: 0000-0002-4800-3345

About the authors

Natalia E. Barantsevich — Research fellow, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia. eLIBRARY: SPIN-code: 3914-4499. AuthorID: 785835. Scopus Author ID: 55880381000. ORCID ID: 0000-0002-1000-2240

Elena P. Barantsevich — D. Sc. in Medicine, Head of the Research Department of Microbiology and Nosocomial Infections, Almazov National Medical Research Centre, Saint-Petersburg, Russia. eLIBRARY: SPIN-code: 3534-1010. AuthorID: 268934. Scopus Author ID: 6601955793. WOS Research ID S-1455-2016. ORCID ID: 0000-0002-4800-3345