



© Коллектив авторов, 2024
УДК [616.24-036.11 : 579.22] : 575.113
<https://doi.org/10.24884/1607-4181-2024-31-4-19-26>

А. А. Иванова^{1*}, А. А. Передерий¹, А. С. Попенко², Е. В. Венев³, А. В. Фадеев¹,
Д. А. Гусев³, Д. М. Даниленко¹, А. Б. Комиссаров¹, Д. А. Лиознов^{1, 4}

¹ Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.15/17

² Независимый исследователь, Санкт-Петербург, Россия

³ Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина
195067, Россия, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 49

⁴ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОБИОМА ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ РЕСПИРАТОРНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ ПО ДАННЫМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ГЕНА 16S rРНК

Поступила в редакцию 26.10.2024 г.; принята к печати 12.12.2024 г.

Резюме

Введение. Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются одной из основных причин заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний в мире. Респираторные инфекции могут быть вызваны патогенами различной природы: вирусами, бактериями, микоплазмами и др. Быстрая и точная идентификация в биологических образцах патогенов, таких как бактерии является важной задачей, для которой используется секвенирование гена 16S rРНК с применением платформ нового поколения.

Цель — сравнительный анализ качественных характеристик микробиома ротоглотки здоровых добровольцев и больных ОРИ неустановленной этиологии по данным секвенирования гена 16S rРНК.

Методы и материалы. Получены и проанализированы данные секвенирования MiSeq Illumina региона V3 – V4 16S rРНК мазков из ротоглотки госпитализированных пациентов с симптомами ОРИ и здоровых пациентов.

Результаты. Был проведен анализ данных секвенирования области V3 – V4 16S rРНК у 116 госпитализированных пациентов с симптомами ОРИ и 81 здорового пациента. У пациентов с ОРИ наблюдалось более высокое содержание условно-патогенной микрофлоры, в частности *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Aeribacillus*, *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium-Methylorubrum*, *Rhodococcus equi*. В контрольных образцах преобладала нормальная комменсальная микробиота дыхательных путей, такая как *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veilonella*.

Выводы. В образцах микробиоты госпитализированных пациентов с ОРИ обнаружено преобладание оппортунистической и потенциально патогенной микробиоты, в то время как у здоровых добровольцев преобладают нормальные представители микробиоты дыхательных путей. Для более детального анализа необходимы данные о видовом составе микробиоты, которые можно получить при секвенировании полной последовательности гена 16S rРНК.

Ключевые слова: острые респираторные инфекции (ОРИ), микробиом, 16S секвенирование

Для цитирования: Иванова А. А., Передерий А. А., Попенко А. С., Венев Е. В., Фадеев А. В., Гусев Д. А., Даниленко Д. М., Комиссаров А. Б., Лиознов Д. А. Характеристика микробиома верхних дыхательных путей больных острыми респираторными инфекциями по данным секвенирования гена 16S rРНК. *Ученые записки ПСПбГМУ им. акад. И. П. Павлова*. 2024;31(4):19 – 26. <https://doi.org/10.24884/1607-4181-2024-31-4-19-26>.

* Автор для связи: Анна Андреевна Иванова, ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России, 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.15/17. E-mail: anna_e_svododniy@mail.ru.

Anna A. Ivanova^{1*}, Alexander A. Perederiy¹, Anna S. Popenko², Evgeniy V. Venev³, Artem V. Fadeev¹, Denis A. Gusev³, Daria M. Danilenko¹, Andrey B. Komissarov¹, Dmitry A. Lioznov¹

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza

15/17, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, Russia, 197022

² Independent Researcher, Saint-Petersburg, Russia

³ Botkin Clinical Hospital for Infectious Diseases

49, Piskarevsky ave., Saint Petersburg, Russia, 195067

⁴ Pavlov University

6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russia, 197022

CHARACTERIZATION OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT MICROBIOME OF PATIENTS WITH ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS BY 16S rRNA SEQUENCING

Received 26.10.2024; accepted 12.12.2024

Summary

Introduction. Acute respiratory infections (ARI) are one of the main causes of morbidity and mortality from infectious diseases in the world. Respiratory infections can be caused by pathogens of various etiologies: viruses, bacteria, mycoplasmas, etc. Rapid and accurate identification of pathogens, such as bacteria, in biological samples is an important task, for which 16S rRNA gene sequencing using new generation platforms is used.

The **objective** was a comparative analysis of the qualitative characteristics of the oropharyngeal microbiome of healthy volunteers and patients with ARI of unknown etiology based on the 16S rRNA gene sequencing.

Methods and materials. Using V3–V4 region of 16S rRNA Illumina MiSeq sequences from oropharyngeal swabs, we analyzed the microbiome of hospitalized patients with ARI symptoms and healthy patients.

Results. In this study, we conducted V3–V4 region of 16S rRNA sequencing analyses of the oropharyngeal samples from 116 hospitalized patients with ARI symptoms and 81 healthy patients. Patients with ARI exhibited higher abundance of opportunistic pathogens, particularly *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Aeribacillus*, *Acinetobacter baumannii*, *Methylobacterium-Methylobacterium*, *Rhodococcus equi*. In the control samples, normal commensal respiratory tract microbiota, such as *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veilonella* was dominated.

Conclusions. The microbiota samples of hospitalized patients with ARI showed a predominance of opportunistic and potentially pathogenic microbiota, while normal representatives of the respiratory tract microbiota predominate in healthy volunteers. For a more detailed analysis, data on the species composition of the microbiota is required, which can be obtained by sequencing the complete sequence of the 16S rRNA gene.

Keywords: acute respiratory infection (ARI), microbiome, 16S sequencing

For citation: Ivanova A. A., Perederiy A. A., Popenko A. S., Venev E. V., Fadeev A. V., Gusev D. A., Danilenko D. M., Komissarov A. B., Lioznov D. A. Characterization of the upper respiratory tract microbiome of patients with acute respiratory infections by 16S rRNA sequencing. *The Scientific Notes of Pavlov University*. 2024;31(4):19–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.24884/1607-4181-2024-31-4-19-26>.

* **Corresponding author:** Anna A. Ivanova, Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia. E-mail: anna_e_svbodniy@mail.ru.

ВВЕДЕНИЕ

Острые респираторные инфекции (ОРИ) являются одной из основных причин заболеваемости и смертности от инфекционных заболеваний в мире и представляют значительную проблему глобального здравоохранения. Респираторные инфекции могут быть вызваны патогенами различной этиологии: вирусами, бактериями, микоплазмами и пр. Несмотря на широкое применение метода ПЦР в реальном времени в диагностике инфекционных болезней, значимая доля случаев ОРИ остается нерасшифрованной. По данным российских авторов доля респираторных инфекций неуточненной этиологии по результатам ПЦР-диагностики (8 эпидемических сезонов 2015–2022 гг.) составляла от 30,0 до 63,3 % от общего количества тестируемых [1–3]. В других странах количество пациентов с ОРИ неопределенной этиологии составляло 7–43 % [4–6]. Быстрое развитие и коммерческая доступность технологий секвенирования следующего поколения (NGS) дало

возможность с большей точностью проводить метагеномные исследования, которые позволяют оценивать все разнообразие генетического материала, содержащегося во всех биологических единицах в различных образцах, и без необходимости выделения и культивирования микроорганизмов определять последовательность их генома [7, 8]. Широкое применение в метагеномике получил подход, основанный на секвенировании нуклеотидной последовательности гена малой субъединицы 16S рибосомальной РНК (16S рРНК). Ген, кодирующий 16S рРНК, содержит как высококонсервативные последовательности, которые могут быть использованы для посадки универсальных праймеров для ПЦР, так и гипервариабельные участки, которые отражают специфические признаки определенных таксонов бактерий [9]. Для классификации бактерий используется как секвенирование отдельных гипервариабельных регионов [10], так и полной последовательности гена 16S рРНК [11].

Целью данной работы является сравнительный анализ качественных характеристик микробиом ротоглотки здоровых добровольцев и больных ОРВИ неустановленной этиологии по данным секвенирования гена 16S рРНК.

МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛЫ

В исследование включен клинический материал (мазки из ротоглотки) от 116 больных ОРВИ и 81 здорового добровольца. Забор клинического материала выполняли в приемном отделении СПб ГБУЗ «КИБ им. С. П. Боткина» и в клинике ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России соответственно, в эпидемические сезоны 2021 – 2022 гг., 2022 – 2023 гг., 2023 – 2024 гг. Все обследованные были старше 18 лет.

Для забора материала использовали сваб-системы со средой UTM-RT (Coraп, Италия) и системы для сбора образцов (Sansure Biotech, Китай).

Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл образца с использованием набора для выделения РНК на магнитных частицах NAmagp2000 (ООО «Биолабмикс», Россия) и автоматизированной системы выделения и очистки нуклеиновых кислот Auto-Pure 96 (Allsheng, Китай).

Для первой группы образцов была проведена предварительная ПЦР-диагностика на присутствие нуклеиновых кислот известных возбудителей ОРВИ (вирусы гриппа А и В, коронавирус SARS-CoV-2, респираторно-синцитиальный вирус, метапневмовирус, вирусы парагриппа 1 – 4 типов, сезонные коронавирусы видов OC43, E229, NL63, HKUI, риновирус, аденовирусы групп В, С и Е, бокавирус) при помощи наборов АмплиСенс Influenza virus A/B-FL, АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit (PCR-Fluorescence Probing) (Sansure Biotech, Китай). В дальнейшую работу взяты образцы, в которых по результатам ПЦР-диагностики не было обнаружено нуклеиновых кислот данных вирусов.

Качество забора образцов оценено в ПЦР в реальном времени с использованием праймеров на ген рибонуклеазы Р человека (RNP) в составе системы для детекции РНК вируса SARS-CoV-2 (ген N) (ООО «Биолабмикс», Россия). В дальнейшее исследование взяты мазки со значением цикла меньше 30 ($C_q < 30$).

Амплификацию участков V3 и V4 гена 16S рРНК проводили согласно протоколу Illumina (США) [12] с использованием набора реагентов для ОТ-ПЦР БиоМастер ОТ-ПЦР – Премиум (2х) (ООО «Биолабмикс», Россия) и амплификатора CFX96 (BioRad, США). Продукты ПЦР были очищены с использованием магнитных частиц AMPure XT (Beckman Coulter Life Sciences, США).

Секвенирование проводили на приборе Illumina MiSeq при помощи набора реагентов MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle). Использовали наборы

индексирующих олигонуклеотидов Illumina DNA/RNA UD Indexes (Set A, B). После индексирования библиотеки очищали магнитной силикой AmPure XP (Beckman Coulter Life Sciences, США). Концентрация библиотек была оценена при помощи флуориметра Qubit и набора реагентов Qubit™ dsDNA Quantification Assay Kit (Invitrogen, США). Оценка количества прочтений проводилась при помощи инструмента FASTQC, оценка качества библиотек – при помощи инструмента MultiQC.

Прочтения были обработаны программным комплексом QIIME v2 (2024.5) [13].

Данные каждого образца после деноезинга были прорежены до 10 000 прочтений, для каждого из них были посчитаны процентные соотношения бактериальных родов, а также индексы альфа-разнообразия по формуле Шенона [14] и Чао [15].

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева» Минздрава России № 218 от 26.04.2024 г.

Анализ микробных сообществ проводился с использованием метода линейного дискриминантного анализа размера эффекта (LEfSe) для выявления дифференциально распространенных таксонов в различных группах образцов. Тест Краскела – Уоллиса использовался для выявления существенных различий в распространенности таксонов между группами, после чего применялись парные ранговые тесты Вилкоксона для дальнейшей проверки. LEfSe применялся для определения линейных дискриминантных оценок, что позволяло идентифицировать потенциальные биомаркеры, характеризующие отдельные микробные профили, связанные с изучаемыми группами образцов. Статистическая значимость была установлена на уровне 0,05 на протяжении всего анализа [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Контрольная и основная группа были равномерно распределены по полу (тест χ^2 , p-value = 0,65) (табл. 1), но не по возрасту (тест Манна – Уитни, p-value = $3,952 \cdot 10^{-5}$) (табл. 2).

Сравнение альфа-разнообразия не выявило значимых отличий между выборками больных ОРВИ и здоровых добровольцев ни по одному из индексов (тест Манна – Уитни, Chao: p-value = 0,89, Shannon: p-value = 0,49). Анализ методом PERMANOVA [17] показал значимые отличия между основной и контрольной группами (p-value = $9,99 \cdot 10^{-4}$). Для анализа различий микробиомного состава использован пакет NearestBalance [18] для программного языка R [19].

Полученные данные свидетельствуют, что группе больных ОРВИ наблюдалась большая представленность классов бактерий *Bacilli*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* и *Alpha-proteobacteria* по сравнению со здоровыми волонтерами (рис. 2). Группы бактериальных таксонов,

Таблица 1

Распределение обследованных по полу

Table 1

Gender distribution between groups			
Группа	Женщины	Мужчины	Всего
Здоровые	43 (61 %)	28 (39 %)	81
Больные ОРИ	65 (56 %)	51 (44 %)	116

Таблица 2

Распределение обследованных по возрасту

Table 2

Age distribution between groups	
Группа	Возраст среднее ± среднее отклонение, лет
Здоровые	41 ±15
Больные ОРИ	56 ±24

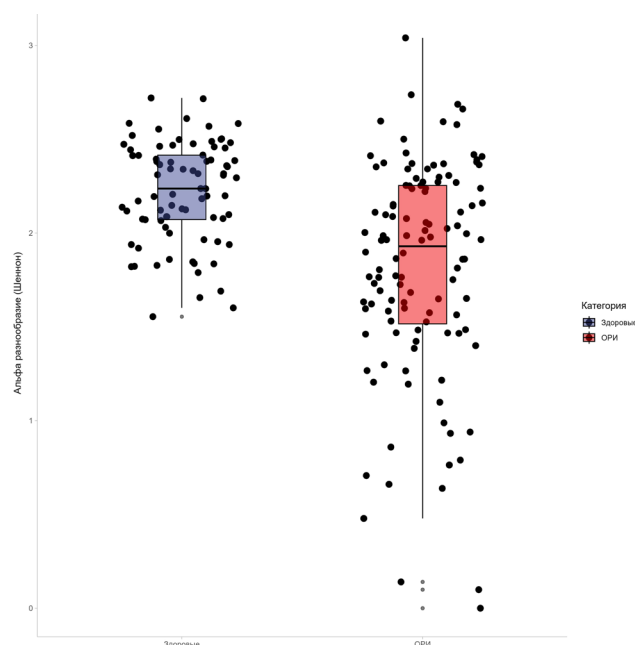


Рис. 1. Альфа-разнообразие микробиоты ротоглотки (по индексу Шеннона) у здоровых волонтеров и больных ОРИ неустановленной этиологии

Fig. 1. Alpha diversity of nasopharynx microbiome (by Shannon index) in healthy volunteers and patients with unidentified ARI

которые чаще выявляли у больных ОРИ, были филогенетически разнородны, за исключением сем. *Comamonadaceae*, входящего в состав пор. *Burkholderiales* (рис. 3).

Согласно данным литературы, не существует универсального микробиома носоглотки человека [20]. У клинически здоровых людей выделяют четыре микробиотипа: 1) смешанный с преобладанием *Staphylococcus* и *Corynebacterium*; 2) с преобладанием *Moraxella*; 3) с преобладанием *Streptococcus*; 4) с преобладанием *Fusobacterium* [21]. Так, у здоровых добровольцев мы наблюдаем преобладание нормальных комменсальных обита-

телей микробиоты дыхательных путей, таких как *Neisseria*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veilonella* [22].

Нами показано, что у больных ОРИ неустановленной этиологии происходило изменение структуры микробиома с увеличением представленности фирмикутов (*Staphylococcaceae*), альфапротеобактерий (*Beijerinckiaceae*), гаммапротеобактерий (*Moraxellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*).

Некоторые представители выявленных у больных ОРИ родов бактерий относятся к условным или явным патогенным микроорганизмам. Следует отметить преобладание стафилококков (род *Staphylococcus*), некоторые из которых вызывают воспалительные процессы в верхних и нижних дыхательных путях [23]. Так, *Staphylococcus aureus* является возбудителем респираторных инфекций у детей [24], обнаруживается в микрофлоре слизистой оболочки носоглотки у беременных женщин с симптомами ОРИ [25]. Род *Ralstonia* преобладает у курильщиков, в том числе бывших [26]. Резистентная к карбапенемам бактерия *Acinetobacter baumannii* вызывает тяжелые пневмонии с высокой смертностью среди пациентов в критическом состоянии на искусственной вентиляции легких и в отделениях интенсивной терапии [27, 28]. Также условно-патогенную микрофлору, в частности *Acinetobacter baumannii*, обнаруживали в легких у больных COVID-19 [29]. Представители рода *Deinococcus* часто встречаются у пациентов при пневмонии [30]. *Rhodococcus equi* может стать возбудителем инфекции дыхательных путей, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [31].

Необходимо учитывать, что идентификация генетического материала тех или иных бактериальных патогенов в образцах от больных ОРИ не позволяет установить причинно-следственную связь между микроорганизмом и заболеванием. Кроме того, ограничением при проведении анализа микробиома с помощью секвенирования

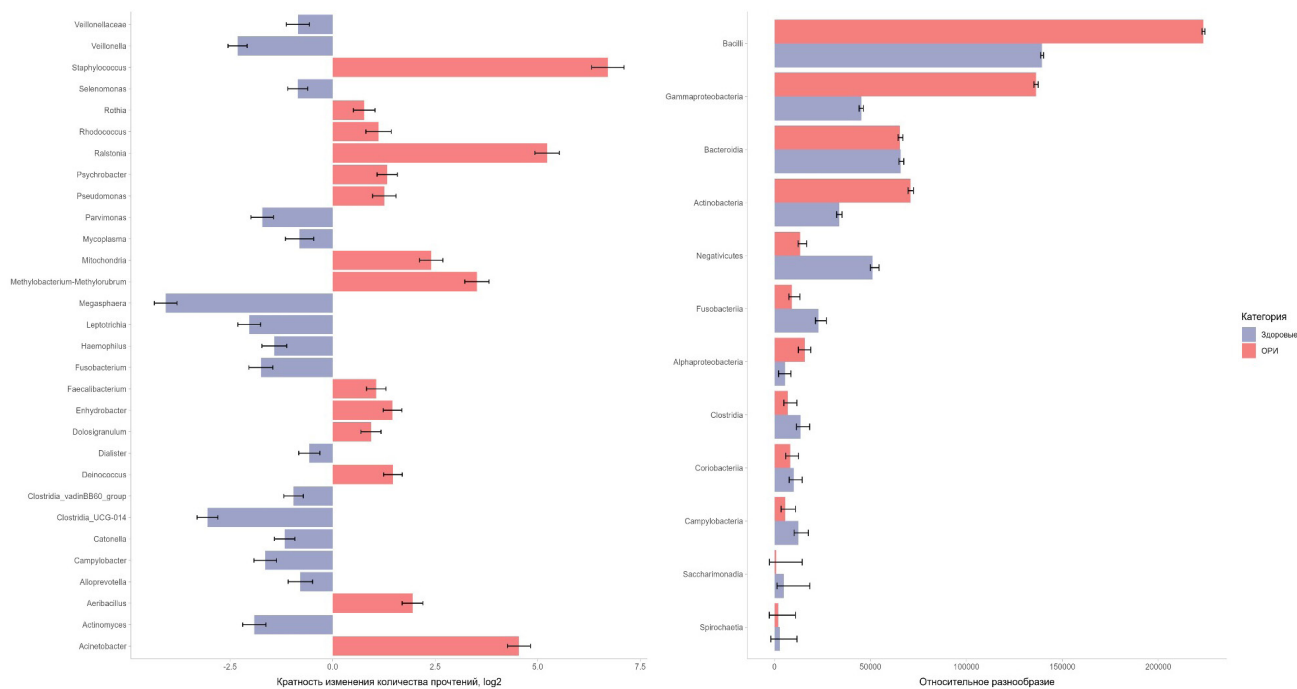


Рис. 2. Кратность изменения представленности различных родов микроорганизмов в ротоглотке (слева), разнообразие микробиоты ротоглотки (справа) у больных ОРИ по сравнению со здоровыми добровольцами

Fig. 2. Log2-Fold change in abundance of the microorganisms contributing to the microbiome of patients with ARI in comparison to healthy volunteers (left), relative abundance of different classes of bacteria in healthy volunteers and patients with ARI (right)

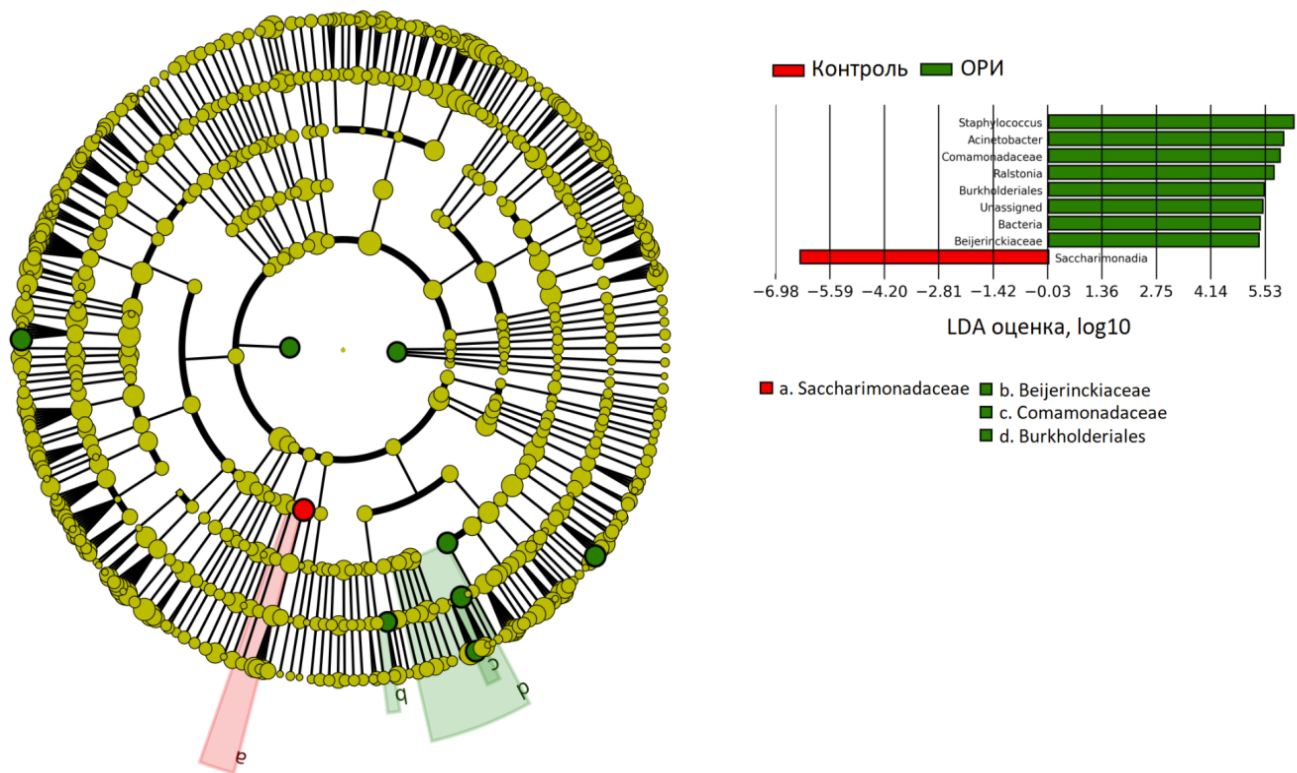


Рис. 3. Кладограмма филогенетической близости таксономических групп бактерий, представленность которых отличается у больных ОРИ и здоровых добровольцев (рассчитано с помощью инструмента LefSe)

Fig. 3. Cladogram illustrating phylogenetic relationship between bacterial taxa differentially abundant in ARI patients and healthy volunteers (calculated using LefSe)

фрагмента гена 16S рРНК является его низкая разрешающая способность. Так, секвенирование V3 и V4 участков не позволяет проводить таксономическую идентификацию до вида. Таким образом, повышенная представленность тех или иных таксономических групп может свидетельствовать

как о появлении бактерий, способных вызывать острую респираторную инфекцию у иммунокомпетентных пациентов, так и об изменениях микробиоты ротоглотки при вирусной инфекции неустановленной этиологии.

ВЫВОДЫ

В мазках из ротоглотки госпитализированных больных ОРИ обнаружено преобладание оппортунистической и потенциально патогенной микрофлоры — фирмикутов (*Staphylococcaceae*), альфапротеобактерий (*Beijerinckiaceae*), гаммапротеобактерий (*Moraxellaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*), в то время как у здоровых добровольцев преобладают представители нормальной микробиоты носоглотки.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе. Подробная информация содержится в Правилах для авторов.

Compliance with ethical principles

The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study. Author Guidelines contains the detailed information.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках государственного задания «Комплексный подход для генетической характеристики и ранней идентификации патогенов с эпидемическим и пандемическим потенциалом на основе метабеномного секвенирования», код темы: TVKQ-2024-0003.

Financing

The study was carried out as a part of the state task «An integrated approach for the genetic characterization and early identification of pathogens with epidemic and pandemic potential based on metagenomic sequencing», code: TVKQ-2024-0003.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kurskaya O. G., Prokopyeva E. A., Sobolev I. A. et al. Changes in the Etiology of Acute Respiratory Infections among Children in Novosibirsk, Russia, between 2019 and 2022: The Impact of the SARS-CoV-2 Virus // *Viruses*. – 2023. – Vol. 15, № 4. – P. 934. <https://doi.org/10.3390/v15040934>.
2. Бурцева Е. И., Колобухина Л. В., Воронина О. Л. и др. Особенности циркуляции возбудителей ОРВИ на фоне появления и широкого распространения SARS-CoV-2 в 2018–2021 годы // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2022. – Т. 21, № 4. – С. 16–26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-16-26>.

3. Соминина А. А., Даниленко Д. М., Столяров К. А. и др. Интерференция SARS-CoV-2 с другими возбудителями респираторных вирусных инфекций в период пандемии // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2021. – Т. 20, № 4. – С. 28–39. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-28-39>.
4. Huang X. B., Yuan L., Ye C. X. et al. Epidemiological characteristics of respiratory viruses in patients with acute respiratory infections during 2009–2018 in Southern China // *Int J Infect Dis*. – 2020. – Vol. 98. – P. 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.051>.
5. Sanz I., Perez D., Rojo S. et al. Coinfections of influenza and other respiratory viruses are associated to children // *An Pediatr (Engl Ed.)*. – 2022. – Vol. 96, № 4. – P. 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2021.03.002>. PMID: 35609953.
6. Milucky J. L., Compaore T., Obulbiga F. et al. Estimating the catchment population and incidence of severe acute respiratory infections in a district hospital in Boussé, Burkina Faso // *J Glob Health*. – 2020. – Vol. 10, № 1. – P. 010422. <https://doi.org/10.7189/jogh.10.010422>.
7. Simner P. J., Miller S., Carroll K. C. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases // *Clin Infect Dis*. – 2018. – Vol. 66, № 5. – P. 778–788. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>.
8. Datta S., Budhauriya R., Das B. et al. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses // *World J Virol*. – 2015. – Vol. 4, № 3. – P. 265–76. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i3.265>.
9. Clarridge J. E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clin Microbiol Rev*. – 2004. – Vol. 17, № 4. – P. 840–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>.
10. Мохов А. С., Азаров Д. В., Колоджиева В. В. и др. Особенности структуры микробиома верхних дыхательных путей амбулаторных и госпитализированных пациентов с новой коронавирусной инфекцией // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2022. – Т. 3, № 84. – С. 51–56. https://doi.org/10.47843/2074-9120_2022_3_51.
11. Low L., Fuentes-Utrilla P., Hodson J. et al. Evaluation of full-length nanopore 16S sequencing for detection of pathogens in microbial keratitis // *PeerJ*. – 2021. – Vol. 9. – P. e10778. <https://doi.org/10.7717/peerj.10778>.
12. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. URL: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf/accessed 01.10.2024).
13. Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nat Biotechnol*. – 2019. – Vol. 37, № 8. – P. 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
14. Shannon C. E. A mathematical theory of communication // *The Bell System Technical Journal*. – 1948. – Vol. 27, № 3. – P. 379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>.
15. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population // *Scandinavian Journal of Statistics*. – 1984. – Vol. 11, № 4. – P. 265–70.
16. Segata N., Izard J., Waldron L. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation // *Genome Biol*. – 2011. – Vol. 12, № 6. – P. R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.
17. Anderson M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) // *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*. – 2017. – P. 1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>.
18. Odintsova V. E., Klimenko N., Tyakht A. V. Note on the Difference between the Principal Balance Analysis with

NearestBalance and Constrained Methods // *mSystems*. – 2023. – Vol. 8, № 2. – P. e0016423. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00164-23>.

19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. URL: <https://www.R-project.org/> (accessed 01.10.2024).

20. Лопатин А. С., Азизов И. С., Козлов Р. С. Микробиом полости носа и околоносовых пазух в норме и при патологии. Часть I // *Российская ринология*. – 2021. – Т. 29, № 1. – С. 23–30. <https://doi.org/10.17116/rosrino20212901123>.

21. De Boeck I., Wittouck S., Wuyts S. et al. Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 2372. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02372>.

22. Natalini J. G., Singh S., Segal L. N. The dynamic lung microbiome in health and disease // *Nat Rev Microbiol.* – 2023. – Vol. 21. – P. 222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>.

23. Li R., Li J., Zhou X. Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases // *Signal Transduct Target Ther.* – 2024. – Vol. 9, № 1. – P. 19. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01722-y>.

24. Türkmen Recen Ö., Gazi H., Bayturan Şen S. et al. SARS-CoV-2 Pandemisinin İlerleyen Dönemlerinde Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu ile Başvuran Çocuklarda Viral Patojenlerin Mevsimsel Eğilimleri ve Etkileşimleri [Seasonal Trends and Interactions of Viral Pathogens in Children Presenting with Acute Respiratory Tract Infections in the Advancing Periods of SARS-CoV-2 Pandemic] // *Mikrobiyol Bul.* – 2023. – Vol. 57, № 4. – P. 580–596. Turkish. <https://doi.org/10.5578/mb.20239947>.

25. Костинов М. П., Мещерякова А. К., Фошина Е. П. и др. Клиническое течение острой респираторной инфекции и состояние микробиоценоза верхних дыхательных путей у беременных // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2012. – Т. 5. – С. 12–16.

26. Campos M., Cickovski T., Fernandez M. et al. Lower respiratory tract microbiome composition and community interactions in smokers // *Access Microbiol.* – 2023. – Vol. 5, № 3. – P. acmi000497.v3. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000497.v3>.

27. Yoon J. G., Lim S., Hyun H. J. et al. Respiratory microbiome and clinical course of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in critically ill patients // *Medicine (Baltimore)*. – 2024. – Vol. 103, № 31. – P. e38988. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000038988>.

28. Xiao T., Guo Q., Zhou Y. et al. Comparative Respiratory Tract Microbiome Between Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Colonization and Ventilator Associated Pneumonia // *Front Microbiol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 782210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.782210>.

29. Xie L., Chen L., Li X. et al. Analysis of Lung Microbiome in COVID-19 Patients during Time of Hospitalization // *Pathogens*. – 2023. – Vol. 12, № 7. – P. 944. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070944>.

30. Xia X., Chen J., Cheng Y. et al. Comparative analysis of the lung microbiota in patients with respiratory infections, tuberculosis, and lung cancer: A preliminary study // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2022. – Vol. 12. – P. 1024867. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1024867>.

31. Lin W. V., Kruse R. L., Yang K. et al. Diagnosis and management of pulmonary infection due to *Rhodococcus equi* // *Clin Microbiol Infect.* 2019. – Vol. 25, № 3. – P. 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.033>.

among Children in Novosibirsk, Russia, between 2019 and 2022: The Impact of the SARS-CoV-2 Virus // *Viruses*. 2023;15(4):934. <https://doi.org/10.3390/v15040934>.

2. Burtseva E. I., Kolobukhina L. V., Voronina O. L. et al. Features of the Circulation of ARVI Pathogens During of Emergence and Widespread of SARS-CoV-2 in the 2018–2021 // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2022;21(4):16–26. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-16-26>.

3. Somnina A. A., Danilenko D. M., Stolyarov K. A. et al. Interference of SARS-CoV-2 with other Respiratory Viral Infections agents during Pandemic // *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2021;20(4):28–39. (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-4-28-39>.

4. Huang X. B., Yuan L., Ye C. X. et al. Epidemiological characteristics of respiratory viruses in patients with acute respiratory infections during 2009–2018 in Southern China // *Int J Infect Dis.* 2020;98:21–32. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.051>.

5. Sanz I., Perez D., Rojo S. et al. Coinfections of influenza and other respiratory viruses are associated to children // *An Pediatr (Engl Ed)*. 2022;96(4):334–341. <https://doi.org/10.1016/j.anpede.2021.03.002>. PMID: 35609953.

6. Milucky J. L., Compaore T., Obulbiga F. et al. Estimating the catchment population and incidence of severe acute respiratory infections in a district hospital in Boussé, Burkina Faso // *J Glob Health*. 2020;10(1):010422. <https://doi.org/10.7189/jogh.10.010422>.

7. Simner P. J., Miller S., Carroll K. C. Understanding the Promises and Hurdles of Metagenomic Next-Generation Sequencing as a Diagnostic Tool for Infectious Diseases // *Clin Infect Dis.* 2018;10;66(5):778–788. <https://doi.org/10.1093/cid/cix881>.

8. Datta S., Budhaliya R., Das B. et al. Next-generation sequencing in clinical virology: Discovery of new viruses // *World J Virol.* 2015;4(3):265–76. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i3.265>.

9. Clarridge J. E. 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases // *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840–62. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>.

10. Mokhov A. S., Azarov D. V., Kolodzhieva V. V. et al. Features of the microbiome structure of the upper respiratory tract of outpatient and patients with a new coronavirus infection // *Preventive and Clinical Medicine*. 2022;3(84):51–56. (In Russ.). https://doi.org/10.47843/2074-9120_2022_3_51.

11. Low L., Fuentes-Utrilla P., Hodson J. et al. Evaluation of full-length nanopore 16S sequencing for detection of pathogens in microbial keratitis // *PeerJ*. 2021;9:e10778. <https://doi.org/10.7717/peerj.10778>.

12. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation. URL: https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf (accessed 01.10.2024).

13. Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.

14. Shannon C. E. A mathematical theory of communication // *The Bell System Technical Journal*. 1948;27(3):379–423. <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>.

15. Chao A. Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population // *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984;11(4):265–70.

16. Segata N., Izard J., Waldron L. et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation // *Genome Biol.* 2011;12(6):R60. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-6-r60>.

REFERENCES

1. Kurskaya O. G., Prokopyeva E. A., Sobolev I. A. et al. Changes in the Etiology of Acute Respiratory Infections

17. Anderson M. J. Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA) // Wiley StatsRef: Statistics Reference Online. 2017;1–15. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>.
18. Odintsova V. E., Klimenko N., Tyakht A. V. Note on the Difference between the Principal Balance Analysis with *NearestBalance* and Constrained Methods // *mSystems*. 2023;8(2):e0016423. <https://doi.org/10.1128/msystems.00164-23>.
19. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2021. URL: <https://www.R-project.org/> (accessed 01.10.2024).
20. Lopatin A. S., Azizov I. S., Kozlov R. S. Microbiome of the nasal cavity and the paranasal sinuses in health and disease (literature review). Part I // *Russian Rhinology*. 2021;29(1):23–30. (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/ro-rino20212901123>.
21. De Boeck I., Wittouck S., Wuyts S. et al. Comparing the Healthy Nose and Nasopharynx Microbiota Reveals Continuity As Well As Niche-Specificity // *Front Microbiol*. 2017;8:2372. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02372>.
22. Natalini J. G., Singh S., Segal L. N. The dynamic lung microbiome in health and disease // *Nat Rev Microbiol*. 2023;21:222–235. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00821-x>.
23. Li R., Li J., Zhou X. Lung microbiome: new insights into the pathogenesis of respiratory diseases // *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):19. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01722-y>.
24. Türkmen Recen Ö., Gazi H., Bayturan Şen S. et al. SARS-CoV-2 Pandemisinin İlerleyen Dönemlerinde Akut Solunum Yolu Enfeksiyonu ile Başvuran Çocuklarda Viral Patojenlerin Mevsimsel Eğilimleri ve Etkileşimleri [Seasonal Trends and Interactions of Viral Pathogens in Children Presenting with Acute Respiratory Tract Infections in the Advancing Periods of SARS-CoV-2 Pandemic] // *Mikrobiyol Bul*. 2023;57(4):580–596. Turkish. <https://doi.org/10.5578/mb.20239947>.
25. Kostinov M. P., Meshcheriakova A. K., Foshina E. P. et al. Clinical course of acute respiratory infection and the state of microbiocenosis of upper respiratory tract in pregnant women // *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2012; (5):12–6. (In Russ.).
26. Campos M., Cickovski T., Fernandez M. et al. Lower respiratory tract microbiome composition and community interactions in smokers // *Access Microbiol*. 2023;5(3):acmi000497.v3. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000497.v3>.
27. Yoon J. G., Lim S., Hyun H. J. et al. Respiratory microbiome and clinical course of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* pneumonia in critically ill patients // *Medicine (Baltimore)*. 2024;103(31):e38988. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000038988>.
28. Xiao T., Guo Q., Zhou Y. et al. Comparative Respiratory Tract Microbiome Between Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Colonization and Ventilator Associated Pneumonia // *Front Microbiol*. 2022;13:782210. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.782210>.
29. Xie L., Chen L., Li X. et al. Analysis of Lung Microbiome in COVID-19 Patients during Time of Hospitalization // *Pathogens*. 2023;12(7):944. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070944>.
30. Xia X., Chen J., Cheng Y. et al. Comparative analysis of the lung microbiota in patients with respiratory infections, tuberculosis, and lung cancer: A preliminary study // *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12:1024867. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1024867>.
31. Lin W. V., Kruse R. L., Yang K. et al. Diagnosis and management of pulmonary infection due to *Rhodococcus equi* // *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(3):310–315. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.033>.

Информация об авторах

Иванова Анна Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-3495-4393; **Передерий Александр Александрович**, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0002-5961-1856; **Попенко Анна Сергеевна**, кандидат биологических наук, Независимый исследователь (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-8957-1835; **Венев Евгений Валерьевич**, врач-инфекционист, Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-2769-4586; **Фадеев Артем Викторович**, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-3558-3261; **Гусев Денис Александрович**, доктор медицинских наук, профессор, главный врач, Клиническая инфекционная больница им. С. П. Боткина (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-9202-3231; **Даниленко Дарья Михайловна**, кандидат биологических наук, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела этиологии и эпидемиологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0001-6174-0836; **Комиссаров Андрей Борисович**, зав. лабораторией молекулярной вирусологии, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-1733-1255; **Люзнов Дмитрий Анатольевич**, доктор медицинских наук, профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней и эпидемиологии, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, директор, Научно-исследовательский институт гриппа имени А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, Россия), ORCID: 0000-0003-3643-7354.

Information about authors

Ivanova Anna A., Junior Research Fellow of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-3495-4393; **Perederiy Alexander A.**, Laboratory Research Fellow of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0002-5961-1856; **Popenko Anna S.**, Cand. of Sci. (Biol.), Independent Researcher (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-8957-1835; **Venev Evgeniy V.**, Infectious Disease Physician, Botkin Clinical Hospital for Infectious Diseases (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-2769-4586; **Fadeev Artem V.**, Senior Research Fellow of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3558-3261; **Gusev Denis A.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Chief Physician, Botkin Clinical Hospital for Infectious Diseases (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-9202-3231; **Danilenko Daria M.**, Cand. of Sci. (Biol.), Deputy Director for Scientific Work, Head of the Department of Etiology and Epidemiology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0001-6174-0836; **Komissarov Andrey B.**, Head of the Laboratory of Molecular Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-1733-1255; **Lioznov Dmitry A.**, Dr. of Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Infectious Diseases and Epidemiology, Pavlov University (Saint Petersburg, Russia); Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza (Saint Petersburg, Russia), (Saint Petersburg, Russia), ORCID: 0000-0003-3643-7354.