

Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова

*На правах рукописи*

**Почтовый Андрей Андреевич**

**Оценка разнообразия микробиома аэрозоля и поверхностей в  
городской среде**

03.01.03 – Молекулярная биология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Гущин Владимир Алексеевич

Москва – 2022

# ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....  | 5  |
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 7  |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 13 |
| 1.1    Роль микроорганизмов.....  | 13 |
| 1.1.1    Роль микроорганизмов в окружающей среде.....   | 13 |
| 1.1.2    Краткий обзор роли микроорганизмов в поддержании здоровья человека .....   | 14 |
| 1.1.3    Инфекционные болезни человека.....   | 18 |
| 1.2    Изучение микробиологического разнообразия в замкнутых пространствах .....  | 20 |
| 1.2.1    Биоаэрозоль.....   | 21 |
| 1.2.2    Люди как основные источники разнообразия микроорганизмов.....  | 23 |
| 1.2.3    Взаимодействие биоаэрозолей замкнутых и открытых пространств .....   | 24 |
| 1.2.4    Влияние системы кондиционирования и вентилирования на структуру биоаэрозоля.....                                     | 24 |
| 1.2.5    Влияние сантехнических систем .....  | 26 |
| 1.2.6    Изучение разнообразия микроорганизмов в системах общественного транспорта на примере метрополитена.....              | 28 |
| 1.2.7    Изучение разнообразия микроорганизмов в медицинских учреждениях .....  | 30 |
| 1.2.8    Оценка распространения устойчивости к антибактериальным препаратам в городских условиях.....                         | 32 |
| 1.3    Методы сбора образцов для исследования микробиома.....   | 33 |
| 1.3.1    Сбор образцов с твердой поверхности.....   | 34 |
| 1.3.2    Сбор образцов с использованием фильтров .....  | 36 |
| 1.3.3    Пробоотборники на основе импакторов .....  | 38 |
| 1.3.3.1    Импакторы со сбором образцов на агаризованную питательную среду .....  | 38 |
| 1.3.3.2    Импакторы со сбором образцов в жидкость .....  | 38 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....   | 43 |
| 2.1    Изучение микробиологического разнообразия в Московском метрополитене ....  | 43 |
| 2.1.1    Сбор образцов.....   | 43 |
| 2.1.1.1    Сбор аэрозольных образцов с использованием SASS 2300 и виртуального импактора SASS 4000 – метод Cyclone-SASS ..... | 43 |

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.1.1.2  | Сбор аэрозольных образцов с использованием Циклон-Био – метод Cyclone-MERPhI.....                                       | 43 |
| 2.1.1.3  | Сбор аэрозольных образцов на наночастицы – метод Nano .....   | 44 |
| 2.1.1.4  | Смывы с поверхности – метод Swab .....  | 44 |
| 2.1.2    | Микробиологический анализ .....   | 44 |
| 2.1.3    | Определение антибиотикорезистентности методом прямого посева .....  | 45 |
| 2.1.4    | Определение антибиотикорезистентности диско-диффузионным методом.....   | 46 |
| 2.1.5    | Экстракция ДНК, амплификация и секвенирование .....   | 46 |
| 2.1.6    | Определение копийности гена 16S rRNA.....   | 47 |
| 2.1.7    | Анализ данных секвенирования .....  | 48 |
| 2.1.8    | Сравнительный анализ с ранее опубликованными данными по изучению микробиома Московского метрополитена .....             | 48 |
| 2.2      | Анализ микробиологического разнообразия и идентификация РНК SARS-CoV-2 в условиях стационара инфекционной больницы..... | 49 |
| 2.2.1    | Характеристика мест сбора образцов.....   | 49 |
| 2.2.2    | Сбор аэрозольных образцов с использованием SASS 2300/SASS 4000 .....  | 49 |
| 2.2.3    | Смывы с поверхности .....   | 50 |
| 2.2.4    | Транспортировка и предобработка образцов .....  | 50 |
| 2.2.5    | Экстракция нуклеиновых кислот.....  | 50 |
| 2.2.6    | Количественная ПЦР для идентификации бактериальных патогенов.....   | 50 |
| 2.2.7    | Амплификация и секвенирование переменного региона V4 16S rRNA.....  | 51 |
| 2.2.8    | Анализ данных секвенирования .....  | 51 |
| 2.2.9    | Использование материалов пациентов.....   | 52 |
| Глава 3. | РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....  | 53 |
| 3.1      | Состав биоаэрозоля и поверхностей общественных мест: исследование в Московском метрополитене .....                      | 53 |
| 3.1.1    | Сравнительная характеристика способов сбора биоаэрозоля для изучения состава микробиома .....                           | 54 |
| 3.1.1.1  | Сравнительная характеристика методов сбора для анализа состава микробиома .....   | 56 |
| 3.1.1.2  | Исследование разнообразия культивируемого микробиома Московского метрополитена .....                                    | 60 |
| 3.1.1.3  | Выявление микроорганизмов, в составе микробиома метрополитена, обладающих устойчивостью к антимикробным препаратам..... | 65 |

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| 3.1.2                  | Метапрофилирование микроорганизмов с использованием секвенирования<br>вариабельных регионов гена 16S rRNA ..... | 68 |
| 3.1.2.1                | Оценка информативности вариабельных регионов и влияние культивирования на<br>разнообразие .....                 | 68 |
| 3.1.2.2                | Микробиом станций Московского метрополитена .....   | 72 |
| 3.1.2.3                | Оценка разнообразия микробиома Московского метрополитена по данным двух<br>независимых исследований.....        | 76 |
| 3.2                    | Состав биоаэрозоля и поверхностей в условиях стационара .....   | 80 |
| 3.2.1                  | Идентификация РНК SARS-CoV-2 в аэрозоле и на поверхностях в различных<br>отделениях инфекционной больницы.....  | 82 |
| 3.2.2                  | Оценка образования фомитов в непосредственной близости от пациента<br>с COVID-19.....                           | 86 |
| 3.2.3                  | Представленность возбудителей нозокомиальных инфекций бактериальной<br>этиологии в условиях стационара .....    | 87 |
| 3.2.4                  | Разнообразие микробиома в зависимости от отделения и типов поверхностей ....                                    | 89 |
| 3.2.5                  | Поиск индикаторных родов.....   | 92 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....       |   | 95 |
| ВЫВОДЫ.....            |   | 97 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... |   | 98 |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ВБИ – внутрибольничные инфекции (нозокомиальные инфекции)

ВЗК – воспалительные заболевания кишечника

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ГЭ – геномный эквивалент

ГЭ/мл – геномный эквивалент на 1 миллилитр

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты

ИВЛ – аппарат для искусственной вентиляции легких

КОЕ – колониеобразующая единица

МТ – морфологические типы

ОРВИ – острая респираторная вирусная инфекция

ОТ-ПЦР – разновидность ПЦР, с наличием этапа в виде обратной транскрипции (ОТ)

РНК в ДНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

РНК – рибонуклеиновая кислота

ASV (аббр. от англ. amplicon sequence variant) – вариант последовательности ампликонов

BSI (аббр. от англ. bloodstream infections) – инфекция кровотока

CDC (аббр. от англ. Centers for Disease Control and Prevention) – Центр по контролю за заболеваниями

CoNS – коагулазонегативные стафилококки

COVID-19 (аббр. от англ. COronaVirus Disease 2019) – новая коронавирусная инфекция 2019, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2

CRBSI (аббр. от англ. catheter-related bloodstream infections) – инфекция кровотока, связанных с катетером

Ct (аббр. от англ. cycle threshold) – пороговый цикл

ESKAPE – группа патогенов, включающая в себя *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представителей семейства Enterobacteriaceae

HVAC (аббр. от англ. Heating, Ventilation, & Air Conditioning) – Отопление, вентиляция и кондиционирование воздуха

IL – интерлейкин

IEQ (аббр. от англ. Indoor Environmental Quality) – качество внутренней среды

IQR (аббр. от англ. Interquartile range) – межквартильный размах

MDA (аббр. от англ. Mean Decrease in Accuracy) – среднее снижение точности

MERS (аббр. от англ. Middle East respiratory syndrome) – ближневосточный респираторный синдром вызываемое вирусом MERS-CoV

MRSA – метициллин-устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*

NGS (аббр. от англ. next generation sequencing) – технология секвенирования следующего поколения

PBS (аббр. от англ. Phosphate-buffered saline) – натрий-фосфатный буфер

PCoA (аббр. от англ. Principal Coordinates Analysis) – анализ главных координат

SARS-CoV-2 (аббр. от англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) – РНК-вирус, относящийся к роду Betacoronavirus. Вызывает инфекционное заболевание COVID-19

SCFA (аббр. от англ. short-chain fatty acids) – короткоцепочечные жирные кислоты

SNP (аббр. от англ. single nucleotide polymorphism) – однонуклеотидный полиморфизм

# ВВЕДЕНИЕ

## Актуальность проблемы

В последние годы все большее число исследований сосредоточено на изучении биоаэрозоля и его влияния на здоровье человека. В базе данных PubMed количество статей, отвечающих запросу «bioaerosol and human health» за последние 20 лет увеличилось на порядок - с десятка до более, чем сотни публикаций в год. Биоаэрозоль является неотъемлемым компонентом воздуха и представляет собой сложную смесь микроорганизмов (жизнеспособных и нежизнеспособных), а также соединений биологического происхождения, включая аллергены и токсины. При этом, наличие патогенных микроорганизмов в биоаэрозоле рассматривается как один из основных факторов, оказывающих непосредственное влияние на здоровье человека и животных [1,2]. Патогенные микроорганизмы в составе биоаэрозоля являются причиной целого ряда острых и хронических заболеваний, включая тяжелый острый респираторный синдром вызываемый коронавирусами, в т.ч. SARS-CoV-2 [3], корь [4], пневмонии [5], ОРВИ [6], а также профессиональные инфекционные заболевания [7–9].

Стоит отметить, что состав и структура биоаэрозоля изменяются во времени и зависят от факторов окружающей среды [10,11], замкнутости пространства, интенсивности воздухообмена, присутствия животных, растений, а также людей [12]. Процессы жизнедеятельности человека, такие как дыхание, чихание и кашель, способствуют активному выделению микроорганизмов из дыхательных путей человека и со слизистых носа и рта в окружающую среду [1].

Густонаселенные районы с хорошо развитой системой общественного транспорта являются потенциальными очагами быстрого распространения прежде всего респираторных болезней, таких как COVID-19 и атипичная пневмония, а инфраструктура города может служить катализатором быстрой локальной и глобальной передачи инфекции [13]. Риск заражения различными патогенами возрастает в помещениях с плохой или совсем отсутствующей системой вентиляции, а также в помещениях с высокой плотностью людей, таких как офисы, общежития, больничные палаты, метрополитен, аэропорты, вокзалы, где часто происходит передача инфекции от человека к человеку [14]. Кроме того, воздушно-капельная передача бактерий в медицинских учреждениях может вызывать внутрибольничные инфекции [14–16]. Помимо явной угрозы передачи различных патогенных микроорганизмов, окружающая среда все чаще рассматривается как резервуар факторов возникновения антибиотикоустойчивости, и ее роль в распространении генов устойчивости к антибиотикам еще предстоит изучить [17]. В этой связи актуальной научной задачей является изучение микробиома аэрозоля и поверхностей в городской среде, напрямую

контактирующих с человеком с целью выявления рисков для здоровья людей, разработки методов мониторинга биоразнообразия, а также способов управления микробиомом, снижающих воздействие негативных факторов и повышающих экологическую устойчивость симбиотических микробных сообществ.

### Степень разработанности темы

К настоящему времени накоплено достаточно много данных относительно разнообразия микробиома окружающей среды. Появляется информация по информативности различных методов сбора образцов для исследования микробиома в условиях городской среды, в том числе транспортной инфраструктуры, например метрополитена и медицинских учреждений.

Учеными были созданы несколько крупных консорциумов, таких как MetaSUB [18], направленных на изучение микробиологического профиля городов, в том числе систем общественного транспорта. По большей части исследования в рамках работы консорциумов коснулись нескольких крупных городов в Америке, Европе и Азии. Данные о разнообразии микробиома в Москве и Московском метрополитене на текущий момент ограничены единственным исследованием. Так, ранее был изучен микробиом поверхностей на нескольких станциях, при этом, само исследование не включало оценку жизнеспособности микроорганизмов, профиля антибиотикорезистентности, анализа состава культивируемого микробиома [19]. Состав аэрозоля также не изучался.

Проведение мониторинга микробиологического состава аэрозоля и поверхностей имеет важное значение и в условиях медицинского стационара [20–22]. Особое внимание данное направление получило в период пандемии новой коронавирусной инфекции. Идентификация вируса SARS-CoV-2 или микроорганизмов, способных вызвать сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19 (включая *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, CoNS и *Achromobacter* spp.) имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. На основании результатов такого мониторинга определяется перечень необходимых мер по предупреждению распространения различных инфекций, в том числе внутрибольничных (ВБИ), способных вызвать сочетанные инфекции, повышающие смертность в условиях стационаров.

### Цель работы

Целью данной работы является исследование разнообразия микроорганизмов аэрозоля и поверхностей городской среды на примере станций Московского метрополитена и инфекционной больницы.

### Задачи работы

1. Сравнение различных методов сбора образцов биоаэрозоля, поиск наиболее оптимальных с точки зрения количественного и качественного анализа состава микробиома.
2. Исследование разнообразия культивируемого микробиома биоаэрозоля воздуха и поверхностей некоторых станций Московского метрополитена.
3. Выявление микроорганизмов, в составе микробиома Московского метрополитена, обладающих устойчивостью к антимикробным препаратам.
4. Исследование состава некультивируемого микробиома метрополитена в зависимости от времени и места сбора.
5. Исследование композиции биоаэрозоля воздуха и поверхностей в условиях стационара инфекционной больницы в период распространения вируса SARS-CoV-2.
6. Исследование микробиома различных поверхностей инфекционной больницы с целью обнаружения резервуаров нозокомиальных инфекций и патогенных микроорганизмов, потенциально вызывающих сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19.

### Научная новизна

В работе была продемонстрирована эффективность различных методов сбора, среди которых комбинация на основе аэрозольного пробоотборника (Cyclone-SASS) и смывов с поверхности (Swab), позволили комплексно охарактеризовать микробиом и разработать протокол анализа для последующих исследований. Проведенный анализ культивируемого микробиома с использованием питательных сред с широкими трофическими свойствами позволило выделить и охарактеризовать 48 морфотипов. Использование комбинации метапрофилирования 16S rRNA и микробиологического анализа позволили оценить разнообразие в аэрозоле воздуха как с точки зрения представленности различных микроорганизмов, так и по количеству выявляемых резистентных изолятов. Это свидетельствует о значимости исследования аэрозоля в контексте рисков распространения резистентности к антимикробным препаратам. Впервые были определены профили устойчивости бактерий к различным антибактериальным препаратам микроорганизмов выделенных в составе окружающей среды на станциях Московского метрополитена. Был показан вклад переменных регионов гена 16S rRNA в бактериальное разнообразие при метапрофилировании. Проведенный сравнительный анализ доступных исследований микробиомов Московского метрополитена продемонстрировал наличие «корового» ядра, преимущественно состоящие из различных комменсальных видов, а также почвенных и водных микроорганизмов. В работе была продемонстрирована возможность использования

разработанного протокола для молекулярной эпидемиологии для идентификации РНК SARS-CoV-2 и характеристики состава микробиома аэрозоля и поверхностей в COVID-стационаре.

### Научная и практическая значимость

Полученные результаты представляют научный и практический интерес, и могут быть применены в исследовательской практике в области молекулярной биологии, микробиологии, вирусологии и эпидемиологии. Так, по результатам анализа проведенного в метрополитене была произведена оценка распространения различных микроорганизмов и определена резистентность к антибиотикам, в том числе к клинически-значимым. В условиях стационара инфекционной больницы были выработаны практические рекомендации для предотвращения внутрибольничного распространения новой коронавирусной инфекции и микроорганизмов, способных вызывать сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19.

Разработанный подход также возможно использовать для микробиологического мониторинга в любых социально-значимых общественных местах, также и в животноводческих, тепличных комплексах для своевременного выявления биологических рисков.

### Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, планировании и проведении экспериментов, анализа полученных результатов, подготовке материалов к печати публикаций и написании диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии. Имена всех соавторов указаны в опубликованных работах или отражены в тексте диссертации. Сбор образцов в метрополитене г. Москвы был выполнен совместно с к.б.н. Б.И. Вердиевым, к.б.н. А.Г. Южаковым, к.ф.-м.н. Г.Е. Катковским и А.Э. Акмаловым. Микробиологический анализ был выполнен совместно с к.б.н. Р.С. Овчинниковым. Типирование микроорганизмов с использованием системы MALDI-TOF было выполнено в лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (руководитель лаборатории к.м.н В.Г. Жуховицкий). Исследование в COVID-стационаре на базе Первой инфекционной больницы г. Москвы было выполнено в сотрудничестве с проф. Л.В. Колобухиной и проф. О.А. Бургасовой. Сбор образцов был выполнен совместно с В.В. Бакалин. ПЦР анализ для идентификации РНК SARS-CoV-2 и ДНК патогенных бактерий был проведен совместно с к.б.н. Н.А. Кузнецовой и Е.В. Дивисенко.

## Методология и методы исследования

Данное исследование было выполнено с использованием современных методов молекулярной биологии, микробиологии, вирусологии и биоинформатики.

Сбор образцов аэрозоля воздуха в Московском метрополитене был выполнен с помощью высокопроизводительных пробоотборников, а также методом сбора на нанофильтры. Сбор образцов с поверхности был выполнен с использованием вискозных свабов. Часть данных методов (высокопроизводительный аэрозольный пробоотборник и смывы с поверхности) были использованы для сбора образцов в инфекционной больнице. Для анализа культивируемого микробиома использовались классические методы микробиологии с посевом на различные питательные среды. Анализ антибиотикоустойчивости был проведен методом прямого посева образцов на среду содержащий определенный антибиотик. Определение антибиотикоустойчивости выделенных изолятов проводили диско-диффузионным методом. Таксономическая идентификация изолятов была проведена с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии. ПЦР в реальном времени было проведено для определения копийности гена 16S rRNA, а также для идентификации РНК SARS-CoV-2 и нозокомиальных инфекций бактериальной этиологии. Анализ некультивируемого микробиома проводился секвенированием семи вариабельных регионов гена 16S rRNA (V2, V3, V4, V6-V7, V8, V9) в исследовании Московского метрополитена и вариабельного региона V4 гена 16S rRNA в исследовании микробиома инфекционной больницы. Анализ данных секвенирования был выполнен с использованием различных биоинформатических программ. Визуализация полученных результатов была выполнена с использованием различных пакетов в среде R.

## Положения, выносимые на защиту

1. Различные системы сбора аэрозоля позволяют собирать схожий, но не идентичный по своему составу микробиом.
2. Разнообразие культивируемого микробиома и профиль антибиотикоустойчивых микроорганизмов неоднородны и зависят от станции метрополитена.
3. Видовое разнообразие некультивируемого микробиома зависит от станции, типа образца и времени его сбора. При этом, можно определить спектр общих и характерных для каждой станции микроорганизмов.
4. В условиях метрополитена видовое разнообразие аэрозоля более полно описывает состав микроорганизмов по сравнению с методом, основанным на смывах с поверхностей.

5. Аэрозоль и различные поверхности в COVID-стационаре могут содержать РНК SARS-CoV-2.
6. Анализ разнообразия микробиома позволяет определить потенциальные источники-резервуары бактериальных инфекций в условиях стационара инфекционной больницы.

### Степень достоверности и апробация результатов

Результаты были получены с использованием современных методов и технологий молекулярной биологии, микробиологии, вирусологии и биоинформатики. По теме диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология, и 1 патент РФ на изобретение.

Результаты диссертационной работы были представлены на XXVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 12-23 апреля 2021 г.); V Международная конференция “ПОСТГЕНОМ’2018” (Казань, 29 октября - 2 ноября 2018 г.); Международный Форум "Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни" (BIOTECH WORLD 2018, Москва, 23-25 мая 2018 г.).

# Глава 1. Обзор литературы

## 1.1 Роль микроорганизмов

### 1.1.1 Роль микроорганизмов в окружающей среде

Микроорганизмы являются неотъемлемой частью биосферы и встречаются повсеместно: в почве, воде, воздухе, а также на всех покровах и во всех полостях животных и растений. За долгую эволюцию микроорганизмы приспособились к выживанию в различных экологических нишах, от глубин океанов и морей до горных вершин, от засушливых пустынь до льдов Арктики. Широкое распространение микроорганизмов, в частности, бактерий, объясняется их уникальной способностью адаптироваться к условиям окружающей среды и участвовать в многочисленных биогеохимических циклах превращения веществ и энергии, разложении органических веществ, процессах очистки воды, формировании состава атмосферы.

Основным путем в цикле углерода является фотосинтез, в процессе которого углерод в виде неорганического соединения из атмосферы поглощается и «усваивается» растениями, а также фото- и хемоавтотрофными микроорганизмами, с целью дальнейшего превращения в органические вещества, являющиеся источником энергии для всех живых организмов. Обратный путь, переход органических веществ в неорганическую форму, напрямую связан с деятельностью микроорганизмов, осуществляющих процесс минерализации.

Микроорганизмы являются единственными, кто способен непосредственно использовать молекулярный азот воздуха и превращать его в доступные для высших организмов формы, данный процесс называется азотфиксацией и осуществляется представителями нескольких видов бактерий: *Cyanobacteria*, встречающимися в большинстве водных экосистем и играющими основную роль в фиксации азота [23,24], свободноживущими бактериями рода *Azotobacter* [25,26], а также бактериями рода *Rhizobium* [27,28], являющимися симбионтами клубеньковых растений. Обратный путь превращения азотистых соединений до свободного азота также осуществляется бактериями. Сначала бактерии-аммонификаторы расщепляют белки до аммиака и аммонийных солей, затем нитрифицирующие бактерии превращают аммонийные соли в соли азотной кислоты с последующим полным восстановлением молекулярного азота с помощью бактерий-денитрофикаторов.

Другим химическим элементом, который также входит в состав белков, является сера, поэтому еще одним продуктом их распада могут являться различные неорганические соединения серы. Микроорганизмы родов *Thiobacillus* [29], *Sulfolobus* [30] и *Thiospira* [31] участвуют в восстановительных и окислительных реакциях превращения серы.

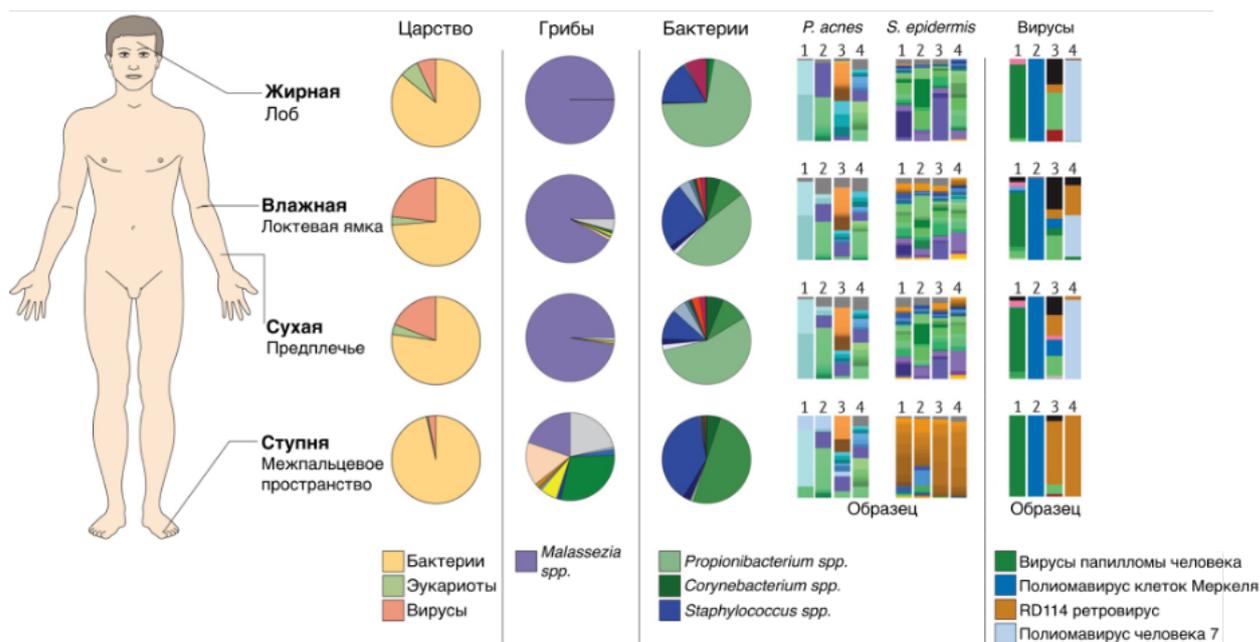
Среди рассмотренных химических элементов фосфор в живых организмах представлен в виде свободных фосфатных ионов и в составе различных соединений. Как правило, в природе фосфаты представлены в виде различных плохо растворимых соединений и доступность фосфатов для растений напрямую зависит от деятельности микроорганизмов. Бактерии, участвующие в разложении остатков растений и животных, используют ионы фосфатов для дальнейшего синтеза фосфорорганических соединений [32]. Также бактерии способны растворять фосфат кальция за счет синтеза и выделения органических и неорганических кислот в окружающую среду, благодаря чему получают усвояемые для растений соединения фосфора [33].

Сообщества микроорганизмов делают доступными все необходимые элементы, включая кислород, углерод, азот, фосфор и серу для других форм жизни на нашей планете. Микроорганизмы распространены повсеместно, как в окружающей среде, так и внутри организма человека. При этом, состав микробиома определяет физическое состояние организма хозяина, а его изменение способно влиять на метаболические процессы, иммунный статус, и физиологические процессы организма.

### **1.1.2 Краткий обзор роли микроорганизмов в поддержании здоровья человека**

Организм каждого человека представляет собой сложную совокупность микроорганизмов, обитающих на различных частях тела [34]. Данное разнообразие микроорганизмов составляет динамическую, вспомогательную функциональную систему, которая синхронно развивается с физиологическим развитием человека и состоит из сообществ различных микроорганизмов, включая эукариоты, археи, бактерии и вирусы [35]. Микробиота человека состоит из 10-100 триллионов симбиотических микробных клеток, существенная часть которых находится в толстом кишечнике [36].

Кожа представляет собой самый большой и наиболее незащищенный орган тела, который постоянно находится в контакте с различными поверхностями и внешней средой [37,38]. Не смотря на постоянные контакты, состав микробиома кожи остается на удивление стабильным с течением времени [39,40]. Однако, разнообразие и относительное обилие микробных сообществ в организме варьируют как в зависимости от человека, так и в зависимости от участков кожи, которые подразделяются на четыре основные микросреды: жирная, влажная, сухая и кожа стоп (Рисунок 1; [41]).



Nature Reviews | Microbiology

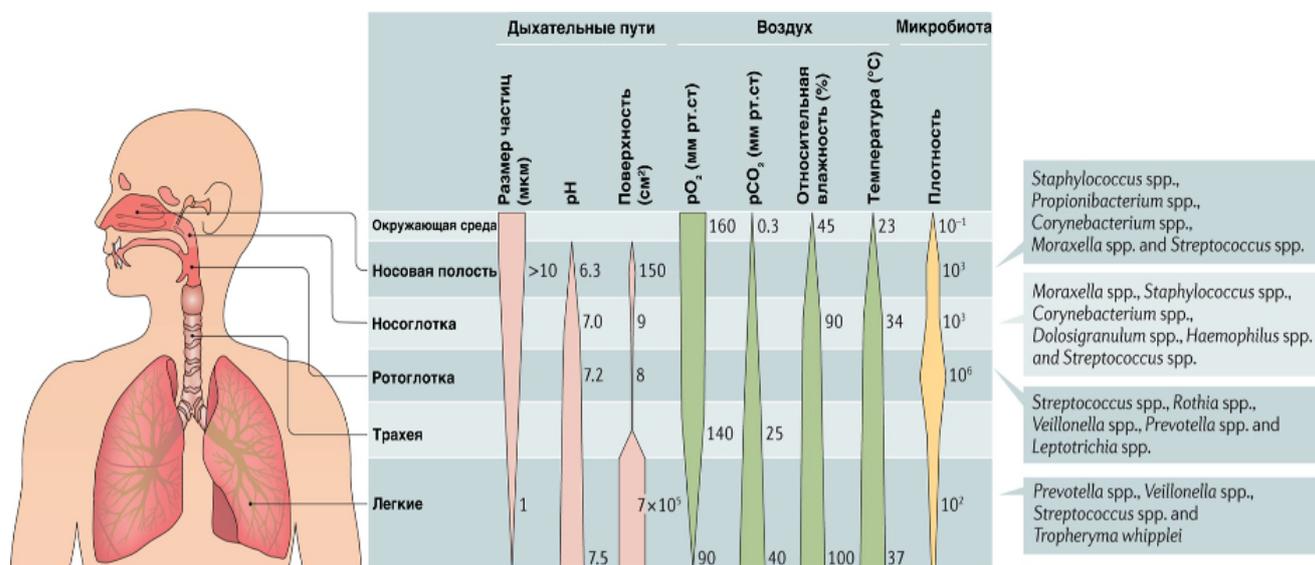
Рисунок 1 – Представленность различных микроорганизмов и вирусов четырех различных участков: лоб (жирная), локтевая ямка (влажная), предплечье (сухая) и межпальцевое пространство (ступня). Круговые диаграммы представляют относительный состав различных царств, грибов и бактерий у здоровых взрослых людей. Бактериальные виды *Propionibacterium acnes* и *Staphylococcus epidermidis*, а также эукариотические ДНК-вирусы отображаются в виде гистограмм для четырех репрезентативных образцов. Различия в представленности *P. acnes*, *S. epidermidis* и вирусов между образцами указывает на индивидуальное формирование микробиома у каждого человека. Адаптировано из [41].

В сальных участках, таких как лицо, туловище и руки, преобладают виды *Cutibacterium* (ранее *Propionibacterium*) [42] и роды *Staphylococcus*, тогда как во влажных областях, таких как локтевые и коленные складки, наиболее представлены виды *Corynebacterium* и *Staphylococcus* [41]. Грибы рода *Malassezia* встречаются по всему телу [41], но преобладают на жирных участках, таких как лицо и спина [43,44]. Наибольшее разнообразие грибов было отмечено для поверхности стоп и характеризовалось комбинацией *Malassezia* spp., *Aspergillus* spp., *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Epicoccum* spp. *Candida* spp. и *Aspergillus* spp. [41,45].

Микробиом кожи формируется не только за счет внешнего взаимодействия со средой, но и под влиянием взаимодействий внутри микробного сообщества. Например, было выявлено множество взаимодействий между различными микроорганизмами-комменсалами. Известно, что коагулазонегативные стафилококки (CoNS), в частности, *Staphylococcus lugdunensis*, препятствуют колонизации *S. aureus* за счет выработки антибиотика лугдунина, циклического пептида, содержащего тиазолидин [46]. *Staphylococcus epidermidis* могут ингибировать образование биопленок *S. aureus* благодаря синтезу сериновой протеазы глутамилэндопептидазы (Esp) [46]. В своей работе Nakatsuji и соавторы [47] показали действие

лантибиотиков, синтезируемых различными штаммами коагулазонегативных *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis* и *S. hominis*, которые способны взаимодействовать с человеческим антимикробным пептидом кателицидином LL-37, и ингибировать рост *S. aureus* [46,47]. Примечательно, что изоляты CoNS, продуцирующие эти лантибиотики, были менее представлены у лиц с atopическим дерматитом (экземой), кожа которых часто колонизирована *S. aureus*.

Дыхательные пути представляют собой сложную систему органов, которая делится на верхние дыхательные пути (ВДП) и нижние дыхательные пути (НДП) [48]. Основной функцией дыхательных путей является обмен кислорода и углекислого газа. Для обеспечения данной функции дыхательные пути взрослого человека имеют площадь поверхности порядка 70 м<sup>2</sup>, что в 40 раз больше площади поверхности кожи [49]. Вся эта поверхность населена специфическими бактериальными сообществами, с наивысшей плотностью бактерий, наблюдаемой в ВДП (Рисунок 2).



Nature Reviews | Microbiology

Рисунок 2 – Физиологические и микробиологические градиенты дыхательной системы человека. Кислотность среды (pH) постепенно увеличивается по мере продвижения к НДП, также как происходит повышение относительной влажности и температуры. Парциальные давления кислорода (pO<sub>2</sub>) и углекислого газа (pCO<sub>2</sub>) имеют противоположные градиенты, которые определяются условиями окружающего воздуха и газообменом на поверхности легких. Вдыхание приводит к попаданию частиц из окружающей среды в дыхательные пути; вдыхаемые частицы диаметром более 10 мкм оседают в верхних дыхательных путях, тогда как частицы диаметром менее 1 мкм могут достигать легких. Эти физиологические параметры определяют специфические для ниши условия селективного роста микроорганизмов, которые в конечном итоге формируют микробные сообщества вдоль дыхательных путей. Единица измерения плотности бактерий варьируется в зависимости от ниши; плотность в окружающей среде измеряется как количество бактерий на см<sup>3</sup> внутреннего воздуха. Адаптировано из [48].

За последние годы накопились достаточное количество данных подтверждающих роль бактериальных сообществ в ВДП в предотвращении возникновения инфекции респираторными патогенами и дальнейшего распространения в НДП. Для большинства респираторных патогенов колонизация ВДП является необходимым первым шагом перед тем, как вызвать инфекцию верхних, нижних дыхательных путей [50]. Предотвращение этапа колонизации патогенных микроорганизмов микробиотой дыхательных путей имеет первостепенное значение для сохранения «здоровья» органов дыхания. В дополнение к этим симбиотическим отношениям, респираторная микробиота играет роль в структурном созревании дыхательных путей и в формировании местного иммунитета [48,51,52].

Наиболее богатым по количеству различных микроорганизмов является микробиом желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Разнообразие микробиома желудочно-кишечного тракта преимущественно состоит из бактерий трех основных типов бактерий: *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* и *Firmicutes* [53]. Известно, что сложное микробное сообщество ЖКТ активно участвует в формировании и поддержании функциональных свойств системы пищеварения, иммунной защиты организма и обеспечении прочих процессов. При этом, изученное разнообразие содержит в 50–100 раз больше генов по сравнению с геномом человека [54]. Эти дополнительные гены включают, в том числе, различные типы ферментов, которые не кодируются геномом хозяина и играют решающую роль в обеспечении его метаболизма, способствуя, тем самым, регуляции физиологии хозяина [54,55].

Наиболее насыщенным с точки зрения микробного разнообразия является микробиом толстой кишки. За счет продукции органических (молочной и уксусной) кислот, а также различных антибиотиков, полезная микрофлора способна подавлять рост гнилостных бактерий и является их антагонистом. Известна ее роль в водно-солевом обмене, регуляции газового состава кишечника, обмене белков, углеводов, жирных кислот, холестерина и нуклеиновых кислот, а также продукции биологически активных соединений – антибиотиков и витаминов. В процессе «работы» микробиоты кишечника конечным продуктом ферментированных реакций являются короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК или SCFA, short-chain fatty acids). КЦЖК действуют как один из энергетических субстратов для организма-хозяина и удовлетворяют 10% от потребности в дневной энергии для использования в различных метаболических процессах [56,57].

Микробиота кишечника, как было уже отмечено, продуцирует различные витамины, например, витамин К. Так, микроорганизмы *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium lentum*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia marcescens* и *Enterococcus faecium* [58], анаэробно синтезируют витамин К<sub>2</sub> (менахинон), который необходим для повышения концентрации липопротеидов высокой плотности и снижения уровня холестерина, что способствует

снижению риска сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз и ишемическая болезнь сердца [59]. Микробиота кишечника также служит важным источником витаминов группы В (В5 и В12) [60].

Стоит отметить важность микробиоты женского репродуктивного тракта, которая играет важную роль в процессе гаметогенеза и в дальнейшем на протяжении всей беременности, в профилактике множества заболеваний, включая бактериальный вагиноз, грибковые инфекции, заболевания, передающиеся половым путем и инфекции мочевыводящих путей. Бактерии *Lactobacillus spp.*, продуцирующие молочную кислоту во влагалище, выполняют ключевую защитную функцию за счет снижения рН и производства различных бактериостатических и бактерицидных соединений. Нормальный микробиом влагалища представлен одним или двумя доминирующими видами лактобацилл из трех или четырех, в основном *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* и *L. gasseri* [61].

Несмотря на целый ряд положительных и защитных функций микроорганизмов для организма человека, любой их дисбаланс может привести к разного рода последствиям, в том числе, развитию серьезных заболеваний. Так же не стоит забывать о микроорганизмах, которые являются прямыми возбудителями данных заболеваний.

### **1.1.3 Инфекционные болезни человека**

Приведенная в предыдущих разделах информация о роли микроорганизмов подчеркивает важность их симбиоза с организмом хозяина и характеризует их как неотъемлемый компонент организма человека. Изменение состава микробиома под влиянием таких факторов как стресс, неправильное питание, неблагоприятные факторы окружающей среды, бесконтрольное применение антимикробных препаратов, специфические виды лечения (например, лучевая и химиотерапия) может привести к дисбалансу в структуре микробиома, что отразится на устоявшемся соотношении комменсальных и патогенных видов микроорганизмов – бактерий, вирусов, грибов. Многие исследования предполагают возможную прямую связь между нарушением состава микробиома и воспалительными/метаболическими заболеваниями, такими как воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), колит и болезнь Крона, ожирение и рак. Индукция некоторых ВЗК была связана с уменьшением количества бактерий типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes* и увеличением числа *Proteobacteria* [62]. Другим примером этиологического фактора патологического процесса может служить бактерия *Helicobacter pylori*, которая провоцирует развитие гастрита и язвенной болезни желудка, что в дальнейшем может стать причиной карциномы желудка [63].

В качестве другого, не менее важного источника новых инфекционных заболеваний следует отметить различные природные резервуары, т.н. природные очаги инфекционных заболеваний. В последние несколько десятилетий наблюдалось неоднократное проникновение в популяцию людей новых патогенов: в т.ч. ВИЧ, гриппа, коронавирусов SARS-CoV, MERS и SARS-CoV-2 [13]. Среди основных факторов, способствующих распространению инфекционных заболеваний, особое внимание уделяется изменению климата и урбанизации, в результате которых традиционно дистанцированное взаимодействие сред обитания человека и диких животных становится все более тесным. Изменение климата расширяет ареал обитания и плотность видов-переносчиков и природных хозяев, что увеличивает риск появления зоонозов [13]. В качестве примеров могут служить зоонозы, являющиеся причиной этиологических вспышек, эпидемий и пандемий: вирус Эбола, вирус гриппа А (H1N1)pdm09, коронавирусов (MERS-CoV, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2), вируса Западного Нила, распространения эндемичных патогенов, таких как *Salmonella* spp., *Leptospira* spp., *Trypanosoma* spp., *Mycobacterium* spp, и других [64].

Изменения климата способствовали интродукции и распространению на северном побережье Черного моря тропических видов комаров *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* и *Aedes koreicus* [65,66]. Комары *A. aegypti* и *A. albopictus* являются основными переносчиками таких опасных инфекций как лихорадка Денге, желтая лихорадка, лихорадка Чикунгунья и др [67–69]. Комары *A. koreicus*, родиной которых является Восточная Азия, известны как переносчики вируса Японского энцефалита [70]. Несмотря на то, что на территории России вспышек тропических инфекций до настоящего момента не регистрировалось, присутствие инвазивных видов *A. aegypti*, *A. albopictus*, и *A. koreicus* создает постоянную угрозу заноса тропических лихорадок и возникновения антропонозных вспышек.

Увеличение населения Мира и увеличивающиеся темпы урбанизации в странах с низким и средним уровнем дохода также создают возможности для быстрой передачи инфекционных заболеваний (Рисунок 3).

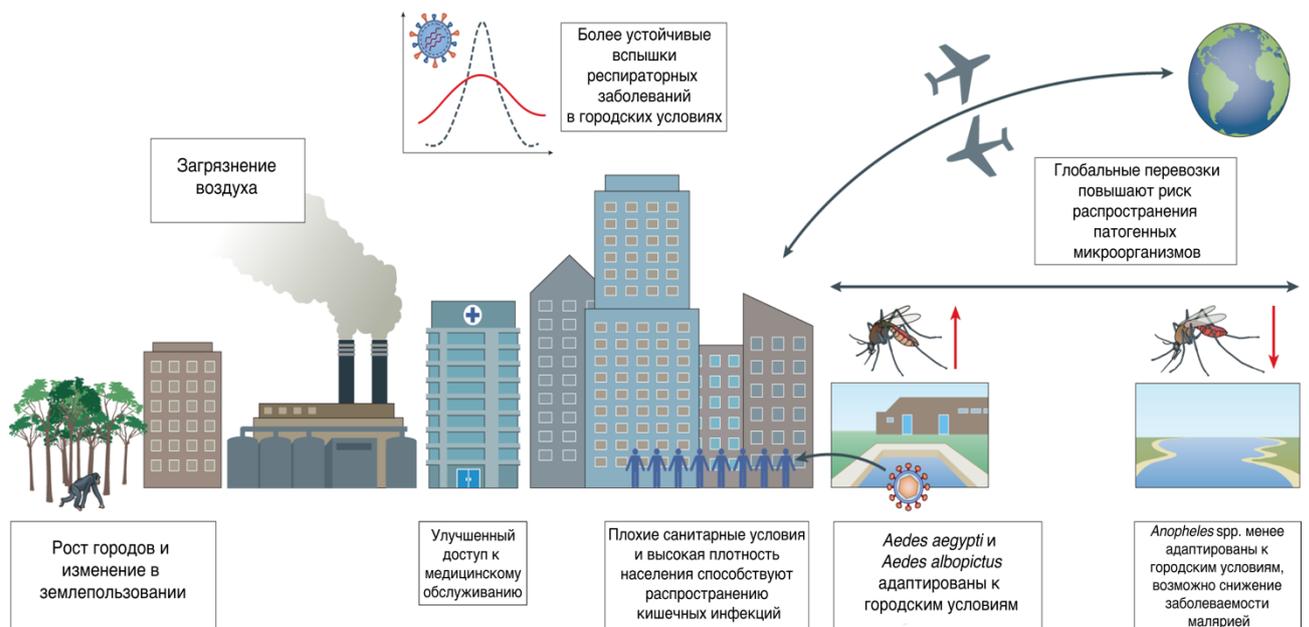


Рисунок 3 – Взаимосвязь между урбанизацией и инфекционными заболеваниями носит сложный характер, при этом растущая урбанизация вызывает как положительные, так и отрицательные изменения глобального бремени болезней. Адаптировано из [13].

Густонаселенные районы с хорошо развитой системой общественного транспорта являются потенциальными очагами для быстрого распространения прежде всего респираторных болезней, таких как COVID-19 и атипичная пневмония, а города могут служить катализатором быстрой локальной и глобальной передачи [13]. Риск заражения различными патогенами возрастает в помещениях с плохой или совсем отсутствующей системой вентиляции, а также в помещениях с высокой плотностью людей, таких как метрополитен, аэропорты, вокзалы, офисы, общежития, медицинские учреждения, где часто происходит передача инфекции от человека к человеку [14]. Более того, в условиях медицинских учреждений, воздушно-капельная передача может быть причиной возникновения внутрибольничных инфекций [14–16]. Поэтому изучение микробиологического состава и выявление патогенных микроорганизмов, присутствующих в помещении, имеет решающее значение для здоровья человека [71–73].

## 1.2 Изучение микробиологического разнообразия в замкнутых пространствах

подавляющая часть населения городов большую часть времени проводит в закрытых помещениях. Воздух в помещении состоит из множества твердых аэрозольных частиц, в том числе вдыхаемых биоаэрозолей, которые в последнее время находятся в центре внимания научных исследований из-за их воздействия на здоровье людей [71]. Ассоциированные с человеком микроорганизмы, наружный воздух, животные, сантехнические устройства вносят значительный вклад в разнообразие микробиома в помещении. Способность

микроорганизмов, в том числе болезнетворных, к быстрому распространению в замкнутом пространстве является стимулом для проведения различных исследований по изучению особенностей микробиома в замкнутых помещениях, в том числе, созданию проекта *Microbiomes of the Built Environment*, который был инициирован Национальной академией наук, инженерии и медицины США (The U.S. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, NAS) [74]. Главной задачей проекта является исследование разнообразия и поиск возможности предотвращения негативного влияния микроорганизмов на здоровье человека, которое решается ответом на вопросы о составе микроорганизмов, их свойств, понимании путей формирования микробиома помещений и освоении способов управления составом (системы вентиляции, температура, влажность, освещение, тип строительных материалов, обработка различными дезинфицирующими средствами). В данном разделе будут подробно рассмотрены основные источники разнообразия микробиома в условиях замкнутых помещений.

### **1.2.1 Биоаэрозоль**

Биоаэрозоль является неотъемлемым компонентом воздуха и представляет собой сложную смесь микроорганизмов (жизнеспособных и нежизнеспособных), а также соединений биологического происхождения, включая аллергены и токсины. Находясь в воздухе, они могут взаимодействовать с каплями воды или пыли, создавая биоаэрозоли, которые могут оставаться в воздухе в течение длительного периода времени.

Размер капель, образующихся во время различных видов деятельности человека, таких как дыхание, разговор, пение, кашель и чихание, является важным фактором при формировании биоаэрозоля. При данных физиологических процессах формируются два типа частиц (Рисунок 4). Первый тип составляют капли (англ. droplets) размером от 5 до 20 мкм, которые имеют тенденцию к быстрому оседанию на землю (обычно в пределах 1-2 м от источника, выделяющего капли), именно они преимущественно являются источником формирования фомитов. Второй тип частиц имеет размер менее 5 мкм. Они, как правило, формируют аэрозоль и обладают способностью оставаться во взвешенном состоянии в течение длительного периода времени, распространяясь на гораздо большие расстояния по сравнению с первым типом частиц. При этом, размер респираторных капель оказывает влияние на то, где именно в дыхательных путях они могут оседать [75–79], что в конечном счете скажется на тяжести заболевания.

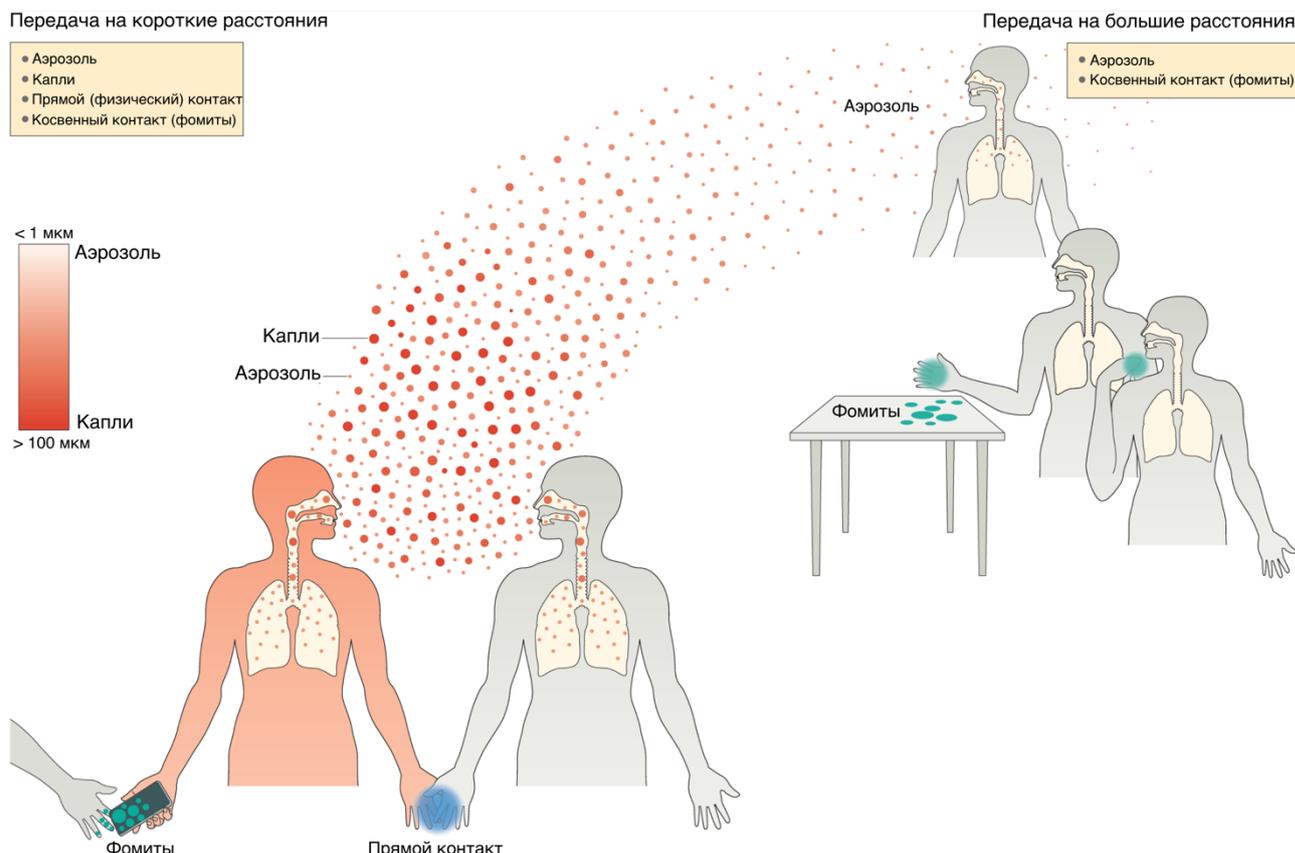


Рисунок 4 – Во время острой респираторной вирусной инфекции инфицированный человек (выделен красным цветом) может выделять вирус с выдыхаемыми каплями и аэрозолями, а также может контаминировать различные поверхности в непосредственной от себя близости (например, кожу, одежду, окружающие предметы и поверхности). Если восприимчивый человек (выделен серым цветом) находится рядом с инфицированным человеком, может произойти передача инфекции на короткие расстояния, за счет вдыхания содержащих патоген каплей/аэрозоля, или при физическом контакте с контаминированными поверхностями различных предметов (фомитов). Если зараженный человек находится на расстоянии, то передача на большие расстояния может происходить при вдыхании восприимчивым человеком зараженных вирусом аэрозолей, выделяемых возбудителем, или при физическом контакте с фомитами. Адаптировано из [80].

Жизнеспособность переносимых по воздуху микроорганизмов, содержащихся в биоаэрозоле, во многом определяется абиотическими факторами окружающей среды, такими как солнечное излучение, температура, относительная влажность воздуха, а также обуславливается морфологическими особенностями микроорганизмов, в частности, возможностью образовывать эндоспоры и продуцировать пигменты [81]. Стоит отметить, что состав и структура биоаэрозоля являются динамичной системой и зависят от факторов окружающей среды [10,11], замкнутости пространства и показателей интенсивности воздухообмена, наличия животных, растений и человека [12].

Интерес к изучению биоаэрозоля продолжает расти из-за растущего понимания его связи с широким спектром неблагоприятных последствий для здоровья людей и животных, а

также в связи с рисками разработки и применения биологического оружия. Например, в медицинских учреждениях анализ биоаэрозоля необходим для проведения оценки качества воздуха и предотвращения вспышек внутрибольничных инфекций. Наибольший интерес для проведения анализа биоаэрозоля представляют места массового скопления людей, такие как аэропорты, вокзалы и метрополитен. Данный интерес обуславливается рядом обстоятельств. Во-первых, это связано с высокими рисками быстрого распространения инфекционных болезней. Во-вторых, места массового скопления людей являются объектами для биотерроризма.

Если мониторинг эпидемической обстановки подобных объектов на разных уровнях проводится достаточно давно, то активный мониторинг с целью предотвращения биотерроризма начался после 2003 года, после рассылки писем содержащие споры сибирской язвы [82]. Маловероятно, что подобный способ инфицирования способен поразить других людей, помимо тех, кто подвергся прямому воздействию патогена, однако, в случае респираторных патогенов последствия могут быть более серьезными. В целом, любой инфекционный агент, будь то объект природного происхождения или же используемые в качестве биологического оружия микроорганизмы, в местах массового скопления людей приводит к быстрому распространению, вызывая человеческие и экономические потери.

### **1.2.2 Люди как основные источники разнообразия микроорганизмов**

Основной вклад в разнообразии микроорганизмов окружающей среды в замкнутых помещениях безусловно вносят люди. В ряде исследований была отмечена схожесть структуры сообществ в воздухе внутри помещений со структурой сообществ наружного воздуха, однако, на долю бактерий, связанных с человеком, в помещениях приходилось более чем в два раза больше микроорганизмов. Это обусловлено колоссальным содержанием микроорганизмов на коже ( $\sim 10^{12}$ ) [83–85], в пищеварительном тракте ( $\sim 10^{14}$ ) [84,85], дыхательной системе. При этом, следует учитывать эмиссию биоаэрозолей, в частности, при дыхании, которое составляет примерно  $10^6$  частиц в час [86,87]. Дыхание и отшелушивание миллионов клеток кожи ежедневно способствуют образованию биоаэрозолей в закрытой среде. В своей работе Qian с коллегами определил эмиссию одним человеком около  $37 \times 10^6$  бактериальных и  $7,3 \times 10^6$  грибных копий генома в час [88]. В другом исследовании порядка 20% бактериальных таксонов были тесно связаны с микробиомом кожи. В основном это виды *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp. и *Streptococcaceae* [89].

Как было сказано выше, выдыхаемые частицы также содержат высокое количество различных микроорганизмов характерных для микробиома верхних дыхательных путей, например, семейств *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Veillonellaceae*, *Prevotellaceae* и *Corynebacteriaceae* [48,90,91]. Было также отмечено, что сообщества

микроорганизмов в помещениях содержат больше уникальных таксонов, по сравнению с наружным воздухом, в том числе микроорганизмы, которые являются возбудителями различных заболеваний млекопитающих, что указывает на важность принятия соответствующих противоэпидемических мер [72]. Во время естественных физиологических процессов (дыхание, кашель, разговор) возможно аэрозольная передача многих вирусов и бактерий, например, вируса гриппа А и В, риновируса человека [92,93], респираторно-синцитиального вируса [80], SARS-CoV-2 [94], вируса кори [80], *Mycobacterium tuberculosis* [95,96], *Pseudomonas aeruginosa* [97]. При этом для ряда микроорганизмов была также показана возможность передачи через заражённые поверхности (фомиты). Это свойственно для сезонных коронавирусов (HCoV), SARS-CoV-2, респираторно-синцитиального вируса.

### **1.2.3 Взаимодействие биоаэрозолей замкнутых и открытых пространств**

Общеизвестно, что твердые частицы могут проникать внутрь помещения с наружным воздухом [98]. В обзоре Nazaroff и соавторы предположили, что эффективность проникновения биоаэрозолей близка к 100% в здании с естественной вентиляцией [85]. Это означает, что все биоаэрозоли, проникающие через вентиляцию и другие возможные отверстия, попадают из окружающей среды внутрь здания. В другом исследовании было показано, что концентрация бактерий и вирусоподобных частиц была примерно в два раза выше в наружном воздухе, чем в воздухе внутри помещений. Таким образом, присутствие человека может быть не единственным фактором в формировании микробной структуры воздуха в искусственной среде [99]. В целом, микробные сообщества, наблюдаемые в воздухе помещений, тесно связаны с сообществами в наружном воздухе, а изменения в микробных сообществах в наружном воздухе отражаются изменениями в воздушной среде помещения. В связи с этим наружный воздух может оказывать не менее сильное влияние на структуру микробных сообществ, чем пребывание человека в хорошо вентилируемых помещениях.

### **1.2.4 Влияние системы кондиционирования и вентилирования на структуру биоаэрозоля**

Системы кондиционирования обычно обеспечивают смесь наружного воздуха и рециркуляцию воздуха в помещении через приточные вентиляционные отверстия, при этом сами системы могут быть источником переносимых по воздуху микроорганизмов из-за загрязнения воздуха в источниках потребляемых системами кондиционирования.

Интересное эпидемиологическое исследование было проведено Milton, который вместе со своими коллегами собрал и проанализировал данные об отпусках по причинам болезни для 3720 сотрудников корпорации Polaroid, работающих в 40 различных зданиях в 115 независимо вентилируемых рабочих зонах в корпоративных офисах [100]. При анализе были использованы записи о характеристиках зданий и данные о жалобах на качество воздуха в

помещениях. Авторы оценили приток наружного воздуха как умеренный (примерно 25 кубических футов/минуту на человека, что соответствует 0,708 м<sup>3</sup>/минуту) или как высокий (примерно 50 кубических футов/минуту на человека, что соответствует 1,416 м<sup>3</sup>/минуту). Кроме оценки притока наружного воздуха были измерены концентрации углекислого газа (CO<sub>2</sub>) в различных рабочих зонах. Полученные данные использовали для регрессионного анализа вместе с данными по отпускам по причине болезни с учетом возраста, пола, трудового стажа, смены, этнической принадлежности, скученности и выполняемой работы (офисный, технический или производственный работник). В результате анализа полученных данных удалось обнаружить связь между увеличением количества отпусков по болезни с более низким уровнем подачи наружного воздуха и жалобами на качество внутренней среды (Indoor Environmental Quality, IEQ). По оценкам авторов, используемые значения подачи наружного воздуха могут быть связаны со значительной заболеваемостью сотрудников и экономические потери только в США могут достигать не менее 22,8 млрд долларов США в год [100].

В другой работе, Muatt с коллегами изучали распространение по воздуху риновируса и его связь с подачей наружного воздуха в трех офисных зданиях в пригороде Бостона, штат Массачусетс, США. Все три офисных здания имели механическую вентиляцию без увлажнения [101]. Авторы идентифицировали риновирус в 32% собранных образцах воздуха. Учитывая информацию о концентрациях CO<sub>2</sub>, удалось обнаружить значительную положительную связь между частотой обнаружения вируса в воздухе и степенью вентиляции здания наружным воздухом, при этом средняя концентрация CO<sub>2</sub> была выше фона более, чем на 100 ppm (parts per million, частей на миллион/миллионная доля). Полученные данные свидетельствуют о том, что более низкая скорость вентиляции и, как следствие, повышенная концентрация CO<sub>2</sub>, связаны с повышенным риском негативного воздействия на здоровье человека. В дополнение к демонстрации повышенного риска заражения при сниженной вентиляции авторы продемонстрировали обнаружение идентичной последовательности риновируса в образце из полости носа и в образце воздуха, взятом в том же здании во время болезни человека. Это свидетельствует о контаминации воздуха и окружающих поверхностей этим же человеком, либо другим человеком, который был частью той же цепочки передачи инфекции.

В целом, в системах вентилирования следует идентифицировать микроорганизмы и вирусы, способные к аэрозольной передаче. К данной категории относится вирус SARS-CoV-2, который в 2020 году вызвал пандемию во всем мире. Идентификация SARS-CoV-2 в вентиляционных установках важна как в офисах, так и в медицинских учреждениях. В многочисленных проведенных работах был идентифицирован данный вирус в системах вентиляции [102–105], а в работе Nissen была представлена возможность распространения

SARS-CoV-2 за счет вентиляции на расстояние не менее 50 м от вентиляционных отверстий в палатах с пациентами с COVID-19 [106].

Неправильное обслуживание систем кондиционирования и вентилирования также могут быть резервуаром и причиной распространения многих инфекционных болезней человека. В работе Bernstein показал, что неправильное обслуживание системы HVAC поддерживают обильный рост *Penicillium* spp. и приводит к увеличению концентрации переносимых по воздуху грибов в офисе в 50-80 раз [107]. Zhang с коллегами обнаружили *Legionella pneumophila* в 66,7% образцов системы вентилирования [108]. Ряд исследователей считают, что неправильное использование и/или неисправно работающая система вентиляции была основной причиной распространения вируса SARS-CoV-2 на круизном лайнера Diamond Princess [109,110]. В качестве подтверждения данных предположений Azimi в своей работе создал 21600 сценариев распространения вируса SARS-CoV-2 на круизном лайнера Diamond Princess и пришел к выводу, что аэрозольная передача была основным путем передачи COVID-19 среди пассажиров, несмотря на консервативные предположения о высокой скорости вентиляции и отсутствии условий рециркуляции воздуха на круизном лайнере [111].

### 1.2.5 Влияние сантехнических систем

Другим источником образования биоаэрозоля являются водопроводные и сантехнические системы. Более половины твердых веществ в фекалиях составляют бактерии, которые могут образовывать аэрозоль при смывании туалета [84]. Было подсчитано, что единичный смыв унитаза производит образование порядка 145 тысяч аэрозольных частиц, из которых примерно 99% имеют размер менее 5 мкм [112].

Одной из первых работ, показывающих роль водопроводной системы в качестве источников биоаэрозолей была работа Gerba, Wallis и Melnick, которые проводили посев бактериофага MS-2 и бактерии *Escherichia coli* в туалете перед смывом [113]. После смыва бактериофаг MS-2 и *Escherichia coli* были обнаружены на всех поверхностях ванной комнаты (стены, пол, сиденье унитаза, ободок унитаза, ручка смыва, ванна, раковина и шкаф), что указывает на образование аэрозоля при смыве унитаза и при этом на сохранение жизнеспособности исследуемых бактериофага и бактерии. Данные результаты были подвержены спустя несколько десятилетий Barker и Jones, которые идентифицировали *Serratia marcesens* в аэрозольной форме после трех смывов. Также было показано, что спустя 60 минут после промывания в воздухе сохраняется жизнеспособная *Serratia marcesens* [114].

Данные источники имеют важное значения в медицинских учреждениях. Как было отмечено ранее возбудители инфекционных болезней легко передаются в медицинских учреждениях из-за большой доли больных и лиц с ослабленным иммунитетом [115,116]. При этом, медицинский персонал может неосознанно быть переносчиками инфекционных

болезней и передавать их пациентам при непосредственном общении и при контакте пациентов с загрязненными поверхностями [115,117]. Поверхностное загрязнение может формироваться за счет естественного оседания биоаэрозолей, образующихся от инфицированных пациентов или зараженного оборудования. Проведенные исследования биоаэрозолей в медицинских учреждениях позволили лучше понять их структуру и источники образования биоаэрозолей во время ухода за пациентами. Показано, что аэрозоль состоял в основном из бактерий, идентифицированных как представители нормальной флоры человека, или патогенных микроорганизмов [118]. Более того, в ряде исследований микроорганизмы, идентифицированные с различных поверхностей в больницах, стали их также идентифицировать у пациентов после госпитализации [115,119–121].

Недавнее исследование проведенное непосредственно в медицинских учреждениях США продемонстрировало, что концентрации частиц, измеренные до и после смыва, значительно различаются и концентрация биоаэрозолей при смыве фекальных отходов значительно превышает фоновые концентрации [115]. Однако концентрации биоаэрозоля не различались ни во времени и ни на расстоянии. Это свидетельствует о том, что образующиеся аэрозоли могут оставаться во взвешенном состоянии более 30 минут после смыва, что еще раз подчеркивает значения туалета как источника биоаэрозоля, который может привести к передаче патогенных микроорганизмов.

Другим источником биоаэрозоля могут выступать смесители для раковины и душа. Их использование может производить миллионы бактериальных и грибковых биоаэрозолей. Около 90% аэрозольных частиц, образующихся под душем, имели размер от 1 до 5 мкм, а 50% аэрозольных частиц, образующихся в результате работы смесителя для раковины, имели размер от 1 до 8 мкм [84]. Размер данных частиц является достаточно маленьким, чтобы проникнуть в нижние дыхательные пути человека и вызвать заболевание.

Существует множество литературных данных, описывающих распространения бактерии рода *Legionella* путем распыления при принятии душа и использовании смесителей [122,123]. *Legionella pneumophila* является возбудителем легионеллеза или болезнь легионеров (легочная форма) и может вызвать лихорадку Понтиак (нелегочная форма), респираторное заболевание с симптомами похожее на пневмонию. Многочисленные исследования выявили чрезвычайно высокие уровни *Legionella pneumophila*, от  $10^5$  до  $10^6$  клеток на  $1 \text{ м}^3$  в воздухе, в домах престарелых и медицинских учреждениях [123]. Помимо *Legionella* sp. в медицинских учреждениях в системе водоснабжения были обнаружены *Mycobacterium mucogenicum* и *P. aeruginosa* [124].

Биоаэрозоли, содержащие грибы, также образуются в душевых кабинках и при использовании смесителей. Наличие *Fusarium* spp. и *Aspergillus* spp. были

продемонстрированы в биоаэрозоле в больницах после использования душа или крана [125,126]. Помимо *Fusarium* spp. и *Aspergillus* spp., другие грибы, включая *Penicillium* spp., *Paecilomyces variotii*, *Alternaria alternata*, *Cladosporium* spp. и *Acremonium* spp. были обнаружены в биоаэрозолях, образующихся в душевых [84].

### 1.2.6 Изучение разнообразия микроорганизмов в системах общественного транспорта на примере метрополитена

Согласно данным Организации Объединенных Наций, более половины населения мира составляют городские жители, и ожидается, что к 2045 году их число возрастет до более чем двух третей – 66,4% [127]. Для сравнения, доля городского населения в 2018 году составила 55,3% (4,219 млрд. человек). Продолжающаяся урбанизация приводит не только к росту городов, но и к увеличивающейся зависимости населения мегаполисов от общественного транспорта. Системы общественного транспорта, включающие в себя автобусы, трамваи, железнодорожный транспорт (электрички), метрополитен, являются неотъемлемой составляющей повседневной жизни людей, позволяя достаточно быстро и комфортно передвигаться в мегаполисе. В Таблице 1 представлены данные по использованию различных видов транспорта в крупных мегаполисах мира.

Таблица 1 – Доля использования отдельно взятого вида транспорта в общей системе городского в различных мегаполисах. Данные представлены за 2019 год, за исключением Нью-Йорка (2017 год).

| Город    | Площадь, км <sup>2</sup> | Пассажиропоток, млн.человек/год (доля использования, %) |                 |  |                  | Источник  |
|----------|--------------------------|---|-----------------|--|------------------|-----------|
|          |                          | Метрополитен  | Автобус         | Железнодорожный транспорт                      | Другой транспорт |           |
| Москва   | 2561,5                   | 2547<br>(59,6%)   | 1189<br>(27,8%) | 149 (3,5%)<br>Московское<br>центральное кольцо | 387<br>(9,1%)    | [128]     |
| Нью-Йорк | 1214,9                   | 2713<br>(71,2%)   | 869<br>(22,8%)  | 206<br>(5,4%)                                  | 25<br>0,6%       | [129,130] |
| Берлин   | 891,69                   | 596<br>(37,2%)  | 465<br>(29,0%)  | 334<br>(20,8%)                                 | 209<br>(13,0%)   | [131]     |

В таких крупных (прежде всего по занимаемой площади) мегаполисах как Москва и Нью-Йорк, доля метрополитена в структуре городского транспорта занимает большую часть (более 59%), в то время как в более компактных городах, таких как Берлин, наблюдается

пропорциональное использование, как наземных видов транспорта, так и метрополитена. На примере Москвы мы можем наблюдать активное развитие системы метрополитена, позволяющей с минимальными затратами времени добраться из разных точек города, особенно в час-пик. Изменение доли отдельно взятого транспорта будет обусловлено ростом населения, что, прежде всего, будет способствовать развитию метрополитена. Так, за период с 2011 по 2021 года были открыты четыре новые линии, на которых ввели в эксплуатацию более ста новых станций метрополитена и Московского центрального кольца (железнодорожный наземный транспорт). В ближайшие несколько лет планируется построить еще три новые линии и порядка 50-60 станций [132]. Все это, безусловно, будет способствовать дальнейшему увеличению пассажиропотока, что повышает потенциальную роль метро в передаче инфекционных заболеваний и увеличение риска биотерроризма.

Характеристика профилей микроорганизмов в условиях городского общественного транспорта приобретает все большее значения для микробиологического мониторинга и надзора за патогенными микроорганизмами и генами устойчивости к антибиотикам, которые могут быть ранними индикаторами вспышек заболеваний, и служить сигналом для принятия соответствующих противоэпидемических мероприятий. Накопленные данные о влиянии человека и его контакта с различными поверхностями, сделанными из разнообразных материалов, позволят в будущем рационально подойти к проектированию общественных мест для эффективного поддержания нашего здоровья в присутствии микробных резервуаров [133].

Благодаря развитию технологий полногеномное секвенирование стало доступным для использования в большинстве исследований по изучению разнообразия окружающих нас микроорганизмов. Изучение микробиома метрополитена было проведено во многих крупных городах, среди которых Нью-Йорк [134], Мехико [135], Бостон [133], Гонконг [136], Осло [137] и Москва [19]. Данные исследования позволили изучить разнообразие микроорганизмов и вирусов, оценить возможную угрозу для человека. Это также позволило сделать шаг к пониманию взаимодействия многих видов микроорганизмов и приблизиться к осознанию малоизученности мира микроорганизмов и вирусов. Так, в данных полногеномного секвенирования образцов, собранных в Нью-Йоркском метрополитене, примерно половина ДНК (48%) не соответствовала ни одному известному организму [134], а представленность бактериофагов коррелировала с представленностью спектра выявленных бактерий. По результатам проведенных исследований следует отметить, что образцы были обогащены бактериальными родами, связанными с кожей человека, и оральными комменсалами, такими как *Propionibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Acinetobacter*. Другая часть разнообразия приходилась на бактерии, широко распространенные в окружающей среде. Профиль бактерий, не относящихся к человеку, отражал недавние события из истории

станции. Так, например, на затопленной во время урагана Сэнди в 2012 году на станции "South Ferry Station" были найдены уникальные виды бактерий, ассоциированные с холодной морской средой, которые не встречались ни на одной из других станций метрополитена Нью-Йорка или в других образцах.

### 1.2.7 Изучение разнообразия микроорганизмов в медицинских учреждениях

Нозокомиальные инфекции (внутрибольничные инфекции, ВБИ) представляют собой инфекции, которые были приобретены пациентом или медицинским персоналом во время посещения и/или нахождения в медицинских учреждениях: больницах, клиниках, хирургических центрах, реабилитационных учреждениях. На данный момент нозокомиальные инфекции представляют собой серьезную проблему для системы здравоохранения во всем мире. Несмотря на эффективные процедуры дезинфекции, патогенные бактерии могут быть обнаружены в медицинских учреждениях, как непосредственно в палатах, так и на оборудовании. Риск заражения ВБИ часто связан с инвазивными процедурами, такими как использование аппарата искусственной вентиляции легких (ИВЛ), установка катетеров. Кроме того ВБИ может передаваться контактно, через койко-место, ранее занимаемое больным пациентом. Передаче способствуют ослабленность организма больного, а также адаптированность микроорганизмов к применяемым в клинике противомикробным средствам.

В Соединенных Штатах Америки нозокомиальные инфекции занимают 5–6 место среди всех причин смерти, опережая диабет или грипп [138]. По оценкам Центров по контролю за заболеваниями (CDC) только в американских больницах, на ВБИ ежегодно приходится 1,7–2 млн случаев, из которых порядка 100 тысяч – летальные [139]. В странах Европейского союза наблюдается схожая ситуация. Около 7% пациентов в больницах неотложной помощи сталкиваются с ВБИ, что составляет порядка 4,1 млн в год [140], из которых порядка 37 000 случаев оканчиваются летальным исходом [141]. В России ежегодно регистрируется примерно 30 тыс. случаев ВБИ, что по всей видимости является сильно заниженной цифрой [142].

Наиболее распространенными микроорганизмами, вызывающими нозокомиальные инфекции, являются микроорганизмы, составляющие так называемую ESKAPE группу – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. Кроме данной группы к внутрибольничным инфекциям также относят виды *Candida* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Clostridium difficile*, *Escherichia coli* [143]. Они же вносят наибольший вклад в проблему антибиотикорезистентности.

Как правило, возбудители ВБИ чрезвычайно устойчивы ко многим противомикробным препаратам, а отсутствие новых противомикробных препаратов увеличивает бремя болезней. Некоторые из перечисленных грамотрицательных микроорганизмов обладают гораздо более высокой устойчивостью к антибактериальным препаратам. В ряде работ были отмечены случаи роста устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам [144,145]. Так, отмечается рост устойчивости *E. coli* и *Acinetobacter* spp. к фторхинолонам; *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. к цефалоспорином; *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. показывают высокую устойчивость к карбапенемам, являющимися предпочтительной схемой приема препаратов в отделениях интенсивной терапии [144,145]. В другом исследовании была обнаружена полная устойчивость *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином третьего поколения [144,146]. Подавляющее большинство видов *Klebsiella* spp. были устойчивы к ципрофлоксацину, гентамицину, пиперациллину, тазобактаму и имипенему. У *Citrobacter* spp. также наблюдали устойчивость к цефалоспорином, фторхинолонам и аминогликозидам [144,146].

В связи с этим очевидно, что наличие антибактериальных препаратов в рекомендациях по лечению пациентов с новой коронавирусной инфекцией (COVID-19) также будет способствовать дальнейшему росту штаммов с устойчивостью к данным препаратам, что уже на данном этапе представляет собой глобальную проблему для будущего человечества. Помимо таких негативных факторов как снижение показателей благополучия жизни людей при ВБИ, селективного отбора и появления новых резистентных штаммов, система здравоохранения сталкивается с дополнительной трудностью – экономическим ущербом от ВБИ. Предпринятые различные меры и программы позволили снизить количество случаев ВБИ, что сказалось и на размере общих прямых затрат. Если в 2009 году прямые затраты колебались в диапазоне от 28 до 45 миллиардов долларов США [138], то по данным 2016 года их размер составил от 7,2 до 14,9 млрд долларов США [147]. Затраты в Европе, связанные с нозокомиальными инфекциями, оцениваются в 12 миллиардов долларов США в год [148]. В Российской Федерации ежегодный экономический ущерб от ВБИ по различным оценкам составляет от 10–15 млрд. рублей [142] до 300-500 млрд. рублей [149].

Учитывая такой высокий уровень затрат, Всемирная Организация Здравоохранения предпринимает усилия по совершенствованию клинических рекомендаций с целью снижения частоты ВБИ. Особое внимание уделяется микробиологическому мониторингу в условиях стационара. Мониторинг, прежде всего, различных поверхностей в медицинских учреждениях, как правило, связан с классическими методами микробиологии и сосредоточен на посеве собранных образцов на различных питательных средах. В настоящее время данный способ имеет ряд ограничений, связанных с низкой производительностью, временем анализа

и возможностью оценки до 10–15 % всего разнообразия микроорганизмов. Ряд исследований продемонстрировали эффективность использования современных молекулярно-генетических методов анализа, основанных на количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени и технологии секвенирования следующего поколения (NGS) для характеристики микробиома больничной среды в сравнении с традиционными [21,22,150–152]. Безусловно, одним из преимуществ классических методов по сравнению с молекулярно-генетическими методами является определение фенотипических свойств микроорганизмов. Однако, данное ограничение можно частично преодолеть использованием РНК-секвенирования, которое позволит провести оценку жизнеспособности микроорганизмов и экспрессии функционально значимых генов. Кроме этого, полногеномное секвенирование позволяет провести оценку резистомы, поиск различных факторов вирулентности микроорганизмов и более оперативно получить комплексную информацию для принятия своевременных мер. Совместное использование этих двух подходов (ПЦР и NGS) для изучения микробиома медицинских учреждений позволяет выявить общие закономерности в распределении микроорганизмов, а также выявить потенциальные резервуары внутрибольничных инфекций и разработать новые рекомендации в качестве профилактических мер для снижения риска вспышек ВБИ.

### **1.2.8 Оценка распространения устойчивости к антибактериальным препаратам в городских условиях**

Устойчивость к противомикробным препаратам (УПП) представляет собой серьезную проблему для здоровья людей и животных во всем мире [153,154]. Большинство инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), имеют внутрибольничное происхождение, и данные МЛУ возбудители могут годами циркулировать в условиях больниц [155]. В связи с этим, большинство исследований было сконцентрировано на медучреждениях. Понимание дальнейшего распространения резистентных микроорганизмов в окружающей среде имеет важное значение для контроля над проблематикой УПП. В качестве наглядного примера может выступить быстрое распространение гена NDM-1 в окружающей среде. Впервые он был обнаружен в 2008 году у *Klebsiella pneumoniae*, которая была выделена от пациента прибывшего из Индии в Швецию; через пару лет данный ген был идентифицирован в образцах питьевой воды в Нью-Дели и в реке во Вьетнаме. В настоящее время NDM-1 и его варианты распространены по всему миру и даже были обнаружены на Шпицбергене [155]. Несмотря на то, что УПП является естественным эволюционным процессом, большой скорости данного процесса способствует широкое применение антибактериальных препаратов (как при нецелесообразном лечении пациентов, так и при бесконтрольном использовании в сельском хозяйстве). Это

свидетельствует о высоком значении антропогенного фактора в качестве катализатора развития резистентности у бактерий [156]. При этом большая часть (до 90% [17]) вводимых антибиотиков выводится в их биологически активной форме как с мочой, так и с фекалиями. Это послужило поводом для целого ряда исследований с целью оценки распространенности устойчивости к антибиотикам в грунтовых водах поблизости от ферм и в сточных водах в городах [157,158]. Одним из преимуществ последнего подхода (анализа сточных вод) для изучения резистентности к антибиотикам в городских условиях является возможность получить усредненную выборку по целому городу в любое время года. Кроме этого, образцы сточных вод успешно применяются для мониторинга кишечных патогенов в т.ч. энтеровирусов и даже коронавируса [159]. Стоит отметить и возможность образования аэрозолей на станциях очистки сточных вод, что, в свою очередь, способствует распространению микроорганизмов в окружающую среду.

Другим интересным объектом с точки зрения изучения резистентности бактерий является аэрозоль и поверхности в местах массового пребывания людей. Исследование, проведенное в Пекине во время смога [160], позволило обнаружить у микроорганизмов гены, кодирующие устойчивость к  $\beta$ -лактамам, тетрациклинам и фторхинолонам. В работе Leung с коллегами оценили относительный вклад различных источников в резистом общественного транспорта в Денвере и Нью-Йорке (США), Гонконге (Китай), Лондоне (Великобритания), Осло (Норвегия) и Стокгольме (Швеция) [161]. Было показано, что резистомы человеческой кожи, почвы и сточных вод значительно пересекаются с воздухом общественного транспорта. Кроме того, гены АБР, происходящие из фекалий животных, имеют более высокую долю резистома воздуха в Денвере, в то время как Гонконг и Стокгольм, по-видимому, содержат значительную долю генов АБР, которые, возможно, были получены из водной среды.

Данные примеры демонстрируют широкое распространения устойчивых к антибактериальным препаратам бактерий в неклинической среде (очистные сооружения, свалки, животноводческие фермы, городской транспорт) и на прилегающих территориях (в почве, поверхностных водах, воздухе) [162]. Окружающую среду, в данном контексте, следует рассматривать как резервуар и источник различных генов АБР. Возможность распространения устойчивости посредством горизонтального переноса генов АБР от бактерий, обитающих в окружающей среде, к комменсалам и патогенным бактериям вызывает большие опасения и дальнейшее активное распространение антибиотикорезистентности в отсутствие новых классов антибактериальных препаратов [17,163].

### **1.3 Методы сбора образцов для исследования микробиома**

Отбор образцов для проведения исследования микробиома в городских условиях можно условно разделить на два типа: анализ поверхностей и анализ биоаэрозоля. Первый

вариант довольно прост и легко стандартизируемый метода. Сбор же биоаэрозоля является нетривиальной задачей и является предметом активного обсуждения, поскольку биоаэрозоли очень разнообразны по размерам, концентрациям, биологическому составу. Имеющиеся на данный момент пробоотборники отличаются принципом сбора биоаэрозоля, скоростью воздушного потока, размером собираемых частиц, длительностью сбора и другими техническими параметрами. В целом можно выделить ряд проблем, с которыми сталкивается исследователь при выборе аэрозольного пробоотборника:

1. Способность сохранять жизнеспособность микроорганизмов и вирусов;
2. Способность в короткие временные рамки собирать достаточно количество материала для последующих анализов;
3. Точность и эффективность отбора образцов;
4. Условия окружающей среды, в которой отбираются образцы.

Несмотря на эти проблемы технологии сбора биоаэрозолей за последние несколько десятилетий добились огромных успехов.

### **1.3.1 Сбор образцов с твердой поверхности**

Как было отмечено ранее, сбор образцов с поверхностей для изучения микробиома широко используется в повседневной практике. Данный метод не требует дорогостоящих пробоотборников, он прост в эксплуатации, и возможно создать стандартизированный протокол для проведения масштабных экспериментов с последующим релевантным сравнением. Ввиду перечисленных обстоятельств многие отрасли промышленности, диагностические лаборатории, медицинские учреждения, исследовательские группы используют отбор образцов с поверхности для последующих микробиологических, вирусологических и молекулярно-генетических исследований. Разработанные международные рекомендации по сбору с поверхности (ISO 18593:2018), а также отечественные методические рекомендации (МР 4.2.0220-20) позволяют сделать исследования стандартизованными. Общий протокол работы по сбору образцов состоит из трех этапов:

1. Извлечь стерильный тампон из упаковки и смочить его в транспортной среде или другом подходящем буфере;
2. Вращающимися движениями аккуратно протереть желаемую область с определенной площади (которая регламентируется предметом исследования) (Рисунок 5);
3. Перенести тампон в пробирку и герметично закрыть крышкой.

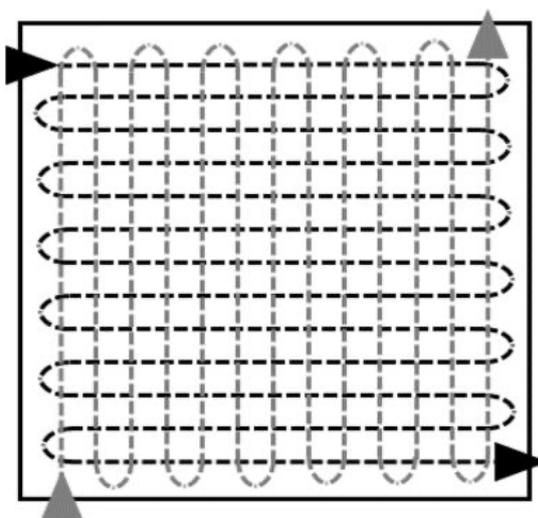


Рисунок 5 – Иллюстрация процедуры отбора образцов. Сначала тампон пронесли по поверхности в виде Z-образном движении один раз (черные стрелки). Затем тампон провели по поверхности второй раз, перпендикулярно первому направлению (серые стрелки). Адаптировано из [164]

На сегодняшний день основными отличиями в тампонах (синоним в зарубежной литературе – Swab, сваб) является материал самого тампона. Традиционными являются ватные (хлопковые) тампоны, используемых для изучения микроорганизмов с поверхности, а также для взятия проб биологических следов человека [164]. На сегодняшний момент наряду с ватными широко используются нейлоновые и поролоновые тампоны (Рисунок 6). В целом материал тампона должен состоять из компонентов с низким содержанием волокон и твердых частиц, обладать высокой абсорбирующей способностью и не влиять на процесс экстрагирования. Перечисленные факторы особенно важны для проведения аналитических анализов с высокой чувствительностью, а также для работы со следовыми количествами образца.

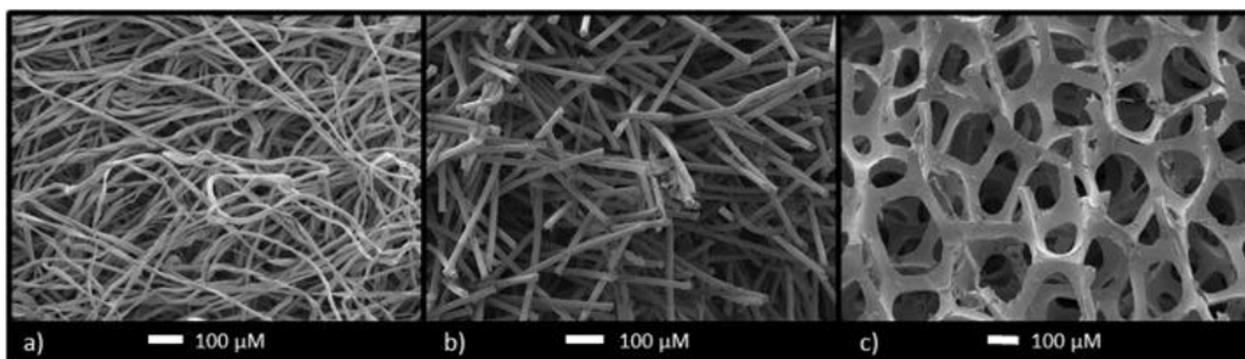


Рисунок 6 – Изображения различных тампонов, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии, иллюстрирующие различия в структуре а) ватного тампона (производство Selefa), б) тампона с нейлоновым ворсом (производство Soran) и в) тампона из пеноматериала (Critical Medium). Адаптировано из [164].

Несмотря на простоту сбора и возможности стандартизации методологии сбора образцов с поверхностей сталкивается с рядом ограничений. Во-первых, представленность микроорганизмов в аэрозоле и на поверхности может быть различной. Во-вторых, передача инфекционных патогенов посредством биоаэрозоля вызывают серьезную озабоченность. Кроме того, биоаэрозоли являются одним из путей формирования фомитов. Данные ограничения . В последующих разделах будут описаны некоторые из используемых методов сбора биоаэрозоля.

### 1.3.2 Сбор образцов с использованием фильтров

Использование фильтров является одним из наиболее часто используемых методов для сбора биоаэрозоля в виду удобства и простоты в использовании [165]. После сбора биоаэрозольных частиц на фильтре их можно элюировать в жидкость для последующего анализа различными методами. Частицы, осажденные на фильтре, также можно исследовать непосредственно с помощью микроскопии, в том числе электронной микроскопии или непосредственно перенести на питательную среду для культивирования.

На данный момент фильтры могут быть изготовлены из различных материалов: желатина, стекловолокна, поликарбоната, целлюлозы, политетрафторэтилена, поливинилхлорида, нейлона (Рисунок 7) [165–168].

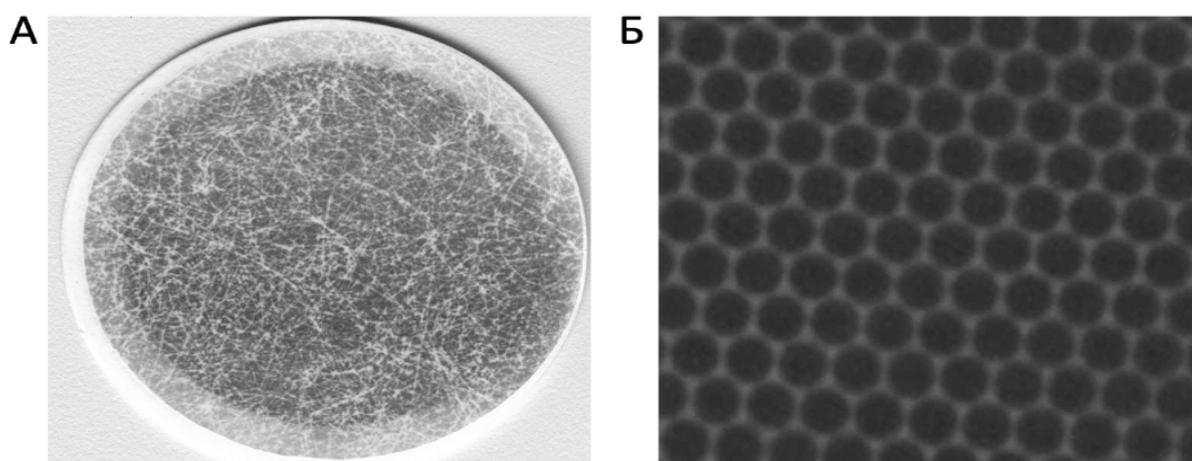


Рисунок 7 – Сравнительная характеристика некоторых фильтров. А) Фотография образца нейлонового фильтра, которая отображает волокнистую структуру (диаметр фильтра 37 мм) и Б) структурированные поры у тefлонового фильтра (каждая пора имеет диаметр 0,33 мм). Адаптировано из [169].

Выбор фильтров зависит от выбранной методики анализа. Например, желатиновые фильтры были разработаны для лучшего сохранения жизнеспособности микроорганизмов, которые собираются на поверхности мембраны, что особенно удобно для микроскопического анализа [165]. В исследовании Li продемонстрировал эффективность улавливания частиц различного размера с использованием фильтров из стекловолокна [170].

Помимо материала, из которого изготовлен фильтр, важное значение имеют такие параметры как размер и пористость фильтра, которые влияют на требования к мощности, необходимой для сбора образцов при определенной скорости потока. Как правило для более длительного сбора без потери эффективности сбора используют фильтры с более высокой пористостью.

Особых успехов в данной области удалось достичь д.ф.-м.н. М.Н.Морозову из Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (Пушино, Россия). Морозову с коллегами удалось разработать новый метод, в котором отдельно стоящие наноматы формируются путем газовой нейтрализации заряженных нановолокон облаком заряженных малых противоионов [171]. В качестве исходного материала был использован нейлон-4,6. В результате были получены почти невидимые ( $>95\%$  светопропускания), чрезвычайно легкие ( $10\text{--}20\text{ мг/м}^2$ ), состоящие из нановолокон, диаметром  $3\text{--}15\text{ нм}$ , нанофильтры. Данные фильтры сочетают в себе низкое сопротивление воздушному потоку с низким проникновением субмикронных аэрозольных частиц и способны, благодаря почти откалиброванным порам, «отбирать» частицы по размеру, отсекая проникновение взвешенных в воздухе и воде частиц, когда их размер превышает пороговый уровень [171]. Разработанная технология позволяет использовать практически любой материал для изготовления нанофильтров. Кроме того, данные фильтры обладают повышенной емкостью, что при прочих равных условиях позволит собрать большее количество микроорганизмов. На рисунке 8 представлен внешний вид комплекта для сбора аэрозоля с использованием нанофильтров.



Рисунок 8 – Внешний вид комплекта для сбора аэрозольных образцов с использованием нейлонового нанофильтра производства ИТЭБ РАН (Россия).

Помимо активного сбора образцов аэрозоля в последние годы стали использовать фильтры системы вентиляции и кондиционирования воздуха для микробиологической характеристики различных помещений [165,172,173]. Такой подход обеспечивает усредненные данные долгосрочного мониторинга, что потенциально улучшает предел обнаружения. В то же время продолжительность сбора с использованием такого подхода может составлять продолжительное количество времени.

### **1.3.3 Пробоотборники на основе импакторов**

Пробоотборники на основе импакторов являются одними из наиболее часто используемых устройств при сборе биоаэрозолей. Частицы с достаточно высоким значением числа Стокса отклоняются от линий тока, когда они меняют направление и приземляются на поверхность импактора [165]. Аэродинамический диаметр частиц, при котором достигается эффективность улавливания 50%, называется диаметром отсечки или  $d_{50}$ . Поскольку число Стокса частицы увеличивается с увеличением диаметра, плотности и скорости, установка последовательных ударных элементов с соплами все меньшего размера приводит к увеличению скорости воздуха и позволяет постепенно собирать более мелкие частицы [174]. Такое расположение называется многоступенчатым импактором.

На основе этих принципов было разработано большое количество биоаэрозольных пробоотборников [175]. Доступные импакторы различаются по скорости воздушного потока, диаметрам отсечки, количеству форсунок и стадиям сбора. Типичными поверхностями для сбора, используемыми в импакторах, являются чашки с агаром для прямого культивирования микроорганизмов, а также предметные стекла, фильтры и другие твердые поверхности для микроскопического анализа.

#### **1.3.3.1 Импакторы со сбором образцов на агаризованную питательную среду**

Одним из наиболее известных импакторов данного класса является многоступенчатый механизм Андерсена, который был представлен в 1958 году. Он был рекомендован и использовался в качестве эталонного пробоотборника [176]. Одним из основных преимуществ использования импакторов для сбора микроорганизмов из воздуха является простота использования и удобство: после сбора образца чашки с агаром переносятся непосредственно в инкубатор без промежуточных этапов. Недостатком данного импактора является снижение жизнеспособности микроорганизмов в виду ударов, что приводит к их повреждению, включая потерю способности к культивированию и даже целостности мембраны [176].

#### **1.3.3.2 Импакторы со сбором образцов в жидкость**

Механизм сбора многих пробоотборников на жидкой основе аналогичен механизму сбора рассмотренных ранее импакторах: инерция используется для отделения частиц от

воздушного потока и дальнейшего их перемещения в жидкую среду. Затем жидкость можно разделить на аликвоты и проанализировать различными методами.

Оригинальные конструкции жидкостных импинджеров были представлены еще в 1947 году, и они привели к разработке классических импинджеров из цельного стекла (AGI) (Ace Glass, Inc., Вайнленд, Нью-Джерси), которые работают со скоростью воздушного потока 12,5 л/ мин и собирают частицы в 20 мл жидкости [177]. Большинство импинджеров являются одноступенчатыми устройствами, также доступны многоступенчатые импинджеры, такие как многоступенчатый жидкостный импинджер Burkard (Burkard Manufacturing Co. Limited, Англия), способный собирать частицы трех фракций.

В то время как импинджеры AGI являются эффективными коллекторами с  $d_{50}$  0,3 мкм, собираемая жидкость испаряется примерно за 90 минут, а высокие скорости отбора приводят к повреждению микроорганизмов. Для устранения данных недостатков был разработан жидкостный пробоотборник с вихревым потоком воздуха BioSampler (SKC Inc., Eighty Four, PA), который сочетает в себе ударное воздействие с центробежным движением. Коллектор работает со скоростью воздушного потока 12,5 л/мин и может собирать образцы объемом 5 или 20 мл [178]. Было показано, что BioSampler способствует лучшему сохранению микроорганизмов по сравнению с традиционными импинжерами и фактически стал эталонным пробоотборником в исследованиях биоаэрозолей [179].

В дополнение к традиционным импинжерам были представлены другие конструкции жидкостных пробоотборников. Существуют модели циклонов с подачей жидкости на стенки, в которых используется центробежный ударный механизм или циклонный механизм сбора; и которые работают со скоростью потока до 300 л/мин, собирая частицы в 10–15 мл жидкости – пробоотборники семейства Coriolis (Bertin Technologies, Франция) [180].

Другой группой приборов данного класса являются высокопроизводительные пробоотборники, состоящие из двух компонентов – виртуального импактора и циклонного коллектора. Далее мы рассмотрим принцип работы данных пробоотборников на примере приборов производства SASS (Research International, Inc., Монро, Вашингтон). Виртуальный импактор (SASS 4000) позволяет осуществлять сбор большого объема воздуха со скоростью до 4000 л/мин, непрерывно перенося частицы из первичного потока воздуха в гораздо меньший поток вторичного воздуха (Рисунок 9).

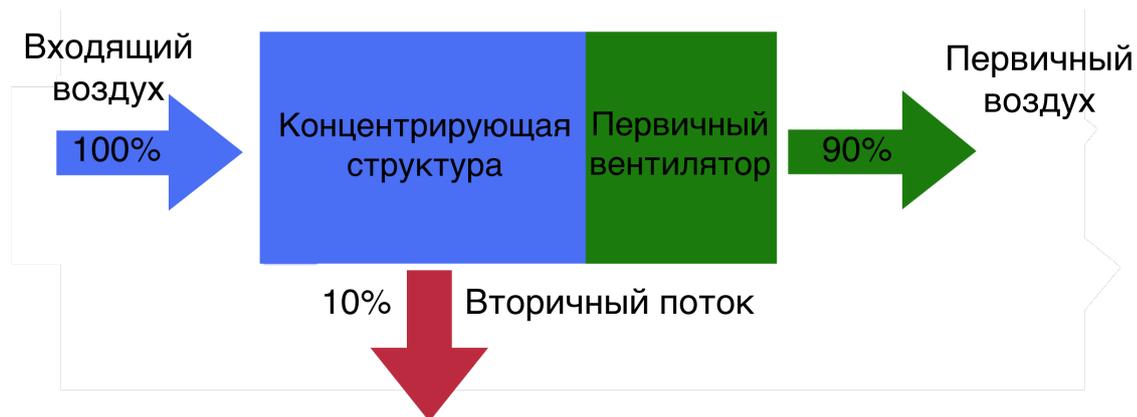


Рисунок 9 – Блок-схема работы концентратора. Примерно 10% входящего воздуха после концентрирования поступает во вторичный воздушный поток. Адаптировано из [181]

В результате, вторичный поток может достигать концентраций аэрозоля в 4–15 раз выше, чем изначально в поступающем воздухе. Затем частицы направляются во вторичный поток – в циклонный коллектор (SASS 2300), заставляя воздух первичного контура циркулировать через каналы особой формы, где центробежная сила и импульс частиц используются для изоляции и концентрации частиц в потоке циркулирующей жидкости (Рисунок 10).

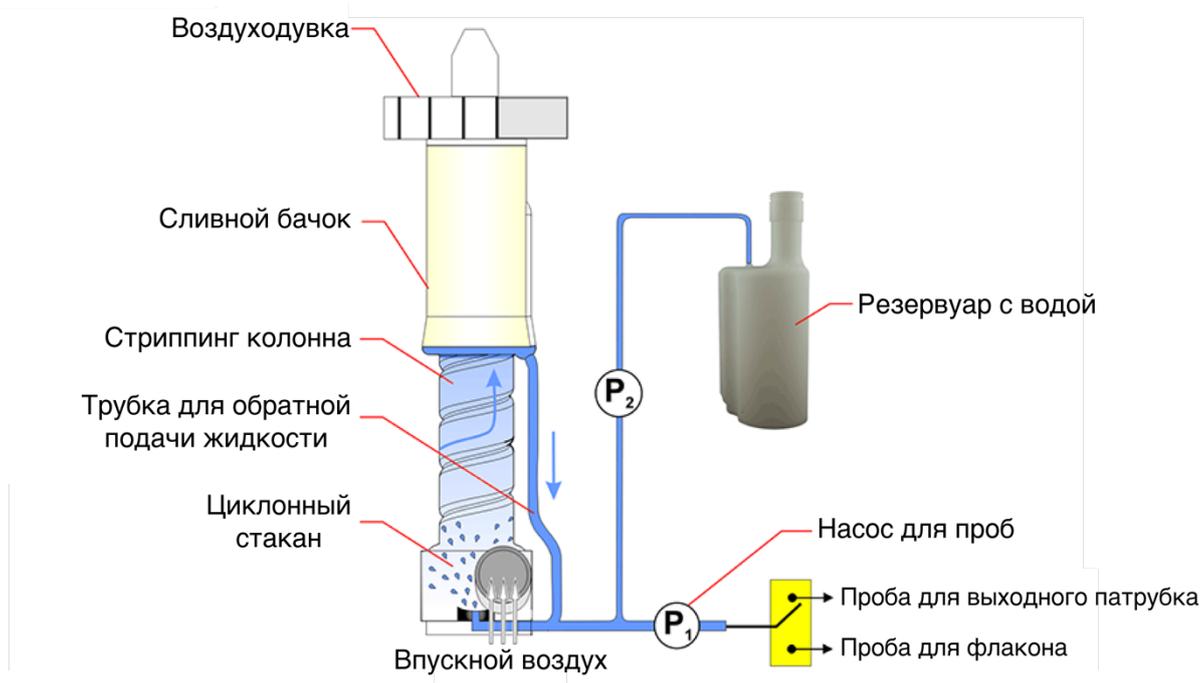


Рисунок 10 – Схема устройства циклонного коллектора SASS 2300. Адаптировано из [182]

Внутренняя структура спроектирована таким образом, что наименьшее поперечное сечение потока составляет канал шириной 0,6 мм и длиной 6,35 см, что обеспечивает хорошую устойчивость к засорению более крупными частицами.

В совокупности приборы SASS2300 + SASS4000 позволяют концентрировать частицы 1–10 мкм при скорости первичного воздушного потока 4000 л/мин и с эффективностью сбора, не менее 20%. Внешний вид комплекта SASS2300 + SASS4000 представлен на Рисунке 11.



Рисунок 11 – Внешний вид двухстадийной системы сбора аэрозоля SASS 4000/SASS 2300 в полевом варианте производства SASS (Research International Inc., США). Адаптировано из [181]

В Российской Федерации был разработан отечественный прибор Циклон-Био, аналог комплекса приборов SASS2300 + SASS4000. Принцип работы также основан на создании мощного потока для сбора биоаэрозоля с последующим концентрированием в жидкости. Принципиальным отличием Циклон-Био от комплекса SASS является большая скоростью

воздушного потока (до 4500 л/мин) и селективный сбор частиц размером 0,5 – 5 мкм [183]. Внешний вид комплекта Циклон-Био представлен на Рисунке 12.

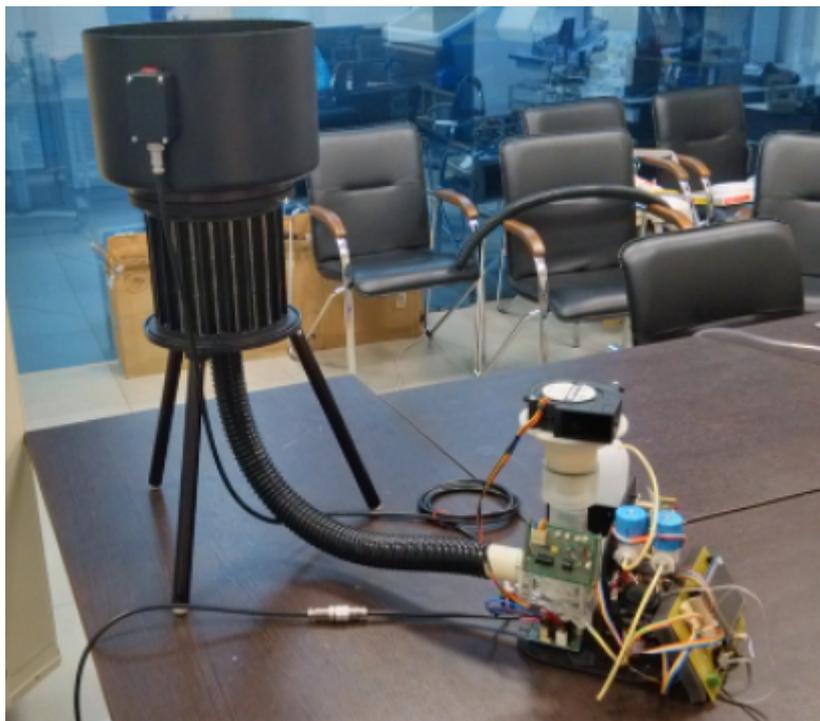


Рисунок 12 – Внешний вид комплекта для забора аэрозольной пробы Циклон-Био КДРФ.413121.006 (виртуальный импактор КДРФ.413124.001 и циклонный коллектор КДРФ.413121.012 производства НИЯУ МИФИ (Россия).

Одним из главных преимуществ использования высокопроизводительных пробоотборников является высокое концентрирование частиц, что позволит собирать большее количество микроорганизмов за относительно непродолжительное количество времени в условиях повышенной концентрации биоаэрозоля.

## **Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

### **2.1 Исследование микробиологического разнообразия в Московском метрополитене**

#### **2.1.1 Сбор образцов**

Образцы воздуха и поверхности были собраны в вестибюле станций Новокосино и Черкизовская Московского метрополитена в феврале 2017 года. Входные группы включали пространство до турникета, чтобы можно было обеспечить сбор биоаэрозоля и образцов с поверхностей турникетов. Отбор образцов проводился в два этапа. Каждый этап состоял из трех последовательных сбора образцов продолжительностью 15 минут каждый. Первый этап стартовал с начала движения первых поездов и длился с 6:00 до 6:45. Второй этап приходился на момент увеличения пассажиропотока с 8:00 и продолжался до 8:45.

##### **2.1.1.1 Сбор аэрозольных образцов с использованием SASS 2300 и виртуального импактора SASS 4000 – метод Cyclone-SASS**

Метод сбора Cyclone-SASS представляет собой комбинацию пробоотборника SASS 2300 (Research International Inc., Монро, Вашингтон, США) с виртуальным импактором SASS 4000 с установленной скоростью потока 4000 л/мин с последующим концентрированием собранных частиц размером 0,5-10 мкм в стерильном растворе PBS объемом 4,5 мл. Виртуальный импактор SASS 4000 был установлен на высоте 150 см от пола. Собранные образцы хранили и транспортировали в пенопластовом холодильнике со льдом. Полученные образцы были разделены на аликвоты объемом 1 мл и депонированы для хранения при -80°C.

Одну аликвоту объемом 1 мл центрифугировали при 7000 g в течение 20 минут для осаждения микроорганизмов. Затем супернатант осторожно удаляли и ресуспендировали микробный осадок в 800 мкл S1-Lysis буфере PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen) для дальнейшего выделения ДНК. Прибор SASS 2300 промывали в течение 8 минут перед переходом к новому образцу для сбора. Для пробоотборника аэрозолей Cyclone-SASS в качестве отрицательного контроля использовалась внутренняя промывка без сбора аэрозоля.

##### **2.1.1.2 Сбор аэрозольных образцов с использованием Циклон-Био – метод Cyclone-MERPhI**

Метод сбора Cyclone работает по тому же принципу, что и метод Cyclone-SASS, но создает более мощную скорость воздушного потока (4500 л/мин) с дальнейшей концентрацией частиц размером 1-25 микрон в стерильный раствор PBS с конечным объемом 5,5 мл. Предыдущий сравнительный анализ пробоотборников воздуха Cyclone-SASS и Cyclone-

MEPhI в камере для аэрозольных испытаний продемонстрировал сопоставимую эффективность [183]. Место установки, отрицательные контроли, промывки, транспортировка и первичная обработка образцов производились аналогично образцам собранных методом Cyclone-SASS.

### **2.1.1.3 Сбор аэрозольных образцов на наночастицы – метод Nano**

Параллельно со сбором биоаэрозолей с помощью высокопроизводительных пробоотборников мы также собирали образцы на нейлоновые наночастицы (Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия – метод Nano). Они обеспечивают повышенную эффективность улавливания частиц, в том числе аллергенов и микроорганизмов, размером от 0,1 до 10 мкм. Для создания источника воздушного потока данный метод требует маломощную установку. В нашем эксперименте мы использовали пылесос со скоростью воздушного потока 3000 л/мин. Фильтры помещали в центрифужные пробирки объемом 15 мл содержащие 5 мл стерильного PBS буфера. В качестве отрицательного контроля использовали стерильные наночастицы из одной партии с экспериментальными. Место установки, транспортировка и первичная обработка образцов производились аналогично образцам собранных методом Cyclone-SASS.

### **2.1.1.4 Смывы с поверхности – метод Swab**

Образцы смывов с поверхностей собирали с использованием стерильных вязких свабов LOQSwabs (Coran Diagnostics, Murrieta, CA, USA). Перед взятием сваб предварительно смачивали в стерильном растворе PBS, и образцы отбирали с поверхностей, непосредственно контактирующих с человеком – турникеты и прикассовые зоны. Площадь сбора составляла 30 см<sup>2</sup>. В качестве отрицательного контроля использовали чистые свабы.

## **2.1.2 Микробиологический анализ**

Для проведения микробиологических исследований, отобранные образцы культивировали на следующих агаризованных питательных средах: колумбийский кровяной агар, среда Байрда-Паркера, Эндо агар, Энтерококковый агар, среда Сабуро (перечисленные среды были производства ООО «ЦФГС», Россия) и LB среда (собственного приготовления). Описание состава и детальное назначение используемых сред представлены в Приложении №1. Посев жидких образцов на питательные среды осуществляли в объеме 0,1 мл на чашку Петри. Жидкость равномерно распределяли по поверхности среды стерильным L-образным шпателем. Посевы инкубировали при температуре 37°C в течение 48 ч. Посевы на среде Сабуро при отсутствии видимого роста продолжали инкубировать при комнатной температуре до 7 суток включительно. На каждой из питательных сред проводили учет выросших колоний, описывая их морфологические типы (МТ). Каждому МТ присваивался индивидуальный номер и каталогизировали.

После культивирования для морфотипов была определена таксономическая классификация с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии. Для этого одну бактериальную колонию ресуспендировали в 150 мкл стерильной деионизированной воды. Затем к каждому образцу добавляли по 350 мкл 96% этанола, встряхивали и центрифугировали в течение 2 мин при  $8000\times g$  и  $4^{\circ}C$ . Супернатант удаляли, и стадию промывки повторяли дважды. К каждому образцу добавляли 40 мкл 70%-ного раствора муравьиной кислоты. Затем добавляли 40 мкл 99% ацетонитрила, раствор встряхивали и центрифугировали в течение 2 мин при  $8000\times g$  и  $4^{\circ}C$ . Один микролитр каждого образца в трех экземплярах помещали на металлический планшет и оставляли сушиться в стерильной камере при комнатной температуре. Затем на каждое пятно образца наносили по 1 мкл  $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричной кислоты (10 мг/мл) и оставляли сушиться. Планшет анализировали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF MALDI Biotyper (Bruker Scientific LLC, Биллерика, Массачусетс, США) с использованием программного пакета MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Scientific LLC, Биллерика, Массачусетс, США). Баллы (Score) выше 1,699 означали надежную таксономическую идентификацию.

### **2.1.3 Определение антибиотикорезистентности методом прямого посева**

Для этого исследования мы объединили образцы на основе метода сбора, станции и времени. Для этого, 300 мкл исходного образца объединяли в пробирки типа Эппендорф объемом 1,5 мл и аккуратно перемешивали. Определение резистентности бактерий проводили путем переноса 100 мкл образца на агаризованную питательную среду Мюллера-Хинтона, содержащую один из следующих антибиотиков: тетрациклин (10 мкг/мл), стрептомицин (20 мкг/мл), ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (50 мкг/мл), хлорамфеникол (30 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл). Данные антибиотики входят в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖВНЛП), что позволит провести оценку устойчивости к широко используемым антибиотикам.

Растворы антибиотиков готовили непосредственно перед приготовлением питательной среды. Среду Мюллера-Хинтона стерилизовали, охлаждали до  $50^{\circ}C$ , затем в среду добавляли растворы выбранных антибиотиков и полученную жидкость разливали по чашкам Петри. В качестве контроля использовали среду Мюллера-Хинтона без раствора антибиотика. Культивирование проводили при  $37^{\circ}C$  в течение 48 часов. После инкубации на всех чашках Петри проводили количественный анализ выросших колоний. Культуры, выращенные на среде с антибиотиками, пересаживали в отдельные чашки, затем проводили таксономическую характеристику методом MALDI-TOF масс-спектрометрии как было описано ранее.

#### 2.1.4 Определение антибиотикорезистентности диско-диффузионным методом

Определение чувствительности выделенных культур *Staphylococcus* spp. и *Aerococcus viridans* к антибиотикам проводили диско-диффузионным методом, с применением дисков Himedia (Индия) следующих наименований: ампициллин, амоксицилина клавуланат, цефокситин, азитромицин, левофлоксацин, гентамицин, амикацин, тетрациклин, ванкомицин, новобиоцин, бацитрацин, оптохин. Учитывая имеющиеся литературные данные о широкой устойчивостью данных бактерий к антибактериальным препаратам мы расширили исследуемую панель антибиотиков. Кроме антибиотиков из перечня ЖВНЛП (ампициллин, амоксиклав, азитромицин, левофлоксацин, гентамицин, амикацин, тетрациклин, ванкомицин) мы добавили ряд препаратов.

Цефокситин является антибиотиком широко спектра действия и активен как против грамотрицательных бактерий (например, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*), так и грамположительных бактерий (*Staphylococcus* spp. и *Streptococcus* spp). Новобиоцин является препаратом узкого спектра действия и он активен в отношении *Staphylococcus epidermidis*, что также позволяет его использовать для дифференциации в культуре от других коагулазонегативных *Staphylococcus*. Бацитрацин также является антибиотиком узкого спектра действия и активен против грамположительных микроорганизмов, таких как бета-гемолитические стрептококки, стафилококки и резистентность к бацитрацину по литературным данным встречается редко. Препарат оптохин был использован также для дифференцировки пневмококка от близкородственных видов стрептококков. Он ингибирует рост *S. pneumoniae* и не оказывает влияния на *S. pyogenes*, тем самым позволяя дифференцировать схожие колонии.

Определение антибиотикочувствительности проводили на стандартизированной для этих целей среде Мюллера-Хинтона (производство ООО «ЦФГС», Россия), в соответствии с инструкцией изготовителя дисков (HiMedia Laboratories Pvt., Индия). По окончании инкубирования посевов измеряли диаметры зон задержки роста (ЗЗР) культур бактерий вокруг дисков с антибиотиками, затем сравнивали их с референсными значениями, указанными в инструкции изготовителя, и относили культуру к одной из 3-х категорий: R – устойчива, S – чувствительна, I – умеренно чувствительна.

#### 2.1.5 Экстракция ДНК, амплификация и секвенирование

Для изучения некультивируемого и культивируемого микробиома тотальную ДНК из образцов аэрозоля, мазков и смывов с чашек Петри экстрагировали с использованием набора PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Поскольку количество ДНК в образцах некультивируемого микробиома было низким,

количество циклов амплификации было увеличено до 30 в соответствии с инструкциями производителя.

Амплификацию семи наиболее вариабельных областей гена 16S rRNA (V2, V3, V4, V6, V7, V8 и V9) проводили с использованием набора Ion 16S Metagenomics Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Для проверки амплификации нужных специфических участков проводили электрофорез в 2% агарозном геле с визуализацией бромистым этидием. Библиотеки были созданы с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Очистку библиотек проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США). Для баркодирования был использован набор IonCode (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование проводили на приборе Ion S5XL (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с использованием чипов Ion 520 и Ion 530 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США).

Данные последовательности были частично депонированы в SRA NCBI под номером доступа PRJNA737285 (только данные некультивируемого микробиома для методов сбора Cyclone-SASS и Swab).

### **2.1.6 Определение копийности гена 16S rRNA**

Оценка копийности гена 16S rRNA была проведена с использованием ПЦР-ПВ с интеркалирующим красителем SYBR Green I. Для амплификации вариабельного региона V3-V4 были использованы синтетические олигонуклеотиды Bakt\_341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') и Bakt\_805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3) [184]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 5 мкл (5×) qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия), 0,2 мкл прямого и обратного синтетического олигонуклеотида (10 μM) и 1 мкл ДНК матрицы.

ПЦР-ПВ проводили на амплификаторе QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих условиях: 95°C – 3 мин, далее 40 циклов: 95°C – 5 сек и 60°C – 30 сек. В качестве отрицательного контроля была использована ПЦР-смесь без ДНК матрицы. Калибровочная кривая была построена путем серийного разведения генома *Salmonella typhimurium*. Первичные данные были проанализированы в программном обеспечении QuantStudio 3 and 5 Real-Time PCR System Software (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные значения были нормализованы на копийность и представлены в единицах копий гена 16S rRNA на кубический метр собранного воздуха.

### **2.1.7 Анализ данных секвенирования**

В результате пробоподготовки с помощью набора 16S Metagenomics Kit были получены последовательности семи переменных регионов гена 16S rRNA. Разделение прочтений на отдельные регионы проводили, как описано ранее [185]. Дальнейший анализ последовательностей проводили с использованием пакета DADA2 версия 1.18.0 [186]. Шумоподавление использовалось с некоторыми дополнениями, чтобы соответствовать односторонним чтениям и с учетом ошибок технологии Ion Torrent (HOMOPOLYMER\_GAP\_PENALTY = -1, BAND\_SIZE = 32). Химерные прочтения были удалены с использованием метода «consensus» реализованного в пакете DADA2. Таксономическое определение выполнили с помощью пакета DADA2 и наивного байесовского классификатора с использованием референсной базы SILVA SSU v.132 [187].

Таблица вариантов последовательности ампликонов (ASV), таблица таксономии и метаданные были импортированы в пакет R phyloseq для последующих анализов [188]. Пакет Decontam [189] использовался для удаления контаминирующих последовательностей с параметром «combined», позволяющий вычислить контаминирующие последовательности на основе распространенности ASV и концентрации образца. Тест Краскела-Уоллиса был проведен для сравнения альфа-разнообразия при сравнении методов сбора. Для оценки снижения разнообразия после культивирования был использован тест Уилкоксона. При этом значение  $p < 0,05$  считалось статистически значимым. Оценка бета-разнообразия было проведено с использованием несходства Bray-Curtis с помощью теста перестановочного многомерного дисперсионного анализа (PERMANOVA).

### **2.1.8 Сравнительный анализ с ранее опубликованными данными по изучению микробиома Московского метрополитена**

Для сравнительного анализа микробиома были получены данные секвенирования переменного региона V4 гена 16S rRNA из ранее проведенного исследования (далее Кномикс [19]). Образцы, упомянутые в этой статье, представляли собой смывы с различных поверхностей четырех станций. Исследование было выполнено в июне 2016 г. (инвентарный номер в SRA: PRJNA495018). Принимая во внимание использование различных синтетических олигонуклеотидов и технологии секвенирования, все последовательности были нормализованы к общим координатам и общей длине. Для этого сравнения мы использовали только последовательности приходящие на переменный регион V4. При нормализации нам пришлось обрезать две последовательности из наших данных: «CCAGCAGCCGCGGTAATACGT» с 5'-конца и «GGATTAGATACCCGTGGTAGTCC» с

3'-конца. В данных Кномикс «TACGG» и «AGG» были удалены с 5'- и 3'-концов соответственно.

Таксономическую классификацию и последующие расчеты различных показателей проводили, как описано ранее за исключением использования следующих параметров шумоподавления при работе с данными Кномикс. Нормализацию проводили до глубины 2913 прочтений на образец. Для идентификации общих родов и построения графиков были использованы следующие пакеты: dplyr [190], UpSetR [191], ggplot2 [192] и ggpubr [193].

## **2.2 Анализ микробиологического разнообразия и идентификация РНК SARS-CoV-2 в условиях стационара инфекционной больницы**

### **2.2.1 Характеристика мест сбора образцов**

Образцы собирали в палатах и боксах с госпитализированными пациентами с положительным результатом ПЦР и подтвержденным диагнозом COVID-19 в отделении общей терапии (ООТ) и в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) Первой инфекционной больницы г. Москвы (Россия).

### **2.2.2 Сбор аэрозольных образцов с использованием SASS 2300/SASS 4000**

Для высокоэффективного сбора аэрозолей использовались пробоотборник SASS 2300 (Research International Inc., Монро, Вашингтон, США) с виртуальным импактором SASS 4000 с последующим концентрированием собранных частиц размером 0,5-10 мкм в стерильном растворе PBS объёмом 4,5 мл. Виртуальный импактор SASS 4000 был установлен на высоте 1,5 м от пола и 2–3 м от коек пациентов. Стерильный раствор PBS асептически заливали в пробоотборники аэрозолей непосредственно перед сбором образцов, а также использовали для промывки пробоотборника между разными точками сбора. Скорость воздушного потока составляла 4000 л/мин, время сбора – 20 минут.

Для соблюдения соответствующих нормативов шумового воздействия сбор с использованием комплекса SASS 4000/2300 осуществляли только в коридорах отделений. В палатах и боксах сбор аэрозолей осуществляли с помощью пробоотборника SASS 2300 с установленной скоростью воздушного потока 325 л/мин и продолжительностью сбора 5 минут. По умолчанию прибор промывался в течение 8 минут перед перемещением в новую точку сбора. Перед сменой отделения пробоотборник и импактор дезинфицировали путем промывки и протирания поверхностей, а также замачивания соединительных шлангов в 3% растворе гипохлорита натрия. Описание точек сбора аэрозоля приведены в Приложении №3.

### **2.2.3 Смывы с поверхности**

Образцы поверхности собирали с помощью стерильных вязких тампонов Тампон-зонд (МиниМед, Россия). Перед сбором тампон был предварительно смочен в стерильном растворе PBS, смывы проводили с площади поверхности, равной 25 см<sup>2</sup>. Объем каждого образца смыва с поверхности составил 0,5 мл. Наше внимание было сконцентрировано на поверхностях, где мог происходить непосредственный контакт пациентов и медицинского персонала: пол, тумба, оконная ручка, дверная ручка, выключатель, спинка кровати, экран телефона, простынь, кнопка вызова, ингаляционная маска, боковые поручни кровати, электроника, трубка ИВЛ, смеситель. Описание точек сбора образцов с поверхностей приведены в Приложении №4.

### **2.2.4 Транспортировка и предобработка образцов**

Все собранные образцы были незамедлительно помещены в термосумку на +4°C и транспортировались в течение 1-2 часов после сбора в лабораторию с разрешением работы с патогенными-биологическими агентами II группы согласно Санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами I-II группа патогенности (опасности)» (СП 1.3.3118-13). Полученные образцы были аликвотированы и депонированы на сохранение при -80°C.

### **2.2.5 Экстракция нуклеиновых кислот**

Для обнаружения присутствия РНК SARS-CoV-2 в образцах воздуха и смывов с поверхностей использовался коммерческий набор реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия). Этот набор обнаруживает ген *nsp1*, расположенный ближе к 5'-концу генома SARS-CoV-2. Концентрации вирусной РНК в образцах воздуха и мазков определяли с использованием собственных плазмидных контролей с известным числом копий. В соответствии с информацией производителя набора реагентов 30 Ct положительного контрольного образца соответствует концентрации 105 геномных эквивалентов вируса в мл жидкости.

ДНК экстрагировали с использованием набора DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве отрицательного контроля использовали чистые тампоны, реагенты для экстракции и стерильный раствор PBS.

### **2.2.6 Количественная ПЦР для идентификации бактериальных патогенов**

Идентификацию и количественный анализ ДНК метициллин-чувствительных и метициллин-резистентных *Staphylococcus aureus*, а также метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. проводили с использованием набора реагентов

«АмплиСенс MRSA-скрин-титр-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия) согласно инструкции производителя. Выявление *Achromobacter* spp., комплекса *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumonia* проводили согласно описанным методам [194–197].

### 2.2.7 Амплификация и секвенирование переменного региона V4 16S rRNA

Гипервариабельную область V4 бактериального гена 16S rRNA амплифицировали с использованием синтетического олигонуклеотида 515F, 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3' и синтетического олигонуклеотида 806R, 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' [198]. Библиотеки готовили с использованием набора NEBNext® Fast DNA Library Prep Set для Ion Torrent™ (New England Biolabs, Массачусетс, США) и набора IonCode (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) для баркодирования в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование ДНК проводили с использованием системы Ion S5™ XL (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США). Данные о последовательности были депонированы в SRA NCBI под номером доступа PRJNA737285.

### 2.2.8 Анализ данных секвенирования

Анализ демультиплексированных последовательностей выполняли с помощью R-пакета DADA2 версия 1.18.0 [186]. Фильтрация производилась с помощью функции filterAndTrim; чтения были обрезаны до 250 нуклеотидов и обрезаны 15 нуклеотидов с 5'-конца. Максимальное количество ожидаемых ошибок на чтение было установлено значению 2. Шумоподавление использовалось с некоторыми дополнениями, чтобы соответствовать односторонним чтениям и с учетом ошибок технологии Ion Torrent (НОМОPOLYMER\_GAP\_PENALTY = -1, BAND\_SIZE = 32). Химерные прочтения были удалены с использованием метода «consensus» реализованный в пакете DADA2. Таксономическое отнесение выполняли с помощью пакета DADA2 и метода наивного байесовского классификатора с использованием базы SILVA SSU v.132 [187].

Таблица вариантов последовательности ампликонов (ASV), таблица таксономии и метаданные были импортированы в пакет R phyloseq для последующих анализов [188]. Пакет Decontam [189] использовался для удаления контаминирующих последовательностей с параметром «combined», позволяющий вычислять контаминирующие последовательности на основе распространенности ASV и концентрации образца.

Анализ альфа-разнообразия проводили с использованием индекса Chao1 и Shannon. Матрица несходства Bray-Curtis была упорядочена с использованием PCoA. Тесты PERMANOVA проводились с использованием функции adonis2 в пакете R vegan версия 2.5.7 [199] для образцов, относящихся к разным отделениям и типу поверхностей.

Для оценки наиболее важных признаков (родов) для корректного отнесения выборок был выполнен анализ с использованием Random Forest (R пакет randomForest, версия 4.6.14 [200]) с построением 10001 дерева и использованием родов в качестве классификатора. Все ASV были объединены на уровне рода. Перед выполнением нормализации с использованием Z-оценки были удалены ASV с распространенностью <20% и общей численностью <50. Наиболее важные рода микроорганизмов для правильного определения отделений были выявлены с помощью среднего снижения точности модели (MDA).

### **2.2.9 Использование материалов пациентов**

Исследование одобрено локальным этическим комитетом Первой Московской инфекционной больницы Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия (протокол № 2/Б, дата утверждения: 20 мая 2020 г.). От всех участников было получено письменное информированное согласие.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1 Состав биоаэрозоля и поверхностей общественных мест: исследование в Московском метрополитене

В данном разделе диссертации представлены результаты поиска оптимальных методов сбора биоаэрозоля, оценка вклада переменных регионов для оценки разнообразия, а также данные по анализу микробиома некоторых станций Московского метрополитена. В рамках исследований по данному разделу были исследованы как биоаэрозоль, так и поверхности в вестибюле двух станций Московского метрополитена – Новокосино и Черкизовская. Для исследования были выбраны станции, контрастные по параметрам продолжительности их эксплуатации и суточного пассажиропотока (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика некоторых показателей исследуемых станций. Данные представлены на год сбора образцов (2017).

| Станция  | Новокосино  | Черкизовская   |
|--|-------------|----------------|
| Название линии   | Калининская | Сокольническая |
| Год ввода в эксплуатацию   | 2012        | 1990           |
| Глубина залегания, м   | 9           | 11             |
| Пассажиропоток, человек/сутки  | 76000       | 24000          |
| Количество пересекающихся линий, включая Московское центральное кольцо | 6           | 10             |
| Население района, тыс.чел  | 107,9       | 91,5           |
| Площадь района, км <sup>2</sup>  | 3,60        | 5,614          |
| Плотность населения, человек/м <sup>2</sup>                            | 29974,17    | 16299,07       |
| Стоимость жилья, тыс.руб/м <sup>2</sup>                                | 137,84      | 191,72         |

Нами был изучен состав микробиома в зависимости от типа образца (аэрозоль воздуха или поверхность), метода и времени сбора (в отношении аэрозоля воздуха), разнообразие без проведения дополнительного культивирования и после высевов собранных образцов на богатых питательных средах. Использование комбинации подходов, включая секвенирование переменных регионов гена 16S rRNA с классическими методами микробиологии позволили охарактеризовать свойства микробиомов и провести оценку их резистентности к антибактериальным препаратам.

### 3.1.1 Сравнительная характеристика способов сбора биоаэрозоля для изучения состава микробиома

Одним из важных факторов при изучении разнообразия микробиома биоаэрозоля является надежность и точность определения его состава. Это обуславливает важность использования пробоотборников воздуха с четко определенными характеристиками, позволяющими проводить репрезентативный сбор образцов. Учитывая необходимость сбора достаточного количества биомассы в короткие интервалы времени были выбраны высокопроизводительные аэрозольные пробоотборники. Необходимыми свойствами обладает аэрозольный пробоотборник типа циклон, состоящий из виртуального импактора SASS4000 и циклонного коллектора SASS2300 (SASS, Research International Inc., США) – метод Cyclone-SASS. В качестве прибора сравнения был выбран пробоотборник из аналогичной системы Циклон-Био (Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Россия) – метод Cyclone-MEPhI. Дополнительно данным пробоотборникам был добавлен третий метод – сбор аэрозоля с использованием нейлоновых нанофильтров – метод Nano. В качестве контрольного метода были использованы смывы с поверхностей – Swab. Основные технические характеристики используемых аэрозольных пробоотборников представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительная характеристика аэрозольных пробоотборников, используемых в данной работе.

| Характеристика                                     | Cyclone-SASS   | Cyclone-MEPhI  | Nano  |
|--|--|--|---|
| Производитель                                      | SASS, Research International Inc., США   | Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Россия      | Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, Россия |
| Название приборов                                  | SASS2300+SASS4000  | Циклон-Био   | Нейлоновые нанофильтры  |
| Принцип сбора                                      | Сепарация и концентрирование аэрозольных частиц в виртуальном импакторе; осаждение аэрозольных частиц путем импакции в циклонном коллекторе с жидкой фазой |  | Оседание частиц на фильтре  |
| Скорость первичного воздушного потока, л/мин       | 4000   | 4500   | Воздушный поток создается бытовым пылесосом   |
| Скорость вторичного воздушного потока, л/мин       | 300  | 325  | -   |
| Эффективность сбора аэрозольных частиц, не менее % | При скорости 4000 л/мин – 20%<br>При скорости 300 л/мин – 50%<br>[182]   | При скорости 4000 л/мин – 20%<br>При скорости 325 л/мин – 60%<br>[183] | Около 95 [201]  |

|                                     |     |     |     |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|
| Жидкость для сбора образца          | PBS | PBS | PBS |
| Объем жидкой пробы, см <sup>3</sup> | 4-6 | 5   | 5   |

Ранее испытание пробоотборников Cyclone-SASS и Cyclone-MERPhI было проведено в лабораторных условиях, с использованием аэрозольных камер на базе ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России (Сергиев Посад, Россия) и на базе ФГБУ НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи Минздрава России (Москва, Россия). Данная часть работы была выполнена сотрудниками данных организаций под руководством к.б.н В.А. Гущина, к.б.н А.П. Ткачука, к.б.н Б.И. Вердиева и д.ф.-м.н А.А. Чистякова [183]. Вкратце, испытания в ФГБУ 48 ЦНИИ Минобороны России проводили с использованием модельного сухого тест-препарата. При проведении испытаний импактор устройства размещали внутри аэрозольной камеры. Циклонный коллектор, соединенный воздухопроводом с импактором размещали вне камеры. Контроль интегральной концентрации и дисперсного состава аэрозоля, определение его массы в сорбирующих жидкостях проводили флуоресцентным и хемилюминесцентным методами. Оценку эффективности исследуемых пробоотборников проводили относительно контрольного метода сбора аэрозоля пробоотборником КПК-3. С помощью импульсно-пневматического аппарата в статической камере создавали аэрозоль модельного сухого тест-препарата. С помощью прибора КПК-3 и четырех-каскадного импактора Мея оценивали интегральную массовую концентрацию аэрозоля и его дисперсный состав. По результатам проведенных испытаний, пробоотборник Cyclone-MERPhI обеспечивал эффективность концентрирования до 20% по массе при объемной скорости более 4000 л/мин и до 61% по массе при объемной скорости более 300 л/мин. Размер селективируемых аэрозольных частиц находился в диапазоне 0,5–5 мкм. Проведенные сравнительные испытания пробоотборников Cyclone-SASS и Cyclone-MERPhI с использованием жидких тест-препаратов на базе ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи не выявил статистически значимых отличий в эффективности сбора [183]. По результатам испытаний в лабораторных условиях с использованием аэрозольной камеры был продемонстрирован идентичный результат работы двух пробоотборников циклонного типа.

Тем не менее, полевая эффективность сбора биоаэрозоля данными пробоотборниками может значительно отличаться от параметров сбора в лаборатории, а, следовательно, ее следовало оценить для дальнейшего решения задач по изучению состава микробиома. Для этого нами была спланирована и осуществлена отдельная серия полевых экспериментов, в которой к рассмотренным ранее пробоотборникам были добавлены еще два метода сбора образцов: нанопористые фильтры для сбора биоаэрозоля, а также смывы с поверхностей.

Целесообразность включения данных методов сбора было обусловлено следующими факторами. Во-первых, по литературным данным, сбор образцов на нанофильтры продемонстрировал высокую эффективность при выявлении биомаркеров загрязнения помещения (на примере внутрибольничных инфекций), содержащихся в воздухе в следовом количестве (не менее 3 копий гена *Mycobacterium tuberculosis* на один м<sup>3</sup> воздуха) [202]. К тому же, данный метод представляет повышенный интерес, поскольку прост в реализации и не требует дорогостоящего пробоотборника. Концептуальное отличие от приведенного примера использования нанофильтров в условиях стационара заключалось в использовании в ходе работы нерастворимых нанофильтров из нейлона, ввиду возможного преждевременного повреждения фильтров из-за влажности воздуха в метрополитене. Во-вторых, сбор образцов с поверхностей с использованием свабов является часто используемым методом сбора при исследовании микробиомов окружающей среды. Сбор с поверхностей является простым методом, его можно стандартизировать и использовать в качестве универсального метода сбора. Данный метод в работе был использован в качестве контрольного стандартного метода, прежде всего, подходящего для оценки микробиологического разнообразия агентов, концентрирующихся на поверхности.

Сбор образцов тремя аэрозольными пробоотборниками (Cyclone-SASS, Cyclone-MEPhI, Nano), а также смывы с поверхностей (Swab) были проведены в вестибюле двух контрастных по уровню пассажиропотока станциях метрополитена, Новокосино (76 000 пасс./сут.) и Черкизовская (24 000 пасс./сут.). Имеющиеся различия по загруженности станций позволяют оценить эффективность сбора биоаэрозоля при его различных концентрациях. Кроме того, проведенный последовательный сбор образцов в период с 6:00-6:45 (до пиковая нагрузка) и с 8:00-8:45 (непосредственно во время пиковой нагрузки) позволяет охарактеризовать динамические изменения состава микроорганизмов. Всего было собрано 48 образцов (6 временных точек × 4 метода сбора × 2 станции). Для сравнения различных методов сбора и непосредственной характеристики станций Московского метрополитена были использованы различные молекулярно-генетические и микробиологические методы.

#### 3.1.1.1 Сравнительная характеристика методов сбора для анализа состава микробиома

В качестве метода оценки бактериального разнообразия было выбрано суммарное определение копийности фрагмента V3-V4 гена 16S rRNA в исследуемых образцах. Для это был использован метод ПЦР в реальном времени. Выбор данного метода был обусловлен высокой чувствительностью и, в отличие от методов на основе флуоресценции, позволил оценить не общую биомассу, а целенаправленно 16S rRNA содержащие микроорганизмы (бактерии и археи). Полученные значения копийности фрагмента V3-V4 гена 16S rRNA были переведены на единицу собранного воздуха. В результате мы не обнаружили статистически

значимых различий между образцами, собранных высокопроизводительными пробоотборниками Cyclone-SASS и Cyclone-MEPhI ( $p = 0,67$ ). Полученные результаты согласуются с ранее проведенными испытаниями в аэрозольной камере [183]. Метод сбора аэрозоля Nano продемонстрировал сбор меньшего количества бактерий и статистически достоверно отличался от Cyclone-SASS ( $p = 0,0059$ ) и Cyclone-MEPhI ( $p = 0,021$ ) (Рисунок 13).

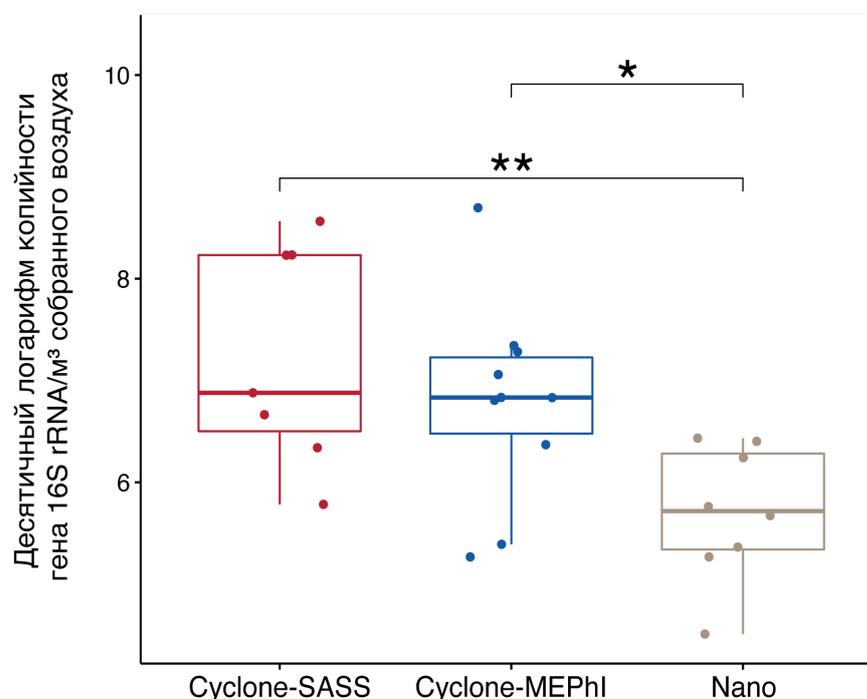


Рисунок 13 – Копийность гена 16S rRNA, нормализованная на один метр кубический собранного воздуха, в зависимости от метода сбора аэрозоля. Шкала копийности переведена в десятичный логарифм. Тест Краскела-Уоллиса был проведен для сравнения альфа-разнообразия. Количество звездочек (\*) обозначает достоверные отличия (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ).

Стоит отметить, что системы для сбора биоаэрозоля Cyclone-SASS и Cyclone-MEPhI схожи по принципу работы, но не идентичны. Большая скорость воздушного потока (4500 л/мин против 4000 л/мин у Cyclone-SASS) не приводила к увеличению показателя копийности гена 16S rRNA в исследуемых образцах, что может означать сбор сопоставимого количества бактерий. Кроме того, по результатам испытаний, проведенных в аэрозольной камере, эффективность сбора методом Cyclone-MEPhI по сравнению с Cyclone-SASS составила 96%. Это позволяет выдвинуть предположение о сопоставимости получаемых результатов при сборе обоими методами [183]. В проведенном исследовании наименьший выход бактериальной ДНК среди аэрозольных пробоотборников был отмечен для способа Nano, медианное значение при этом составило 5,72 Log<sub>10</sub> копий 16S/м<sup>3</sup>, что, как минимум, на порядок ниже.

Кроме общей копийности гена 16S rRNA важным параметром является разнообразие и представленность (равномерность) различных бактериальных видов в собранных образцах. Для проверки различий на уровне видового состава нами были использованы данные секвенирования семи вариабельных регионов гена 16S rRNA (V2, V3, V4, V6, V7, V8 и V9). Так же, разнообразие оценивалось на поверхностях, для этого был добавлен метод смыва с поверхностей (Swab). В качестве метрики разнообразия были использованы индексы альфа-разнообразия Chao1 и Shannon. Индекс Chao1 позволяет оценить, насколько таксономически разнообразным (богатым) является исследуемый образец, в то время, как индекс Shannon учитывает количество видов в образце (богатство) и их относительную численность (равномерность).

Индекс Chao1 (Рисунок 14) независимо от станции был значительно выше для аэрозоля по сравнению с поверхностью.

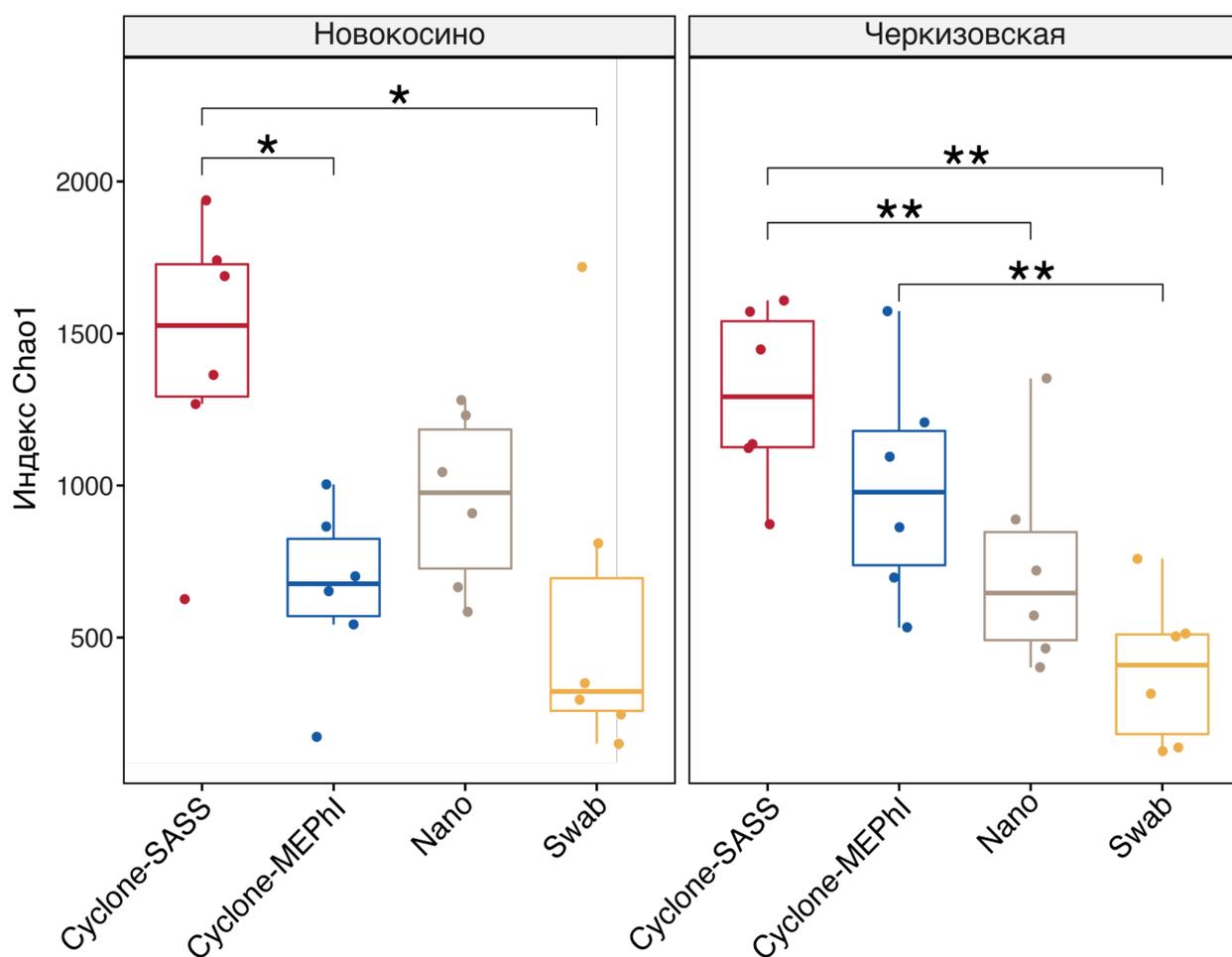


Рисунок 14 - Сравнение индекса альфа-разнообразия Chao1 в зависимости от метода сбора и станции. Диаграмма размаха со средней линией обозначают медиану, прямоугольник обозначает межквартильный размах (IQR) и диапазоны 1,5 IQR (усы). Тест Краскела-Уоллиса был проведен для сравнения альфа-разнообразия. Количество звездочек (\*) обозначает достоверные отличия (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ).

Среди методов сбора, аэрозольный пробоотборник Cyclone-SASS статистически достоверно отличался от других методов. Исключение составили образцы, собранные методом Nano на станции Новокосино ( $p = 0,065$ ) и образцы Cyclone-MEPHl на станции Черкизовская ( $p = 0,18$ ). Еще одно статистически достоверное различие было выявлено на станции Черкизовская между образцами Cyclone-MEPHl и Swab ( $p = 0,0087$ ). Таким образом, способ сбора образцов аэрозоля в существенной степени влияет на разнообразие микроорганизмов.

Оценка индекса Shannon (Рисунок 15) продемонстрировала его высокое значение во всех образцах (за исключением смыва с поверхности на станции Черкизовская), что свидетельствует не только о высоком разнообразии, но и высокой представленности микроорганизмов в образцах. Это позволяет рассчитывать на то что используемый подход позволяет уверенно выявлять основные компоненты микробиома.

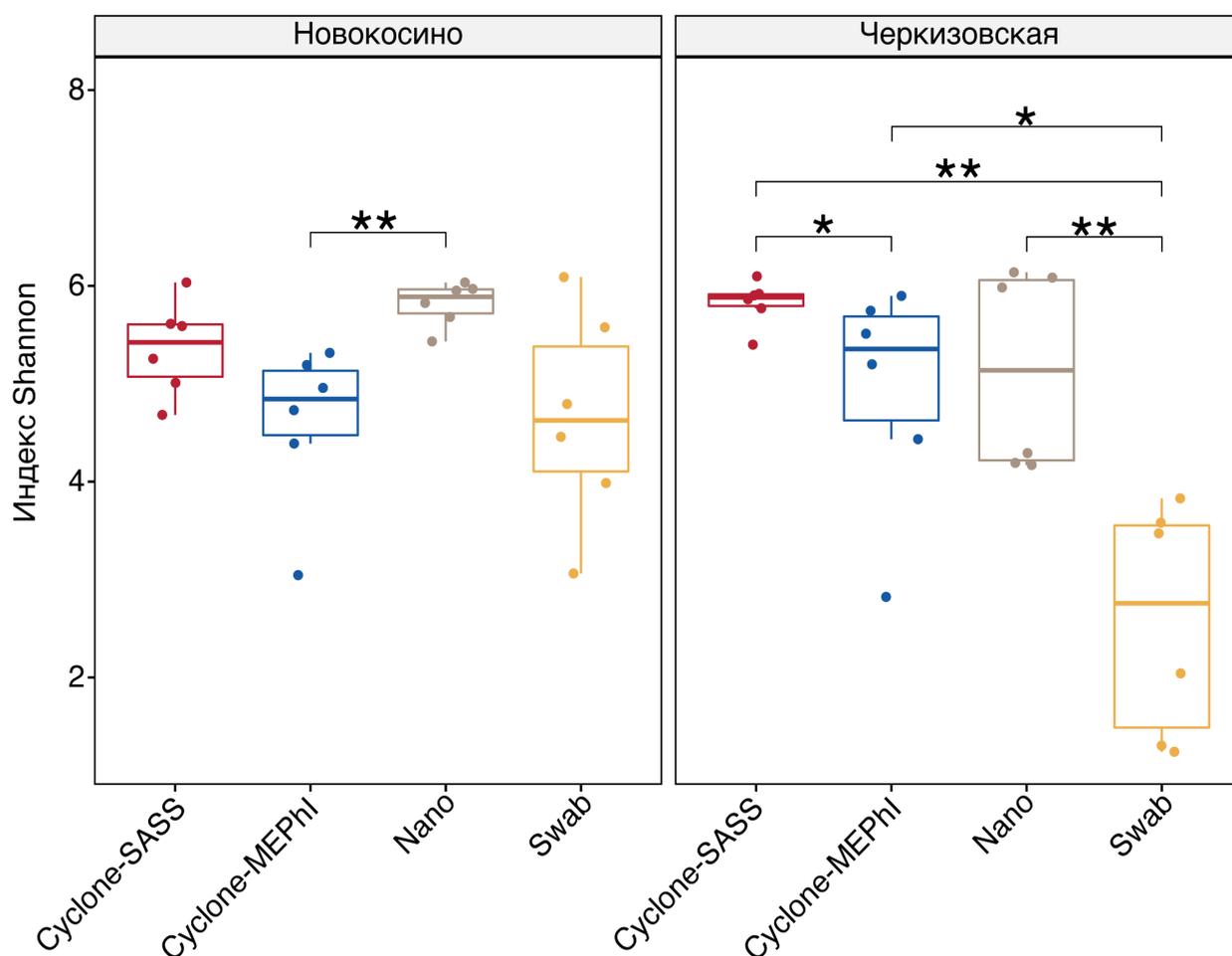


Рисунок 15 – Сравнение индекса альфа-разнообразия Shannon в зависимости от метода сбора и станции. Диаграмма размаха со средней линией обозначают медиану, прямоугольник обозначает межквартильный размах (IQR) и диапазоны 1,5 IQR (усы). Тест Краскела-Уоллиса был проведен для сравнения альфа-разнообразия. Количество звездочек (\*) обозначает достоверные отличия (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p \leq 0,01$ ).

На станции Новокосино единственное статистически достоверное отличие было выявлено между методами Cyclone-MERPhI и Nano ( $p = 0,0022$ ). Несмотря на практически схожий разброс индекса Chao1 для образцов с поверхностей двух станций, мы наблюдаем меньшее значение индекса Shannon на станции Черкизовская, что свидетельствует о наличии доминирующих бактерий на поверхности. На станции Черкизовская мы наблюдали статистически достоверные отличия между образцами, собранными аэрозольными пробоотборниками Cyclone-SASS, Cyclone-MERPhI и Nano по сравнению с поверхностью ( $p = 0,002$ ;  $0,015$  и  $0,0022$ , соответственно). Достоверных отличий между аэрозольными пробоотборниками Cyclone-MERPhI и Nano выявлено не было. Более низкое разнообразие образцов, собранных с использованием метода Cyclone-MERPhI, может объясняться неоптимальным местом его установки (расположение от других аэрозольных пробоотборников, высота установки импактора, скорость воздушного потока).

Как было показано ранее, использование наночистот продемонстрировало свою эффективность при сборе образцов в условиях туберкулезного диспансера [202]. Сбор в метрополитене, в условиях повышенной концентрации аэрозольных частиц, также продемонстрировал высокий результат при оценке индекса Shannon. В то же время, по сравнению с высокопроизводительным аэрозольным пробоотборником Cyclone-SASS, Nano позволял собирать в 1,5-3 раза меньше от потенциального разнообразия. Возможными причинами, объясняющими полученный результат, является неподходящая скорость воздушного потока, недостаточная емкость самих фильтров и низкая эффективность смыва микроорганизмов с поверхностей фильтра.

### **3.1.1.2 Исследование разнообразия культивируемого микробиома Московского метрополитена**

Способность сохранения жизнеспособности микроорганизмов при сборе образцов имеет важное значение, так как напрямую определяет возможности дальнейшего фенотипического скрининга, в том числе и оценки устойчивости к антибактериальным препаратам. Также необходимость использования методов классической микробиологии определяется возможностью характеристики представленности культивируемого микробиома и описания новых микроорганизмов, что позволит расширить наши представления о функциях микробиома и улучшить имеющиеся таксономические базы данных.

Для решения задачи по оценке разнообразия культивируемого микробиома, которая была прежде всего направлена на идентификацию бактериального разнообразия, были использованы плотные агаризованные питательные среды с широким трофическим потенциалом. Для выделения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов использовали универсальные питательные среды (колумбийский агар с дефибрированной

кровью и LB-агар). Помимо универсальных сред были использованы селективные и дифференциально-диагностические питательные среды, позволяющие выделить представителей родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, семейства *Enterobacteriaceae*, а также мицелиальные грибы и дрожжи (Среда Байрда-Паркера, среда Эндо, среда Энтерококк-агар, среда Сабуро с декстрозой и хлорамфениколом). Данная часть работы была проведена совместно с к.б.н. Р.С.Овчинниковым. Типирование микроорганизмов с использованием системы MALDI-TOF масс-спектрометрии было выполнено в лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (руководитель лаборатории к.м.н В.Г.Жуховицкий).

Микробиологический анализ был проведен для всех 48 собранных образцов (6 точек × 4 метода сбора × 2 станции), а также для 16 отрицательных контролей (2 контроля для каждого временного периода × 4 метода сбора × 2 станции). Для каждого образца выявляли характерные морфотипы (МТ). В подавляющем количестве проб, собранных на станции Новокосино, наибольшее количество морфотипов высевалось из образцов, собранных системой сбора аэрозоля Cyclone-SASS. В пробах, собранных в момент пиковой нагрузки (в период с 8:30-8:45) методами Cyclone-SASS и Cyclone-MERPhI состав выделяемых микроорганизмов был примерно одинаковый (Рисунок 16).

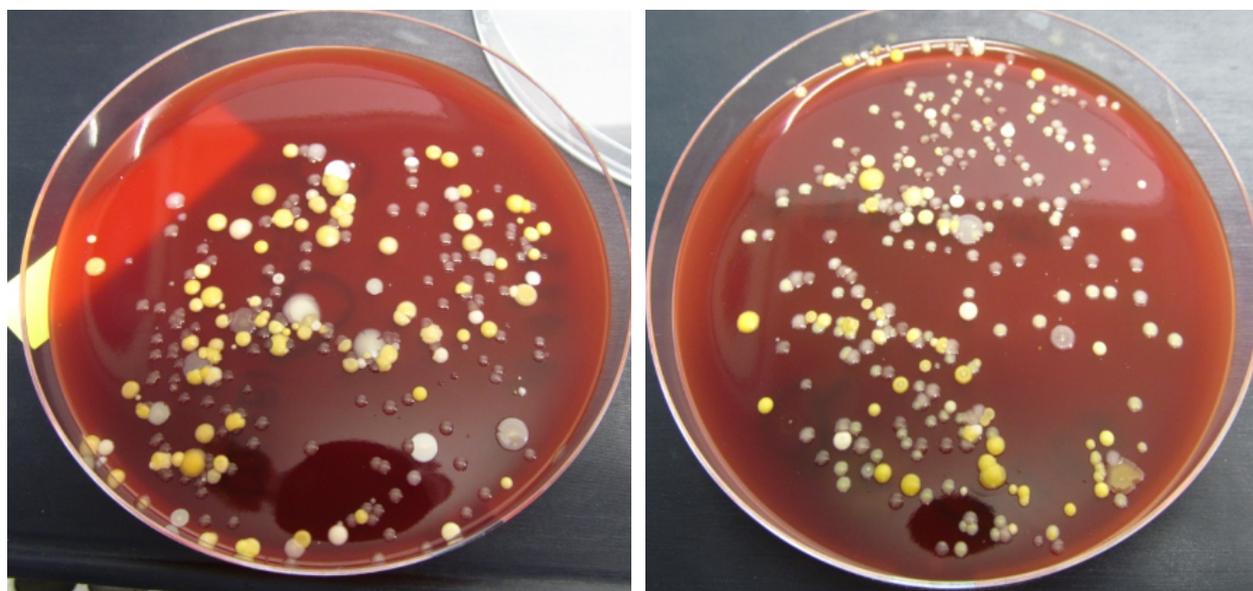


Рисунок 16 – Суточный посев на кровяном агаре образцов, собранных на станции Новокосино во время пиковой нагрузки (период с 8:30-8:45). Слева – образец собранный методом Cyclone-SASS; справа – образец собранный методом Cyclone-MERPhI.

В пробах, собранных на станции Черкизовская, количество морфотипов и общее количество КОЕ были выше в образцах, собранных системой Cyclone-MERPhI, что стало заметно в момент пиковой нагрузки на станции (в период с 8:30-8:45) (Рисунок 17).

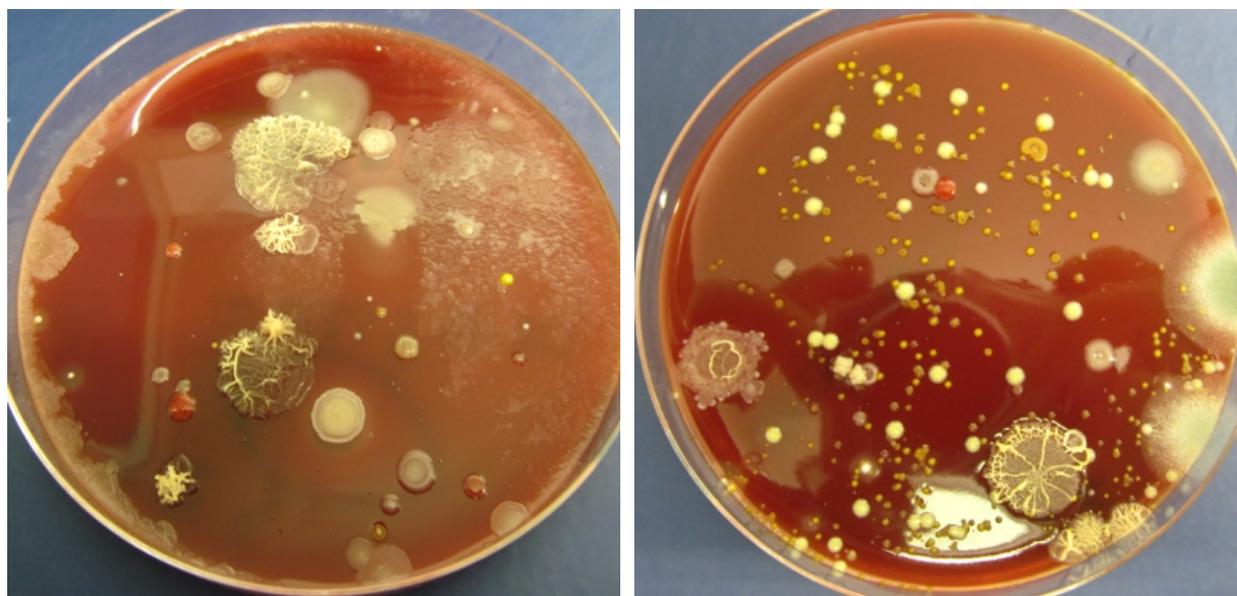


Рисунок 17 – Суточный посев на кровяном агаре образцов, собранных на станции Черкизовская во время пиковой нагрузки (период с 8:30-8:45). Слева – образец собранный методом Cyclone-SASS; справа – образец собранный методом Cyclone-MERPhI.

В результате микробиологического анализа всех образцов вне зависимости от метода и места сбора были выделены в чистую культуру 48 различных морфотипов. Последующее их типирование с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии позволило определить 19 различных видов микроорганизмов относящихся к 15 родам включая: *Staphylococcus* sp. (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*), *Aspergillus* sp. (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*), *Ralstonia* sp. (*Ralstonia pickettii*), *Micrococcus* sp. (*Micrococcus luteus*), *Brevundimonas* sp. (*Brevundimonas diminuta*), *Aerococcus* sp. (*Aerococcus viridans*), *Acinetobacter* sp. (*Acinetobacter schindleri*), *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas stutzeri*), *Kocuria* sp. (*Kocuria rosea*), *Bacillus* sp. (*Bacillus idriensis*), *Cupriavidus* sp. (*Cupriavidus metallidurans*), *Paracoccus* sp. (*Paracoccus yeei*), *Paenibacillus* sp. (*Paenibacillus glucanolyticus*), *Mucor* sp. (*Mucor spp.*), *Stenotrophomonas* sp. (*Stenotrophomonas rhizophila*). Результаты типирования для различных способов сбора на двух станциях приведены на Рисунке 18.

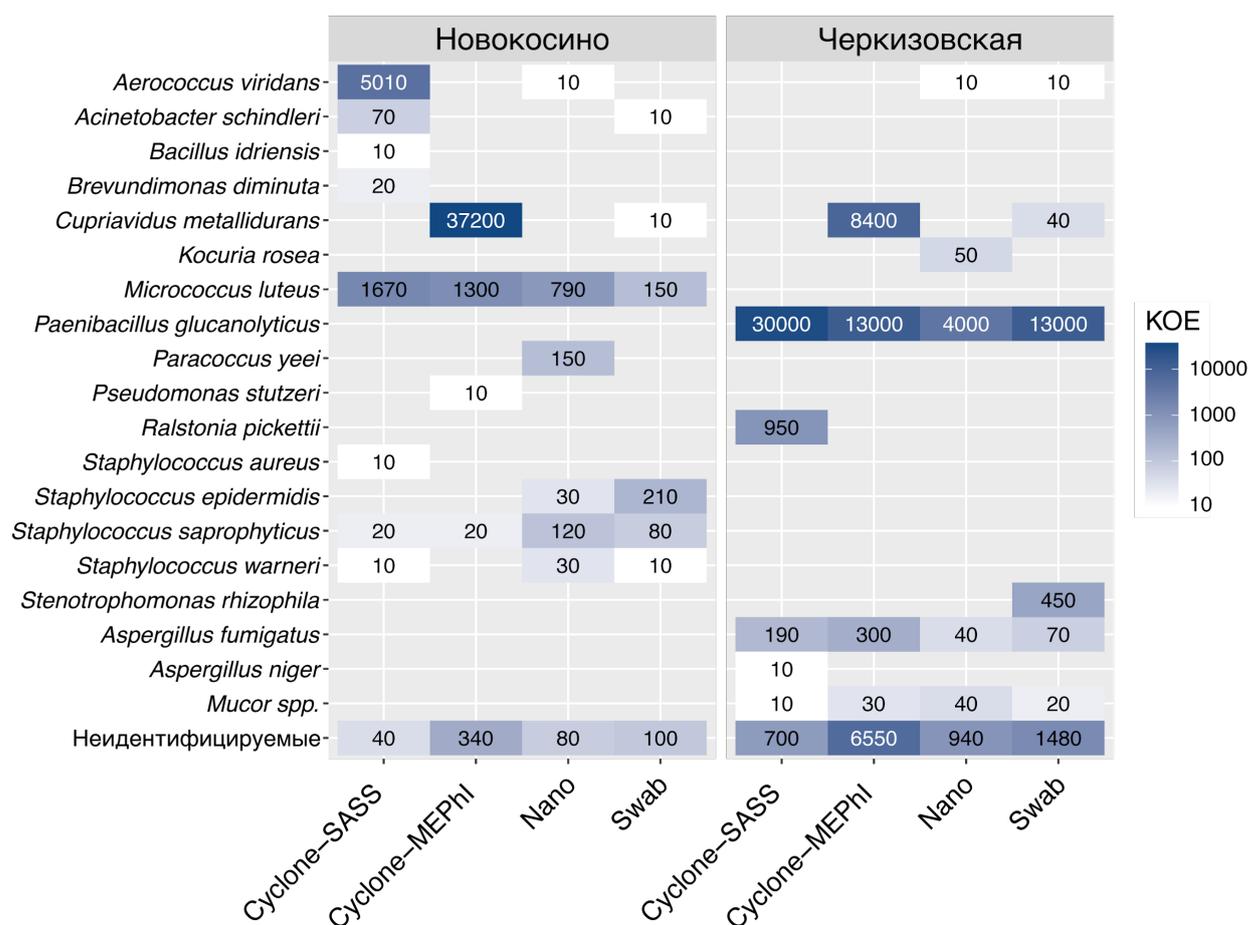


Рисунок 18 – Сравнение профилей микроорганизмов, идентифицированных в культивируемом микробиоме образцов. Тепловая карта представленности микроорганизмов в зависимости от станции и метода сбора. Числовое значение означает абсолютное значение КОЕ.

Нами были отмечены имеющиеся различия в культивируемом микробиоме в зависимости от станции и типа образца (аэрозоль/поверхность). Культивируемый микробиом станции Новокосино был представлен комменсальными и условно-патогенными микроорганизмами (различные виды *Staphylococcus*, *Micrococcus luteus*, *Aerococcus viridans* и другие), в тоже время станция Черкизовская характеризовалась меньшим количеством комменсальных видов и преобладанием почвенных микроорганизмов и грибов (*Paenibacillus glucanolyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* и *Mucor spp.*). Мы также отмечаем долю неидентифицируемых микроорганизмов культивируемого микробиома, которая составила 9% на станции Новокосино и 37% на Черкизовской (540 КОЕ и 4730 КОЕ соответственно). Дальнейшее изучение данных микроорганизмов с секвенированием их геномов позволит расширить представление о «темной материи» и дополнить имеющиеся таксономические базы, что в свою очередь позволит увеличить разрешающую способность подходов на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Сравнение образцов в зависимости от типа сбора свидетельствует о существенном пересечении состава микроорганизмов в аэрозоле и на поверхностях. При этом единственный вид бактерии *Stenotrophomonas rhizophila* встречался только в образцах, собранных с поверхности. В свою очередь, восемь видов микроорганизмов (*Bacillus idriensis*, *Brevundimonas diminuta*, *Micrococcus luteus*, *Paracoccus yeei*, *Pseudomonas stutzeri*, *Ralstonia pickettii*, *Staphylococcus aureus* и *Aspergillus niger*) были выявлены только в составе аэрозоля, но не на поверхностях (Рисунок 19).

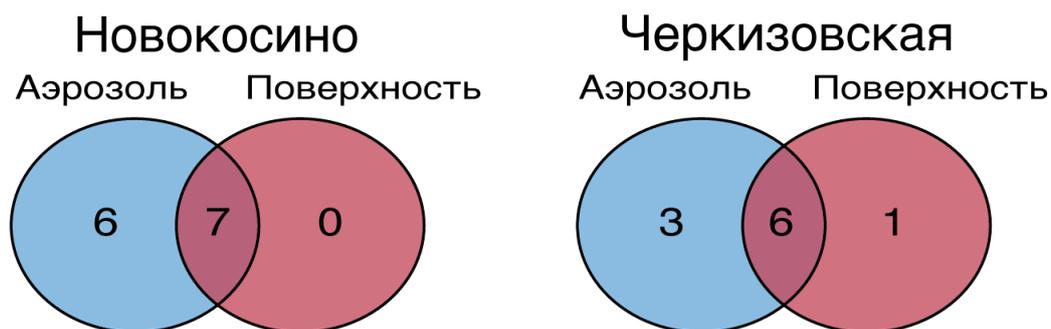


Рисунок 19 - Сравнение количества микроорганизмов, идентифицированных в культивируемом микробиоме в зависимости от типа образца. Диаграмма Венна была построена независимо для каждой станции. Числовые значения указывают на количество уникальных и общих видов.

Так же был изучен вклад каждого метода сбора в описанные выше результаты. На основе сбора образцов на двух станциях наибольшее количество видов было идентифицировано в составе образцов, собираемых Cyclone-SASS, Swab и Nano, позволив идентифицировать 13, 12, 11 видов микроорганизмов соответственно. Наименьшее количество видов в культивируемом микробиоме было для Cyclone-MERPhI – 8 из 19 микроорганизмов. При этом ряд микроорганизмов был идентифицирован независимо от метода сбора образца. Он включает *Paenibacillus glucanolyticus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas stutzeri*, *Aspergillus fumigatus* и *Mucor* sp. В то же время, для ряда методов сбора мы также отмечали микроорганизмы, которые были собраны только одним методом, например, для метода Cyclone-SASS это были виды *Bacillus idriensis*, *Brevundimonas diminuta*, *Ralstonia pickettii*, *Staphylococcus aureus*; для Nano – *Paracoccus yeei* и *Kocuria rosea*; для Swab – *Stenotrophomonas rhizophila*. Полученные «уникальные» виды в зависимости от метода сбора не следует рассматривать как селективный отбор тех или иных бактерий. Отличия в выявлении отдельных видов может быть обусловлено несколькими факторами. Во-первых, биоаэрозоль в потоке людей не является гомогенным по составу; во-вторых, места установки приборов в одной зоне не гарантирует полностью идентичные условия для сбора.

### **3.1.1.3 Выявление микроорганизмов, в составе микробиома метрополитена, обладающих устойчивостью к антимикробным препаратам**

Одной из проблем современного здравоохранения является распространение среди микроорганизмов устойчивости к антибиотикам. Факторы, определяющие устойчивость к антибиотикам, как правило, кодируются генетическими элементами, способными к передаче между микроорганизмами в едином сообществе.

Одним из объектов исследования для оценки распространенности устойчивости к антибиотикам в городах являются образцы сточных вод [157]. Их анализ позволяет получить усредненную выборку по целому городу в любое время года. Однако, циркулирующие в таком микробном сообществе, факторы устойчивости будут в большей степени характерны для бактерий, населяющих ЖКТ. Поскольку люди в городских условиях большую часть времени проводят в замкнутых пространствах, изучение распространения резистентных микроорганизмов, находящихся в аэрозоле воздуха, становится актуальной задачей, так как позволяет оценивать профиль резистентности в составе биоаэрозоля, напрямую контактирующего с органами дыхания. Стоит отметить, что большинство работ по оценке распространения генов антибиотикоустойчивости использовали метод полногеномного секвенирования [203–205]. Данный подход безусловно является эффективным и позволяет выявить генетические детерминанты устойчивости к различным препаратам. Главной проблемой, препятствующей дальнейшему внедрения NGS в область определения резистентности, является 1) отсутствие понимания всех генетических факторов, обуславливающих данный процесс и 2) наличие SNP в генах обусловивших устойчивость играют немаловажную роль. В свою очередь, комбинация методов фенотипического типирования устойчивости с определением последовательности генома позволяет получить более четкое представление о механизмах формирования резистентности, а также усовершенствовать алгоритмы предсказания профиля устойчивости микроорганизмов по результатам полногеномного секвенирования.

В связи с этим, нами была поставлена задача изучить, насколько часто устойчивость к антибиотикам встречается в сообществе микроорганизмов, собранных в Московском метрополитене. Для оценки профиля антибиотикорезистентности (АБР) было использовано два подхода.

Первый подход заключался в прямом посеве микроорганизмов в составе собранного образца на плотной питательной среде Мюллера-Хинтона, содержащей лабораторные антибиотики различных классов (тетрациклин, стрептомицин, ампициллин, канамицин, хлорамфеникол, гентамицин). Выросшие колонии были количественно оценены и типированы с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии. Это позволило нам провести оценку

культивируемого резистома. Культивируемый резистом станции Новокосино был довольно скудным (Рисунок 20). Был выявлен вид *Micrococcus luteus*, устойчивый к стрептомицину и хлорамфениколу. Станция Черкизовская характеризовалась более разнообразным профилем микроорганизмов, проявивших множественную резистентность к различным классам препаратов. Отмечена широкая распространенность устойчивости среди представителей рода *Paenibacillus*.

Большее количество резистентных к антибиотикам изолятов выявили в аэрозоле воздуха (17 из 19 идентифицированных видов). В одном образце были выделены два резистентных изолята: *Sphingobacterium mizutaii* (устойчивый к гентамицину) и *Paenibacillus cookii* (устойчивый к тетрациклину). Большинство видов бактерий были устойчивы к двум антибиотикам (стрептомицину и канамицину). Обнаруженные микроорганизмы являются симбионтами человека, а их патогенный потенциал минимален. Так, в случае с *Paenibacillus* sp. были зафиксированы единичные случаи заражения людей с ослабленным иммунитетом [206,207]. Тем не менее присутствие микроорганизмов с устойчивостью может быть резервуаром для передачи генов другим видам и усугубления проблемы распространения устойчивости среди населения.

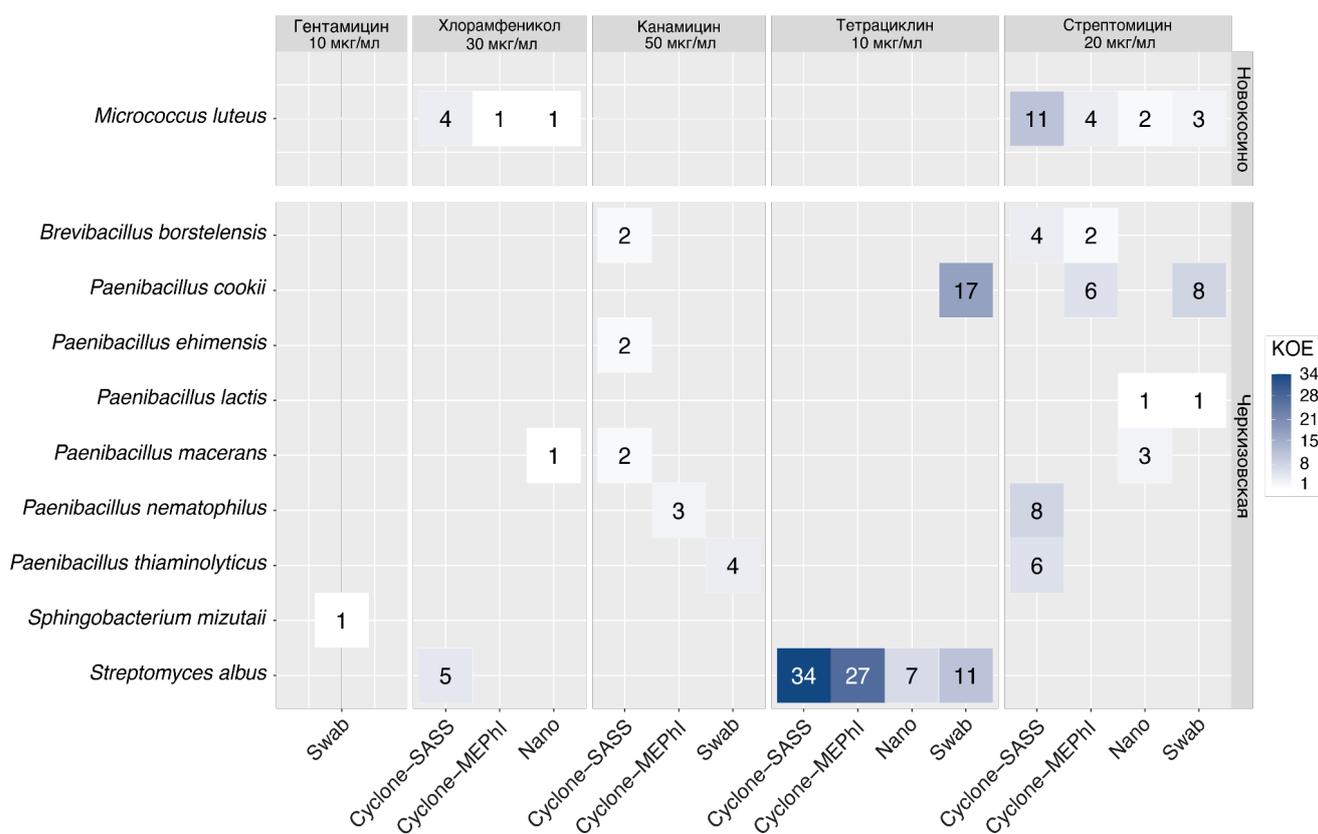


Рисунок 20 – Тепловая карта определения антибиотикоустойчивости методом прямого посева. Цифрами обозначены КОЕ.

Для реализации второго подхода изучали спектр устойчивости к клинически значимым антибиотикам в отношении микроорганизмов с известным патогенным потенциалом. Для

этого, обнаруженные в культивируемом микробиоме представители рода *Staphylococcus* spp., в том числе и *Staphylococcus aureus* и *Aerococcus viridans* были изолированы и для них определили резистентность к различным группам препаратов (макролидам, фторхинолонам, пенициллинам) (Рисунок 21). Эти виды вызывают наибольшую озабоченность ввиду их широкого патогенного потенциала и по литературным данным обладают устойчивостью к антимикробным препаратам [208].

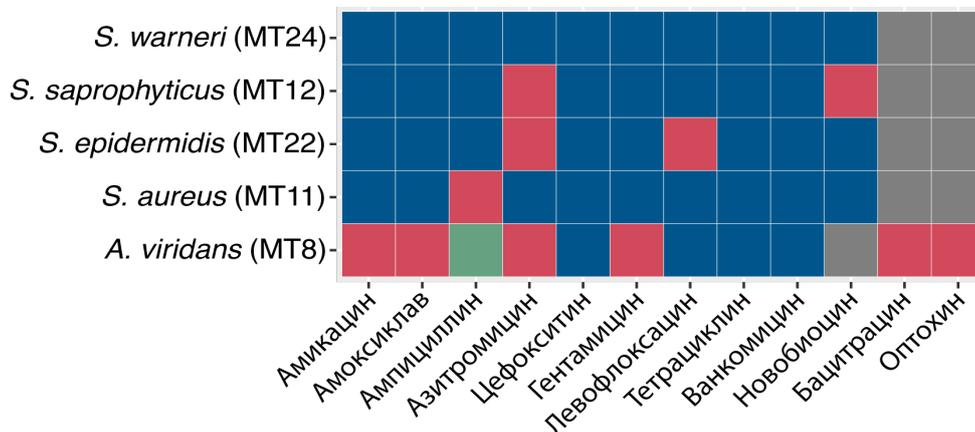


Рисунок 21 – Тепловая карта определения антибиотикоустойчивости потенциально патогенных микроорганизмов. Цветом обозначена устойчивость: красным – проявивший устойчивость, зеленым – умеренно чувствительный, синими – чувствительный, серым – исследование с данным антибиотиком не проводилось.

В результате была показана широкая резистентность изолята *Aerococcus viridans*, который был устойчив к защищенным бета-лактамам (амоксиклаву), макролидам (азитромицину), к аминогликозидам (гентамицину и амикацину), а также к полипептидному антибиотику бацитрацину. Устойчивость стафилококков проявлялась к значительно меньшему количеству препаратов. Так *Staphylococcus aureus* был устойчив только к ампициллину. Устойчивость к левифлоксацину продемонстрировал *Staphylococcus epidermidis*, устойчивость к новобиоцину *Staphylococcus saprophyticus*. Последние два изолята также были резистенты к азитромицину. Изолят *Staphylococcus warneri* был чувствителен ко всем исследуемым антибиотикам. Фотографии исходных морфотипов и результаты оценки устойчивости к антибиотикам представлены в Приложении №2.

Таким образом, в ходе проведенных исследований, направленных на изучение антибиотикорезистентности в образцах окружающей среды, мы идентифицировали различные виды бактерий, обладающие устойчивостью к различным группам антибактериальных препаратов, в том числе препаратов, входящих в список жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов (ЖНВЛП): азитромицин, амикацин, амоксилав (амксициллин + клавулановая кислота), ампициллин, ванкомицин, гентамицин, канамицин, левифлоксацин, стрептомицин, тетрациклин, хлорамфеникол. Использованный нами подход анализа аэрозоля

для оценки резистентности к антибактериальным препаратам в последние годы получает все большую распространенность [209–211], хотя и не позволяет проводить прямое сравнение с результатами других исследований по оценке резистенции в городских условиях, ввиду несопоставимости анализа отдельно взятых изолятов с данными полногеномного секвенирования. Тем не менее, полученные результаты свидетельствуют о циркуляции факторов устойчивости к антибиотикам в городских условиях. Это может приводить к широкому распространению генов устойчивости между различными бактериями, делая окружающую городскую среду «резервуаром» различных генов АБР, что вызывает определенную озабоченность.

### **3.1.2 Метапрофилирование микроорганизмов с использованием секвенирования переменных регионов гена 16S rRNA**

#### **3.1.2.1 Оценка информативности переменных регионов и влияние культивирования на разнообразие**

Исследование только культивируемого микробиома не позволяет в полной мере характеризовать разнообразие микробного сообщества [212]. Для более подробного исследования, как правило, используют методы метагеномики с тотальным секвенированием всех нуклеиновых кислот или метапрофилирование с секвенированием переменных регионов гена 16S rRNA. Для нашего исследования был доступен второй вариант.

Одна из интересных и сложных задач заключается в выборе оптимального (-ых) переменного региона 16S rRNA, обеспечивающего идентификацию достаточного разнообразия последовательностей для точной идентификации большинства бактерий. Было опубликовано достаточно много различных работ, посвященных данной проблематике [213]. Одним из наиболее широко используемых регионов для исследования разнообразия бактерий в различных средах является область V3–V4 гена 16S rRNA [214]. Однако, часто для характеристики микробиомов, более показательными являются другие регионы. Так, в работе по изучению кишечного микробиома японцев более оптимальным оказался регион V1-V2 [215]. Сравнительная характеристика регионов V3–V4 и V4–V5 для изучения микробных сообществ Арктики продемонстрировала в целом схожие результаты. Однако, секвенирование фрагментов, полученных в результате амплификации V4–V5 региона, позволило дополнительно провести характеристику архей, что имеет важное значение ввиду содержания до 10%-20% данных микроорганизмов в сообществах арктических вод и отложений [216]. Проект по изучению микробиома Земли (Earth Microbiome Project) рекомендует использовать регион V4 [198]. Использование нескольких переменных регионов имеет преимущество, позволяя выявить большое количество различных родов. Для комплексной характеристики

микробиома образцов аэрозоля и поверхностей нами был использован коммерческий набор 16S Ion Metagenomics Kit™ (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с оптимизированными последовательностями синтетических олигонуклеотидов и их концентрациями для амплификации семи варибельных регионов: V2, V3, V4, V6V7, V8 и V9. Оценка вклада каждого варибельного региона была проведена на 108 образцах культивируемого и некультивируемого микробиомов, отобранных на двух станциях метрополитена. В результате секвенирования мы получили 26722008 прочтений. После обрезки по качеству, фильтрации по длине, удаления контаминирующих и химерных последовательностей было получено 7118906 высококачественных прочтений. В Таблице 4 приведены сведения по количеству прочтений, приходящихся на каждый варибельный регион в данных некультивируемого и культивируемого микробиома, с указанием индексов разнообразия Chao1 и Shannon.

Таблица 4 – Количество прочтений и различные индексы альфа-разнообразия по исследуемым регионам гена 16S rRNA в зависимости от культивирования

|                      | Микробиом        | V2     | V3     | V4      | V6,V7   | V8     | V9 |
|----------------------|------------------|--------|--------|---------|---------|--------|----|
| Количество прочтений | Культивируемый   | 367743 | 870849 | 522004  | 130259  | 226564 | 25 |
|                      | Некультивируемый | 524316 | 910104 | 1332237 | 1281883 | 952855 | 67 |
| Индекс Chao1         | Культивируемый   | 586    | 343    | 301     | 243     | 301    | -  |
|                      | Некультивируемый | 5172   | 3161   | 5054    | 4434    | 3276   | -  |
| Индекс Shannon       | Культивируемый   | 4,08   | 3,67   | 3,35    | 3,88    | 3,85   | -  |
|                      | Некультивируемый | 6,42   | 5,88   | 5,59    | 5,28    | 4,94   | -  |

Полученные данные позволяют сделать несколько важных выводов. Во-первых, культивирование микроорганизмов снижает разнообразие микробиома. Перед расчетами различных индексов альфа-разнообразия мы сделали нормализацию данных некультивируемого микробиома к величине прочтений культивируемого микробиома. Это было сделано индивидуально для каждого варибельного региона. Индекс альфа-разнообразия Chao1 (Рисунок 22) и индекс Shannon (Рисунок 23) для некультивируемого микробиома были значительно выше по сравнению с микробиомом после культивирования ( $p < 0,05$ ). Это ожидаемый результат. Оценка индекса Shannon также позволяет сделать заключение о полноте представленности различных микроорганизмов в данных некультивируемого микробиома.

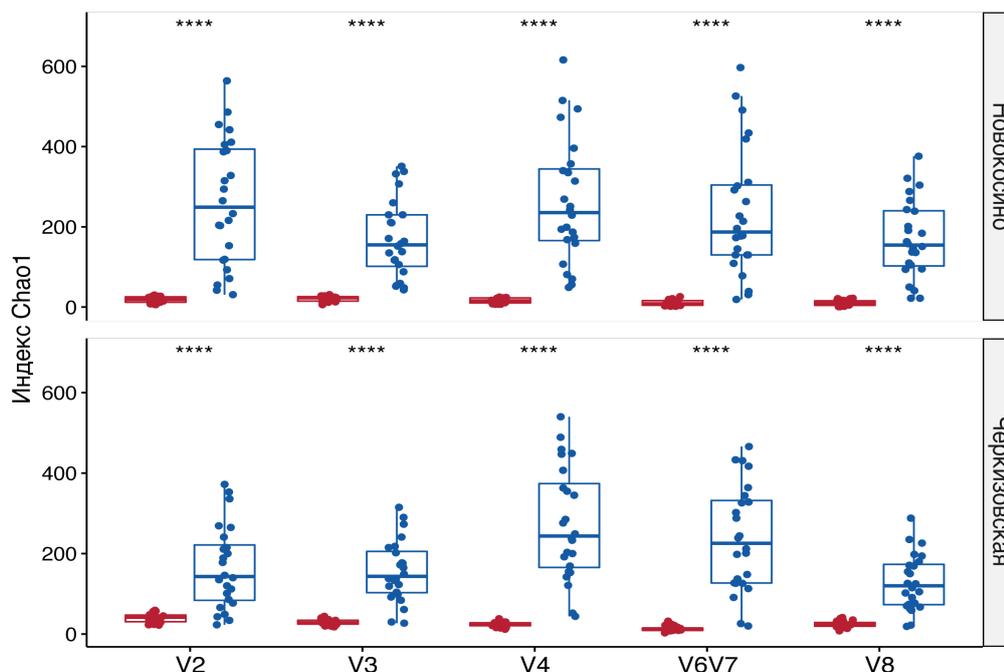


Рисунок 22 – Сравнение альфа-разнообразия рассчитанное индексом Chao1 в зависимости от культивирования. Прямоугольные диаграммы со средней линией обозначают медиану, прямоугольник обозначает межквартильный размах (IQR) и диапазоны 1,5 IQR (усы). Красным цветом обозначены образцы культивируемого микробиома, синим - образцы некультивируемого микробиома. Тест Уилкоксона был проведен для сравнения альфа-разнообразия. Количество звездочек (\*) обозначает достоверные отличия (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ).

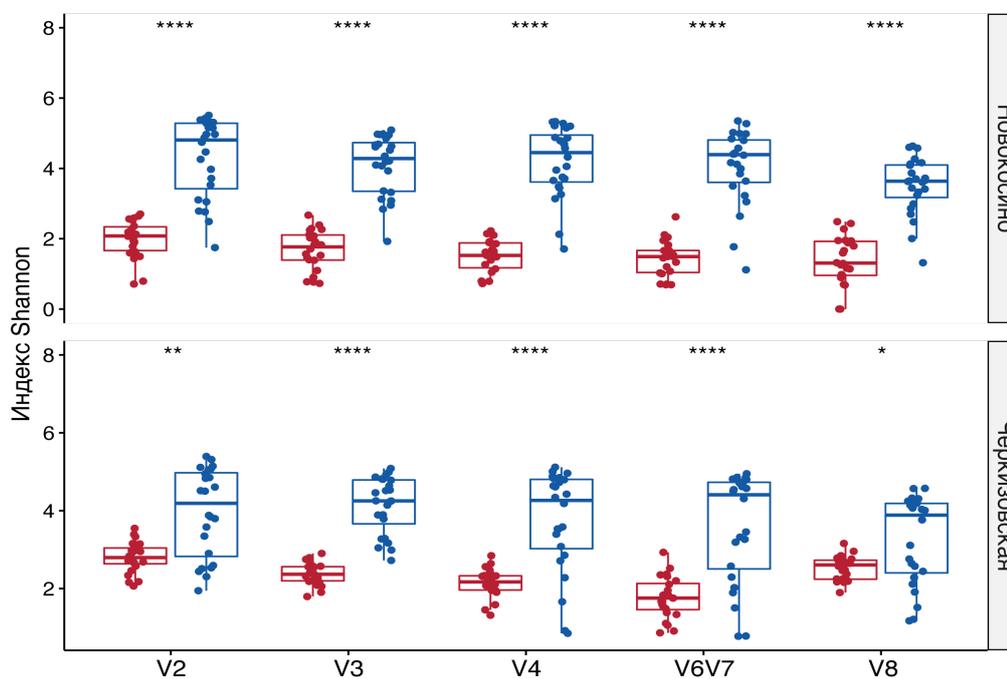


Рисунок 23 – Сравнение альфа-разнообразия рассчитанное индексом Shannon в зависимости от культивирования и варибельного региона гена 16S rRNA. Прямоугольные диаграммы со средней линией обозначают медиану, прямоугольник обозначает межквартильный размах (IQR) и диапазоны 1,5 IQR (усы). Красным цветом обозначены образцы культивируемого микробиома, синим - образцы некультивируемого микробиома. Тест Уилкоксона был проведен для сравнения альфа-разнообразия. Количество звездочек (\*) обозначает достоверные отличия (\*\*\*\*,  $p < 0,0001$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*,  $p \leq 0,05$ ).

Во-вторых, в данных культивируемого микробиома не было найдено ни одного рода, который не встречался бы в данных некультивируемого микробиома. Для этого поиска мы удалили низкочастотные рода (на долю которых приходилось меньше 10 прочтений). Это позволило нам исключить ложноположительные результаты. В результате мы идентифицировали 432 рода характерных только для некультивируемого микробиома, а количество общих родов составило 200. Несмотря на использование богатых питательных сред некультивируемый микробиом примерно в три раза превышал культивируемый (Рисунок 24).

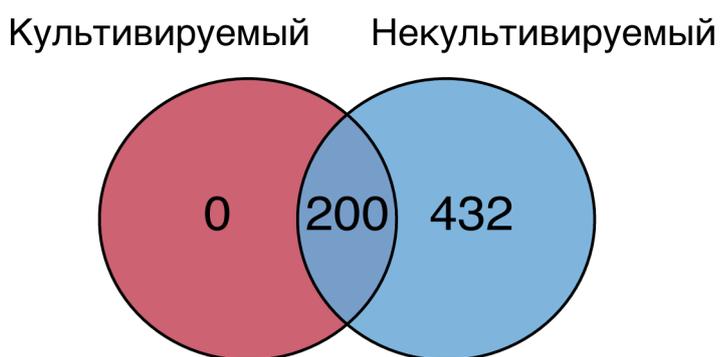


Рисунок 24 – Распределение уникальных родов в зависимости от культивирования

Полученные данные хорошо согласуются с ранее проведенными исследованиями и показывает снижение разнообразия за счет культивирования [217–219].

Третий важный вывод заключается в различной информативности переменных регионов для характеристики образцов воздуха и поверхностей. Наибольший вклад в разнообразие (индекс Chao1) вносили регионы V2, V4 и V6V7. На переменный регион V9 пришлось наименьшее количество прочтений (67 прочтений после выполнения всех необходимых этапов контроля качества «сырых» данных). Полученные нами результаты с использованием образцов из окружающей среды хорошо согласуются с исследованием, проведенного на коллекции фиктивных (искусственных) микробных сообществ [213]. Нами также был проведен поиск уникальных и общих родов в зависимости от использования переменного региона. Для этого поиска мы также удалили низкочастотные рода (на долю которых приходилось меньше 10 прочтений). В результате, наибольшее количество уникальных родов было отмечено для регионов V6V7 и V4, которое составило 99 и 95, соответственно (Рисунок 25). При этом 84 рода были идентифицированы независимо от региона (V2, V3, V4, V6V7, V8).

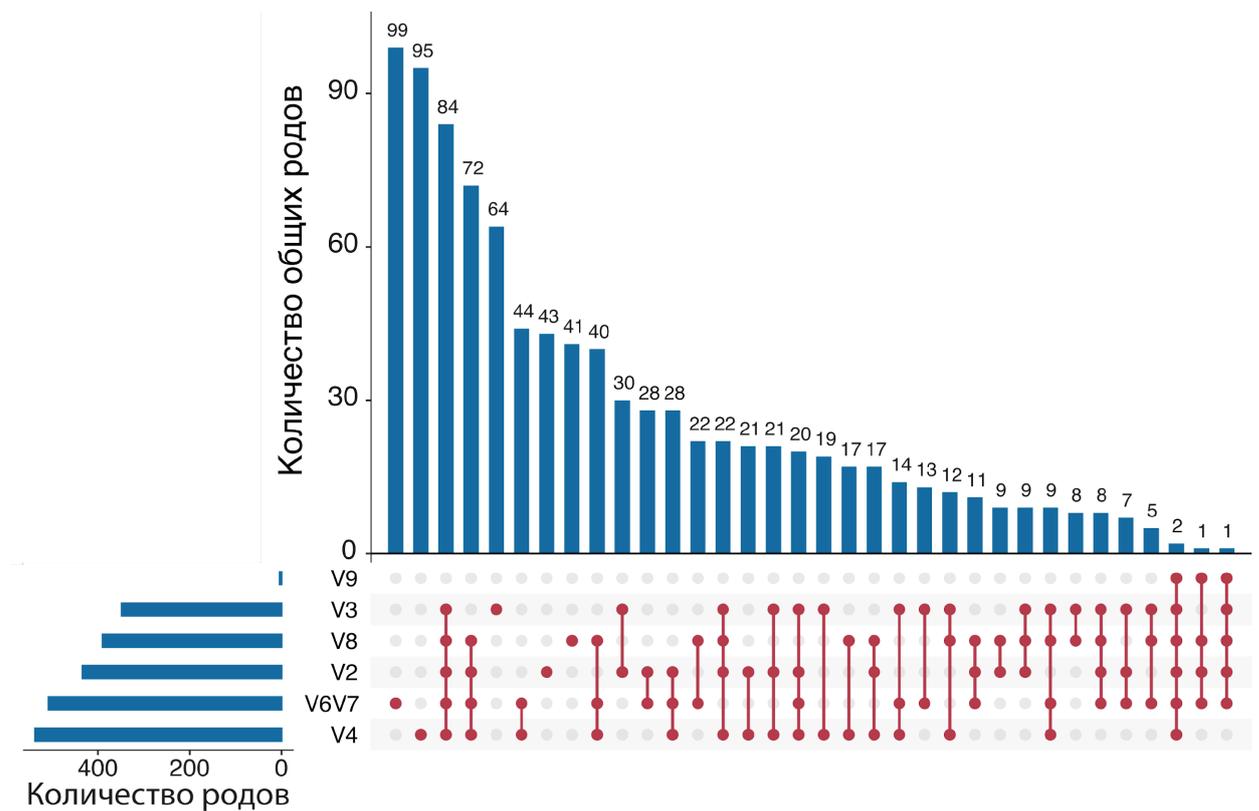


Рисунок 25 – Общие и уникальные роды бактерий в зависимости от вариабельного региона гена 16S rRNA. Число слева указывает на количество родов для каждого региона, число над столбцом указывает на количество уникальных/общих родов для групп, которые отмечены под столбцами.

Использование региона V4 позволяет не только получить данные для общей характеристики разнообразия микробиома (индекс Chao1=5054), но и позволяет идентифицировать большое количество уникальных родов. По последнему показателю он уступает региону V6V7, что может быть связано с преимущественной амплификацией определённого региона в мультиплексной ПЦР. Таким образом, оценка эффективности независимой амплификации вариабельных регионов для изучения разнообразия различных по своему составу образцов является необходимой частью работы.

Одним из ограничений данной части исследования заключается в необходимости проведения дополнительных экспериментов по оценке эффективности регионов V3 и V4 по отдельности и в составе области V3-V4.

### 3.1.2.2 Микробиом станций Московского метрополитена

Для получения усредненной характеристики Московского метрополитена на основании результатов сравнительной оценки пробоотборников были выбраны два метода сбора образцов, позволяющие наиболее полно описать разнообразие биоаэрозоля и поверхности – Cyclone-SASS (аэрозольный пробоотборник) и Swab (смывы с поверхностей). Кроме того, в

анализ были включены только результаты секвенирования некультивируемого микробиома ввиду большего его разнообразия.

Таксономическое распределение на уровне рода продемонстрировало сходство между аэрозольными и поверхностными образцами, собранными на станциях Новокосино и Черкизовская (Рисунок 26).

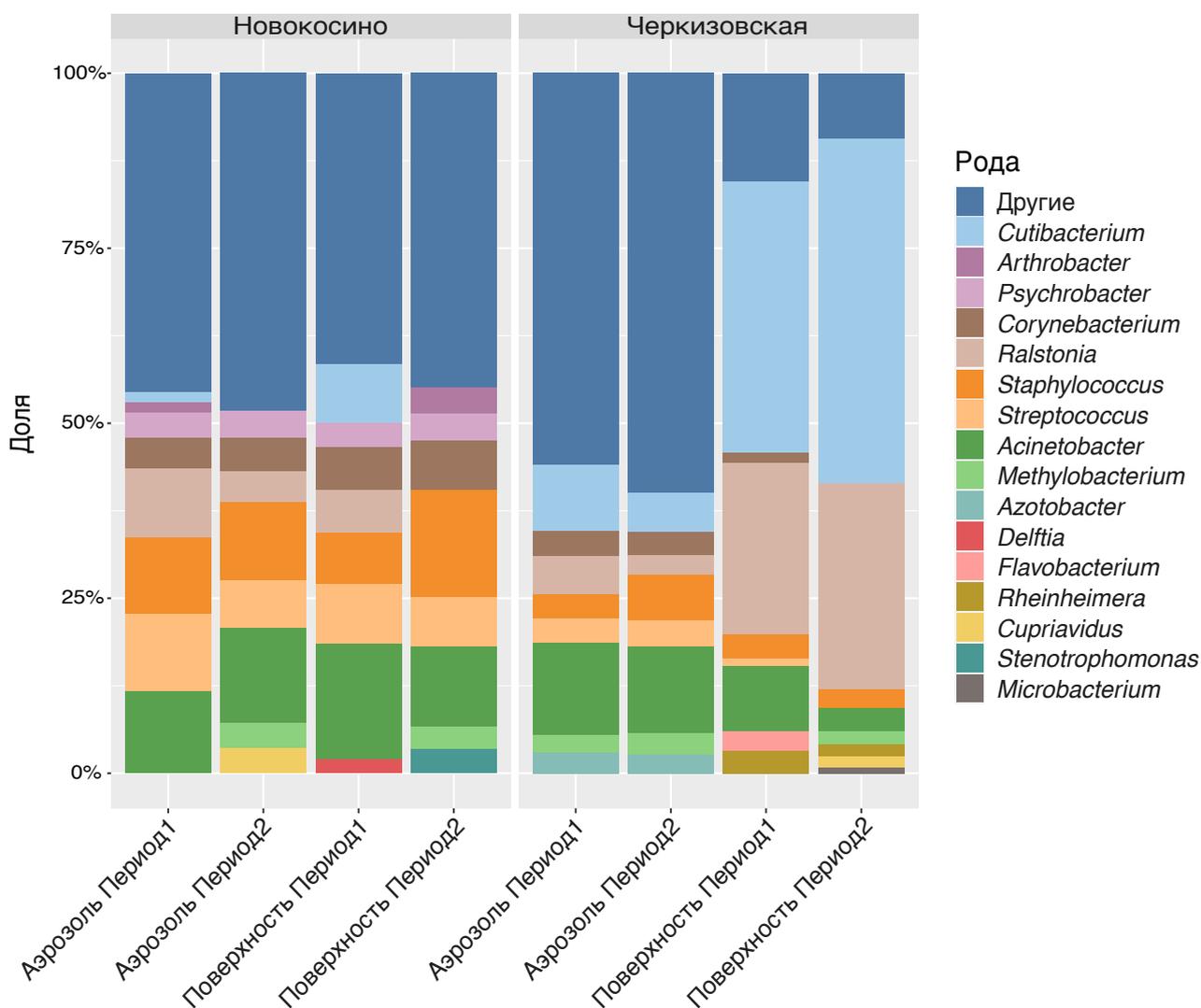


Рисунок 26 – Изменение представленности наиболее распространенных родов в зависимости от метода сбора и станции. Адаптировано из [220].

Наиболее распространёнными были рода *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Ralstonia*. Данные рода широко распространены в окружающей среде и являются симбионтами кожи человека. Кроме того, *Corynebacterium* (рассматриваются как комменсалы дыхательных путей) и *Cutibacterium* (рассматриваются как комменсалы кожи человека и условно-патогенные микроорганизмы) были также идентифицированы практически во всех образцах.

На станции Новокосино преобладали рода *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Delftia* и *Stenotrophomonas*, которые не были представлены среди десяти наиболее распространенных родов станции Черкизовская. Сбор образцов в разные временные интервалы позволил охарактеризовать микробиом в динамике. Так, увеличение пассажиропотока на станции Новокосино коррелировало с изменением доли родов *Corynebacterium*, *Methylobacterium* и *Staphylococcus* в аэрозоле и на поверхности. Род *Cupriavidus* был наиболее представлен в аэрозоле во втором временном интервале, *Delftia* преобладал на поверхности в первом временном интервале и *Stenotrophomonas* преобладал на поверхности во втором временном интервале. Для представителей родов *Cutibacterium* и *Ralstonia* (условно-патогенные микроорганизмы, широко распространенные в окружающей среде) доля увеличивалась во втором временном интервале при увеличении пассажиропотока и эти микроорганизмы были наиболее представлены на поверхности. Восемь наиболее представленных родов на станции Новокосино составляют примерно 50% от некультивируемого микробиома.

Таксономический профиль аэрозоля и поверхности на станции Черкизовская был значительно разнообразней. В дополнение к перечисленным общим родам метагеном характеризовался присутствием *Azotobacter* в аэрозоле и *Rheinheimera*, *Flavobacterium* и *Microbacterium* в образцах, собранных с поверхности. Таксономическая характеристика позволила выявить причину снижения индексов альфа-разнообразия в образцах с поверхностей на станции Черкизовская. На поверхностях станции Черкизовская со временем стали преобладать рода *Cutibacterium* и *Rheinheimera*, удельный вес которых увеличился с 39,2% и 24,3% до 49,6% и 29,3% соответственно. В то же время процент менее представленных родов, объединенных в группу «Другие», со временем уменьшился с 15,2% до 9,1%. При этом мы не отмечаем преобладания каких-либо родов в образцах аэрозоля в зависимости от пассажиропотока.

Большинство идентифицированных родов (*Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Streptococcus* и *Corynebacterium*) являются комменсалами кожи и слизистых оболочек человека [19,133,221,222], которые широко представлены в метро различных городов мира [220]. Некоторые роды (*Cutibacterium*, *Ralstonia* и *Psychrobacter*) преобладали либо на станции в целом, либо в основном встречались в аэрозоле или на поверхностях. Было показано, что *Cutibacterium* был преобладающим представителем в метрополитене Мехико [223]. *Ralstonia* была более характерна для образцов аэрозоля воздуха, а высокая концентрация рода *Psychrobacter* отмечалась в метрополитене Осло зимой [137]. Другой широко распространённый род в Московском метрополитене, *Methylobacterium*, оказался

доминирующим в метрополитене Барселоны [224] и входил в 23 наиболее широко распространенных рода в афинском метро [221]. Представители рода *Methylobacterium* — аэробные микроорганизмы, способные расти в присутствии формальдегида, формиата и метанола [225]. Таким образом, они действуют как биологические индикаторы загрязнения [224]. Для обеих станций мы также обнаружили увеличение доли рода *Cupriavidus* с увеличением количества поездов, что может свидетельствовать о повышенном содержании тяжелых металлов в окружающей среде [226,227].

Анализ главных координат (Principal Coordinates Analysis, PCoA) был проведен с использованием матрицы несходства Bray-Curtis для поиска возможных кластеров образцов в зависимости от типа образца и станции сбора (Рисунок 27А).

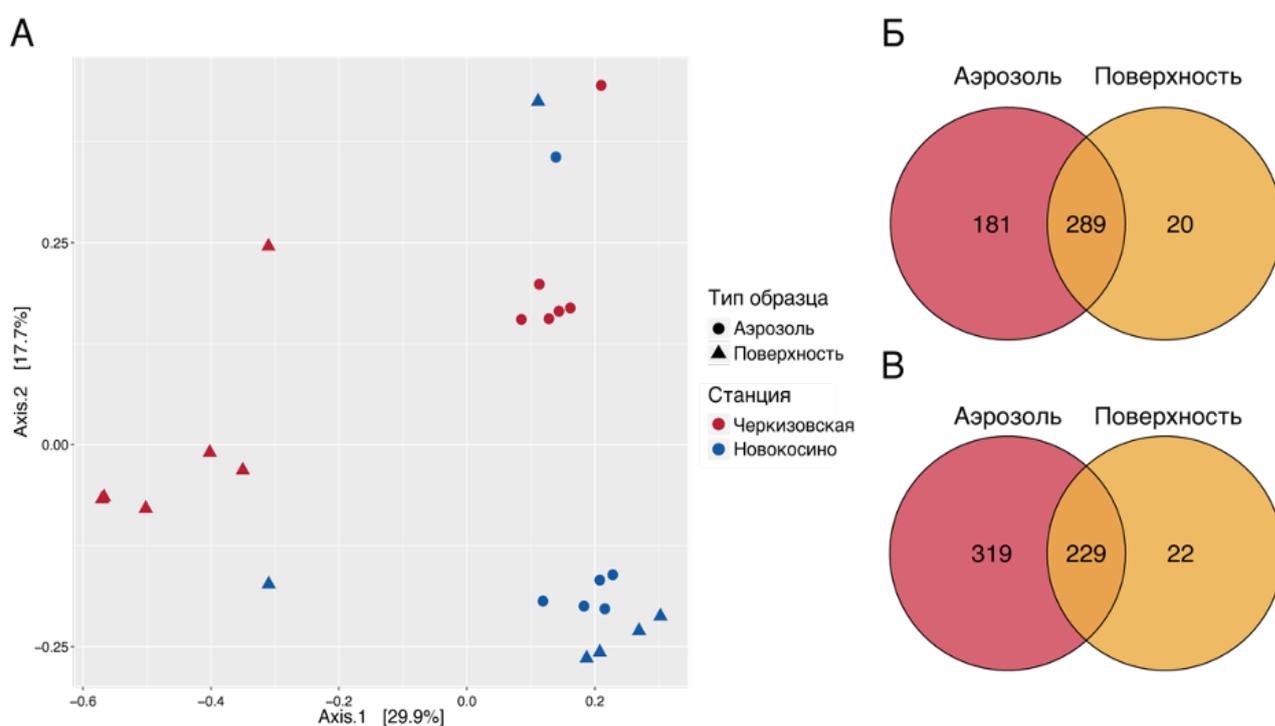


Рисунок 27 – А) Анализ главных координат с использованием матрицы несходство Bray-Curtis. Цветом обозначены станции, формой – тип образца. Основные координаты 1 и 2 (Axis 1 и Axis 2) объяснили 29,9% и 17,7% дисперсии несходства Bray-Curtis. Б) Распределение ASV по типу образцов на станции Новокосино. В) Распределение по типу образцов на станции Черкизовская. Адаптировано из [220].

Мы обнаружили три основных кластера: два кластера характеризовали отдельные станции и один кластер был общим для двух станций. Были обнаружены значительные различия в многомерной модели PERMANOVA с такими переменными как станция и тип образца ( $F=5,8883$ ,  $R^2=0,18165$ ,  $p=0,0001$  и  $F=5,4318$ ,  $R^2=0,16757$ ,  $p=0,0001$  соответственно). Это позволяет сделать предположение о сформировавшемся микробиоме станций метрополитена, а также о различиях его состава в аэрозоле и на поверхности.

При поиске общих и уникальных родов в зависимости от типа образца было показано, что количество общих бактериальных родов в аэрозоле и на поверхностях составило 289 на станции Новокосино (Рисунок 27Б) и 229 на станции Черкизовская (Рисунок 27В). При этом, большинство уникальных родов (181 на станции Новокосино и 319 на станции Черкизовская) были идентифицированы в аэрозоле воздуха. Однако, их доля составила около 2,37% и 5,89% от общего количества прочтений. Уникальными для поверхности были всего 20 (станция Новокосино) и 22 (станция Черкизовская) вида; их доля составила 0,27% и 0,14% соответственно.

### **3.1.2.3 Оценка разнообразия микробиома Московского метрополитена по данным двух независимых исследований**

Исследование такой динамической системы как микробиом не лишает возможности выявления в наиболее обобщенном виде состава ключевых родов являющихся наиболее типичными для метрополитена города Москвы, с учетом всех особенностей формируемой окружающей среды. При формировании списка наиболее характерных родов было проведено сравнение полученных данных с ранее опубликованным исследованием микробиома Московского метрополитена – далее исследование Кномикс [19]. Данное исследование включает в себя результаты секвенирования некультивируемого микробиома образцов, собранных с различных поверхностей на станциях Сретенский бульвар, Достоевская, Римская и Выставочная. К проведению сравнительного анализа нас побудило несколько аспектов. Во-первых, насколько нам известно, было опубликовано всего два исследования посвященных изучению микробиома Московского метрополитена, самого крупного в Европе и входящих в десять наиболее крупных метрополитенов Мира. Во-вторых, данные образцы были собраны в разное время: июнь 2016 года (Кномикс) и февраль 2017 года (данное исследование), что позволяет косвенно оценить сезонную изменчивость и определить коровый состав. В-третьих, мы оценили бактериальное разнообразие в аэрозоле и на поверхности. Несмотря на имеющиеся ограничения (в исследовании Кномикс не проводился сбор аэрозоля и оценка устойчивости к антибактериальным препаратам ) полученные результаты позволят глубже взглянуть на формирование микробиома метрополитена и выявить как общие рода, так и потенциально характерных для времени года/станции.

Несмотря на сбор образцов на разных станциях и в разное время года (зима и лето) значение индекса Chao1 продемонстрировало большую величину как для образцов аэрозоля (медиана варьировала от 266 до 295), так и для поверхности (медиана варьировала от 61 до 82) на станциях Новокосино и Черкизовская (сбор образцов в феврале 2017) (Рисунок 28).

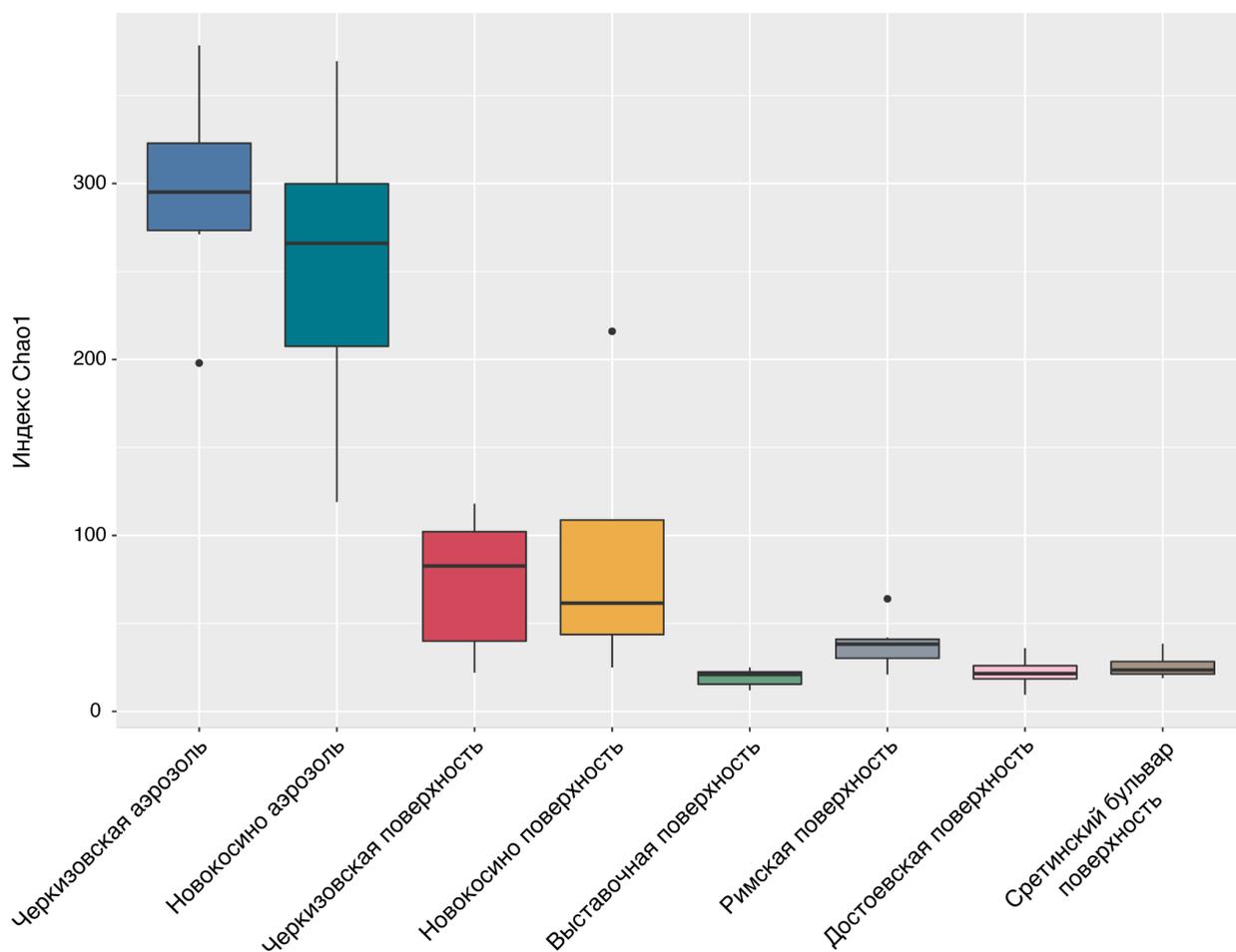


Рисунок 28 – Альфа-разнообразие (индекс разнообразия Chao1) в зависимости от станции и типа образца (аэрозоль/поверхность).

При этом максимальное значение разнообразия Chao1 на поверхности по данным исследования Кномикс составило 64, а значение медианы составило 38 (станция Римская). Учитывая сезонную закономерность (разнообразие микроорганизмов, как правило, выше весной и летом), а также более сильное влияние температуры на разнообразие в аэрозоле воздухе, а не разнообразие на поверхности [137]. Полученные результаты безусловно вызывают интерес. Среди факторов, влияющие на конечный результат, могут быть использование различных наборов для экстракции ДНК, различная эффективность амплификации переменных регионов, а также потери на других этапах пробоподготовки.

Имеющиеся различия в индексе альфа-разнообразия позволила нам предположить большее разнообразие уникальных микроорганизмов на станциях Новокосино и Черкизовская (Рисунок 29). Наибольшее количество уникальных родов было отмечено в аэрозоле воздуха и составило 87 (Новокосино) и 93 (Черкизовская) родов. Среди образцов с поверхностями большее количество уникальных родов были представлены для этих же станций – 12 и 22 соответственно. Для Достоевской были уникальными 4 рода, для Сретенского бульвара – 2



|                            |                      |                    |                      |                      |                         |                        |                    |                |                      |                         |                      |                    |                       |                         |                      |
|----------------------------|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------|----------------|----------------------|-------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| Черкизовская аэрозоль -    | 1349                 | 46                 | 182                  | 426                  | 191                     | 3079                   | 198                | 6286           | 129                  | 14686                   | 101                  | 3105               | 185                   | 905                     | 289                  |
| Новокосино аэрозоль -      | 4751                 | 152                | 25                   | 409                  | 896                     | 9196                   | 2353               | 252            | 898                  | 5521                    | 279                  | 332                | 7262                  | 117                     | 3244                 |
| Черкизовская поверхность - | 6066                 | 56                 | 13                   | 141                  | 55                      | 499                    | 1360               | 80             | 36                   | 52103                   | 6                    | 207                | 736                   | 174                     | 265                  |
| Новокосино поверхность -   | 53                   | 663                | 22                   | 71                   | 1138                    | 5188                   | 1549               | 61             | 790                  | 13044                   | 274                  | 330                | 308                   | 70                      | 611                  |
| Выставочная -              | 3678                 | 53                 | 22                   | 84                   | 53                      | 1915                   | 1547               | 162            | 35                   | 16947                   | 17                   | 8594               | 16659                 | 6845                    | 6774                 |
| Сретенский бульвар -       | 9690                 | 13                 | 262                  | 78                   | 289                     | 2716                   | 80                 | 22             | 66                   | 22719                   | 761                  | 649                | 2557                  | 3721                    | 392                  |
| Римская -                  | 4004                 | 78                 | 255                  | 730                  | 185                     | 9099                   | 2001               | 186            | 1159                 | 19551                   | 10                   | 393                | 7190                  | 1446                    | 1944                 |
| Достоевская -              | 3692                 | 54                 | 314                  | 94                   | 3336                    | 17326                  | 1568               | 7146           | 165                  | 7202                    | 13                   | 64                 | 4876                  | 504                     | 1086                 |
|                            | <i>Acinetobacter</i> | <i>Actinomyces</i> | <i>Aeromicrobium</i> | <i>Brevundimonas</i> | <i>Chryseobacterium</i> | <i>Corynebacterium</i> | <i>Cupriavidus</i> | <i>Dietzia</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>Methylobacterium</i> | <i>Peptoniphilus</i> | <i>Pseudomonas</i> | <i>Staphylococcus</i> | <i>Stenotrophomonas</i> | <i>Streptococcus</i> |

Рисунок 30 – Тепловая карта иллюстрирует представленность 15 наиболее распространенных родов на всех шести станциях. Цифры обозначают количество прочтений после этапа нормализации. Адаптировано из [220].

«Коровый» микробиом Московского метрополитена был схож с микробиомами таких городов как Мехико, Гонконг, Нью-Йорк, Осло и отличался тем, что бактериальные рода были различно представлены в количественном выражении. Основная доля корового микробиома приходится на такие рода как *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*. Особо следует выделить работу Gohli с соавторами [137] по изучению сезонного изменения состава микробиома в метрополитене Осло (одного из северных метрополитенов Мира). При сравнении наиболее распространенных родов метрополитена Осло с коровым Московским метагеномом удалось выявить общие рода *Acinetobacter*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*. Данные микроорганизмы являются обитателями различных экологических ниш, в том числе почвенные (*Acinetobacter*) и почвенные/водные (*Blastococcus*, *Flavobacterium*). Рода *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и *Streptococcus* являются одними из наиболее часто выявляемых родов, связанных с человеком.

Несмотря на наличие «корового» микробиома, мы отмечаем присутствие малочисленных родов на каждой из станций, которые потенциально могут быть характерны для этой станции и/или же связаны с сезонными колебаниями микробиома. Среди них были представители *Tissierella* sp. (станция Достоевская), анаэробная сульфидогенная бактерия, обладающей сродством к металлической меди [228], *Caproiciproducens* (станция Достоевская),

выделенная из очистных сооружений [229], и представители *Arsenicicoccus* (станция Римская), способные восстанавливать мышьяк As(V) до As(III) в водной среде [230].

Характерные признаки выявленных микроорганизмов свидетельствуют о преобладании видов, приспособленных к выживанию в городских условиях. Большинство уникальных родов были изолированы из окружающей среды (почва и вода) и едва ли являются патогенными микроорганизмами для человека. Микроорганизмы, формирующие микробиом станций Московского метрополитена, не являются значимыми патогенами и в основном представляют собой естественных «обитателей» городских инфраструктур. Они необходимы для поддержания такой среды и представляют собой «нормальный» микробиом города [134,231].

### **3.2 Состав биоаэрозоля и поверхностей в условиях стационара**

По результатам исследований, проведенных в Московском метрополитене, была продемонстрирована эффективность использования аэрозольного пробоотборника Cyclone-SASS, а также использование смывов с поверхностей (Swab) как наиболее стандартного метода сбора образцов. В совокупности данные методы позволяют комплексно подойти к изучению микробиома в замкнутых системах. Данные подходы были использованы для проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга в условиях COVID-стационара в период пандемии COVID-19.

Эффективное предотвращение распространения новой инфекции требует понимания механизмов, путей передачи вируса и способность сохранения SARS-CoV-2 на различных поверхностях. С начала пандемии было опубликовано достаточно публикаций и в соответствии с современным представлениям, к основным механизмам передачи SARS-CoV-2 относятся аэрогенная и контактная передача [232–235]. Таким образом, аэрозоли, капли воздуха и пыль, а также поверхности могут быть заражены SARS-CoV-2. Ряд исследований продемонстрировал способность SARS-CoV-2 сохранять жизнеспособность на аэрозольных частицах воздуха до 3–16 часов [236,237], а на различных поверхностях до нескольких дней [237]. Эти данные также свидетельствуют о способности вируса оседать на твердые поверхности сохраняя свою целостность, что, в свою очередь, реализует путь передачи через фомиты [237–239]. Полученные данные позволяют своевременно принять соответствующие эпидемиологические меры, благодаря чему удалось добиться значительного снижения новых случаев заражения. Несмотря на фундаментальные и частично практические успехи не удалось победить данную пандемию. Ее продолжение объясняется различными факторами, такими как отсутствие выработанного коллективного иммунитета [240,241], постоянная эволюция SARS-CoV-2 и появление новых линий, что сопровождается растущими

опасениями относительно потенциальной способности вируса уклоняться от действия нейтрализующих антител [232,242–244], а также несвоевременное частичное или полное снятие ограничительных мер. Продолжающаяся пандемия по-прежнему оставляет медицинские учреждения, направление на лечения пациентов с COVID-19, «горячими точками». Помимо внутрибольничной передачи новой коронавирусной инфекции в данных медицинских учреждениях, возможно распространение других инфекционных возбудителей. Следует отметить, что это потенциально способно вызывать сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19, отягощая течение болезни вплоть до летальных исходов. При этом, сочетанные инфекции вызывают не только патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, но и некоторые представители нормального микробиома окружающей среды. Учитывая высокую распространенность внутрибольничных возбудителей, особенно из группы ESKAPE, требуется проведение эпидемиологического мониторинга для выявления очагов инфекций и принятия соответствующих мер. При этом, обширные научные данные по изучению распространения различных патогенов, в том числе SARS-CoV-2 и нозокомиальных инфекций, в условиях стационара, эти результаты невозможно экстраполировать ввиду наличия климатических условий и особенностей систем здравоохранения в разных странах. Таким образом, проведение подобных исследований в условиях COVID-стационара является актуальной задачей.

На Рисунке 31 представлена схема использования в COVID-стационаре ранее отработанного протокола.

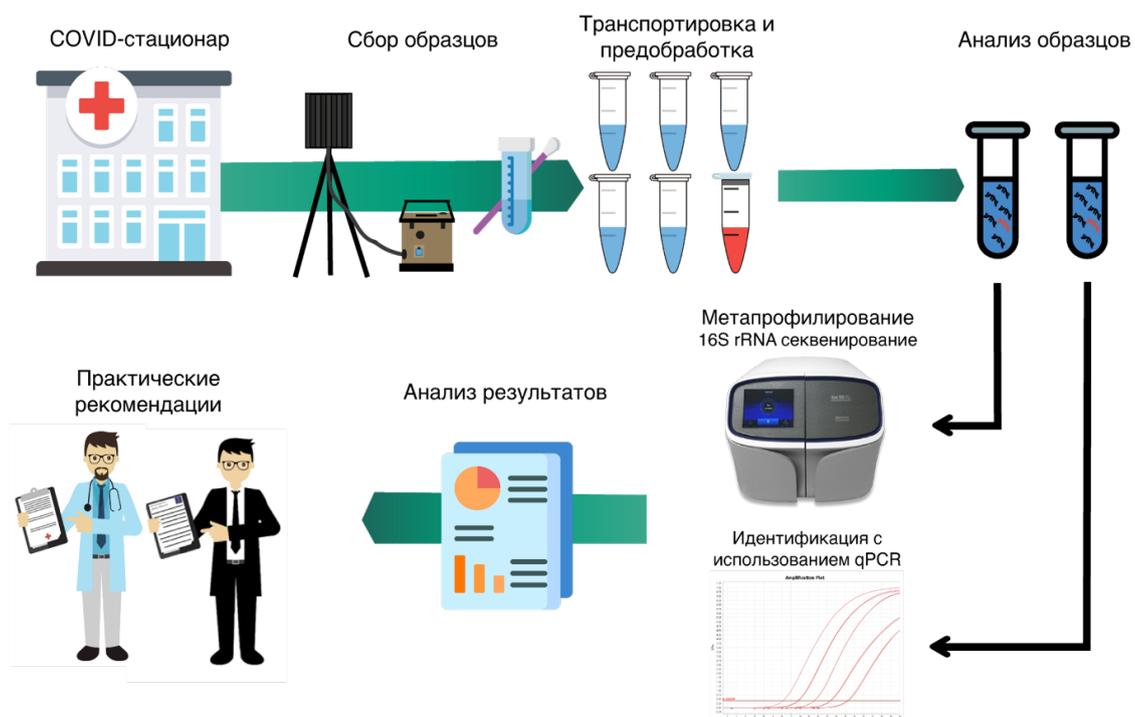


Рисунок 31 – Схема протокола сбора и анализа образцов для решения задач молекулярной эпидемиологии.

В качестве места сбора образцов были выбраны два отделения – отделение общей терапии (ООТ, в данном отделении госпитализированы пациенты со средним и средне-тяжелым течением болезни) и отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ, в данном отделении госпитализированы пациенты с тяжелым течением болезни и необходимостью в подключении к аппарату искусственной вентиляции легких). Для анализа микробиома был применен комплексный и взаимодополняющий подход основанный на ПЦР и NGS секвенировании, которые широко используются для молекулярно-эпидемиологического мониторинга. С помощью количественной ПЦР мы идентифицировали РНК SARS-CoV-2 и ДНК патогенных бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, CoNS и *Achromobacter* spp.). В качестве варибельного региона гена 16S rRNA был выбран V4, который продемонстрировал высокую информативность по результатам исследования в Московском метрополитене. Секвенирование варибельного региона V4 16S rRNA позволило провести оценку разнообразия микробиома различных поверхностей для определения потенциальных резервуаров инфекций. Также это позволило выявить характерные бактериальные рода в зависимости от отделения.

### 3.2.1 Идентификация РНК SARS-CoV-2 в аэрозоле и на поверхностях в различных отделениях инфекционной больницы

Для изучения контаминации РНК SARS-CoV-2 в двух отделениях были отобраны и проанализированы 131 образец: 9 аэрозольных и 82 образца с поверхностей в ООТ; 6 аэрозольных и 34 образца с поверхностей в ОРИТ. В таблице 5 приведены результаты идентификации РНК SARS-CoV-2 в отобранных образцах.

Таблица 5 – Общее и количество положительных образцов в зависимости от отделения

| Отделение | Кол-во собранных образцов аэрозоля | Кол-во (%) положительных образцов | Кол-во собранных образцов с поверхностей | Кол-во (%) положительных образцов |
|-----------|------------------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|
| ООТ       | 9                                  | 0 (0%)                            | 82                                       | 6 (7,32%)                         |
| ОРИТ      | 6                                  | 5 (83,3%)                         | 34                                       | 6 (17,65%)                        |
| Всего     | 15                                 | 5 (31,25%)                        | 116                                      | 12 (10,34%)                       |

В результате исследования было выявлено наличие РНК SARS-CoV-2 в аэрозоле воздуха только в отделении реанимации. Из шести образцов пять оказались положительными. Стоит отметить, что отрицательный образец был второй по порядку сбора и был собран под приточной вентиляцией. Таким образом, можно сделать вывод о достаточности промывки прибора (техническая промывка внутренней части циклона и является обязательным шагом перед отбором следующего образца) и об отсутствии РНК SARS-CoV-2 в поступающем

воздухе. Несмотря на то, что данный коридор считается «чистой зоной», положительными на наличие SARS-CoV-2 были два образца из трех. Концентрация SARS-CoV-2 в коридоре находилась в пределах от 37,50 до 187,50 копий РНК на 1 м<sup>3</sup> воздуха, а в боксах с госпитализированными пациентами концентрация примерно составляла 554 копий РНК на 1 м<sup>3</sup> воздуха (Таблица 6).

Таблица 6 – Расчет копийности SARS-CoV-2 в аэрозоле

| Образец | Цикл (Ст) | ГЭ/мл | Объем образца, мл | Время сбора образца, мин | Объем воздуха, м <sup>3</sup> | Коэффициент эффективности сбора образцов | Копий РНК SARS-CoV-2/м <sup>3</sup> |
|---------|-----------|-------|-------------------|--------------------------|-------------------------------|--|-------------------------------------|
| В1      | 40,06     | 100   | 4,5               | 20                       | 80,000                        | 0,15                                     | 37,50                               |
| В2      | отр       | 0     | 4,5               | 20                       | 80,000                        | 0,15                                     | 0                                   |
| В3      | 37,6      | 500   | 4,5               | 20                       | 80,000                        | 0,15                                     | 187,50                              |
| В4      | 38,35     | 100   | 5,0               | 5                        | 1,625                         | 0,50                                     | 553,85                              |
| В5      | 38,45     | 100   | 5,0               | 5                        | 1,625                         | 0,50                                     | 553,85                              |
| В6      | 39,25     | 100   | 5,0               | 5                        | 1,625                         | 0,50                                     | 553,85                              |

Оценить потенциальный риск заражения посредством вдыхания аэрозоля в отделении реанимации было сложно из-за отсутствия данных о жизнеспособности вируса в собранных образцах, а также отсутствия информации о минимальной инфекционной дозе SARS-CoV-2 у людей. Оценка инфекционной дозы для людей требует интраназального введения вируса в виде капель или аэрозолей [245]. Насколько нам известно, пока не сообщалось о конкретных значениях инфекционной дозы SARS-CoV-2 для человека. В нескольких исследованиях на животных инфекционная доза составляла не менее 500 бляшкообразующих единиц (БОЕ) при интраназальном введении хомякам [246] и 630 БОЕ при аэрозольной передаче мышам [245]. Этого количества вируса было достаточно, чтобы вызвать различные симптомы заболевания у лабораторных животных, например пневмонию. При этом инфекционная доза для SARS-CoV-1 составляла всего 280 вирусных частиц (ID50) [247]. Эти значения аналогичны инфекционной дозе для сезонных коронавирусов человека и некоторых коронавирусов животных, принадлежащих к той же генетической группе, что и SARS-CoV-1 [247,248]. Можно предположить, что минимальная инфекционная доза составляет около 100 инфекционных вирусных частиц SARS-CoV-2 [245]. В исследовании Lednicky продемонстрировал способность обнаружения жизнеспособного вируса SARS-CoV-2 на расстоянии до 4,8 метра от пациента с COVID-19. Концентрация SARS-CoV-2, измеренная с помощью количественной ПЦР, составляла от 16 до 94 ГЭ/л воздуха, а количество жизнеспособных вирусных частиц находилось в диапазоне от 6 до 74 TCID50/л воздуха [249].

На основании данных результатов можно предположить наличие потенциально опасного количества вируса в отделении интенсивной терапии. Мы использовали информацию о количестве живого вируса в 1 л воздуха, учли, что в среднем взрослый человек вдыхает 7–10 л воздуха в минуту, и пересчитали количество вируса в собранных нами образцах аэрозоля. Наши расчеты показали, что контакт в течение 5-50 минут человека без средств защиты с инфекционным аэрозолем в отделении интенсивной терапии будет достаточно для вдыхания инфекционной дозы SARS-CoV-2. Стоит отметить, что дальнейшие исследования заразности SARS-CoV-2 помогут уточнить эти риски.

Наряду с обнаружением в отделении ОПИТ РНК SARS-CoV-2 в аэрозоле были также обнаружены на поверхности дверной ручки (n = 1), на полу (n = 4), на панели прибора управления аппаратом искусственной вентиляции легких (n = 1). Положительные смывы на наличие SARS-CoV-2 были выявлены в помещениях ООТ (n = 6): 2 образца, взятые с пола, 2 – с дверных ручек, по одному положительному результату с поверхности прикроватной тумбы и оконной ручки в палате (Рисунок 32).

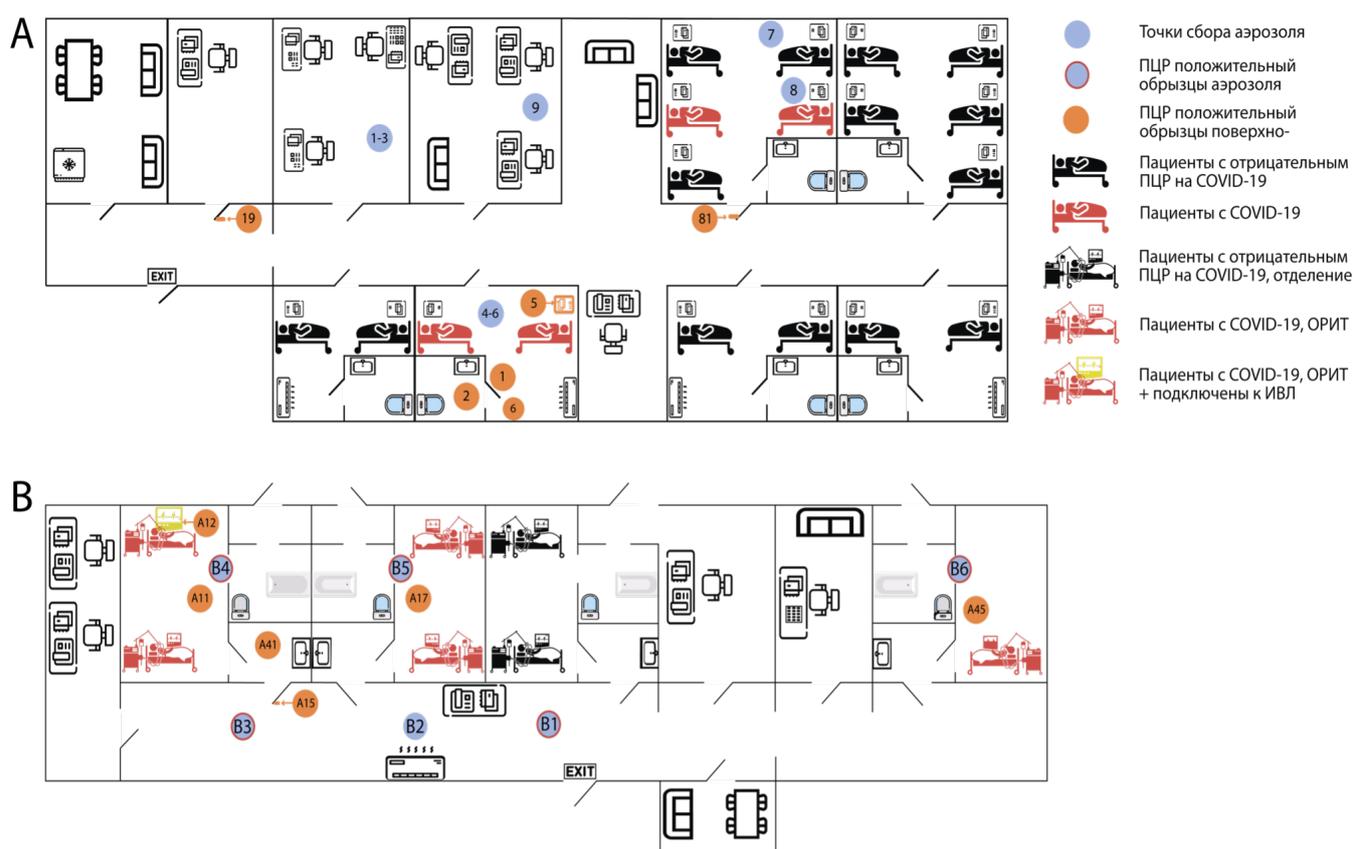


Рисунок 32 – Схематическое изображение (А) отделения респираторных инфекций, (В) отделение реанимации и интенсивной терапии. Синими кружками обозначены точки установки аэрозольного пробоотборника. Синие кружки с красной окантовкой обозначают образец аэрозоля, положительный на SARS-CoV-2. Оранжевые кружки с цифрами обозначают положительные на SARS-CoV-2 смывы с поверхностей. Койки обозначают наличие больного, пациенты с COVID-19 обозначены красным цветом, а пациенты с отрицательным тестом на COVID-19 или с другим диагнозом – черным цветом. Цифры обозначают номер образца (Приложение №3,4). Адаптировано из [250].

Наиболее контаминированными были поверхности с постоянным контактом, такие как дверные ручки. Кроме этого, частицы вируса оседали и на поверхность пола. Полученные результаты, с учетом неподвижности пациентов в отделении ОРИТ и запрета пациентов в отделении ООТ выходить за пределы палат, свидетельствуют о внутрибольничном распространении непосредственно медицинским персоналом. Стоит отметить, что обнаружение РНК SARS-CoV-2 в исследуемых образцах не является доказательством жизнеспособности вируса, но свидетельствует о потенциальных путях передачи инфекции в условиях больничного стационара, которые необходимо пресекать. Структура положительных смывов в зависимости от поверхности представлена на Рисунке 33.

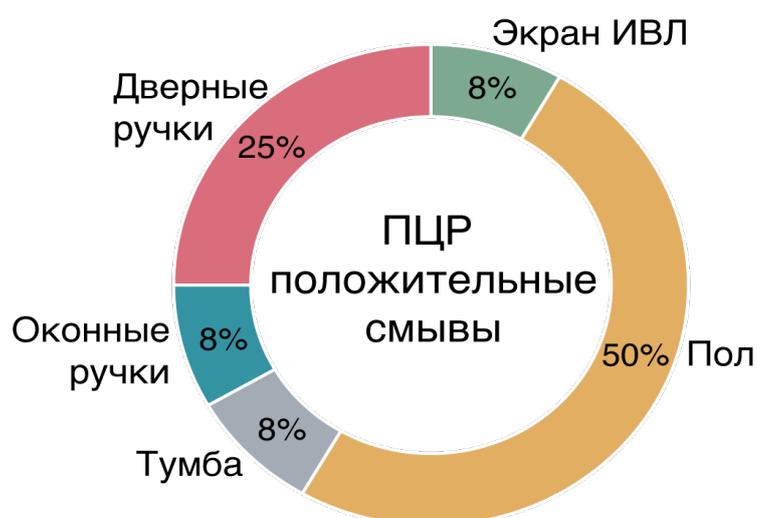


Рисунок 33 – Структура положительных смывов в зависимости от поверхности.

Следует отметить, что в ряде исследований также отмечается более высокий уровень РНК SARS-CoV-2 в отделении реанимации/отделении реанимации и интенсивной терапии по сравнению с другими отделениями медицинских учреждений, направленных на лечение пациентов с COVID-19 инфекцией [251,252]. Это можно объяснить разными факторами. Во-первых, эффективность системы активной вентиляции в отделении реанимации может быть недостаточной, хотя она может соответствовать рекомендуемым нормативным критериям не менее 2-6 полных воздухообменов в час [250]. Во-вторых, значительная контаминация РНК SARS-CoV-2 может быть связана с режимами уборки в больнице, а также с распространением самим медперсоналом. Кроме того, Siegel [253] сообщил, что вентиляторы могут быть источниками респираторных аэрозолей. Поэтому мы наблюдали большое количество РНК SARS-CoV-2 в вентилируемых боксах в отделении интенсивной терапии. В-третьих, высокая роль медицинских сотрудников в распространении и передаче различных инфекций между пациентами. Одно из крупных таких заражений наблюдались во Всероссийском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. Вредена (Санкт-Петербург,

Россия) [254]. В результате клиника была полностью изолирована и на карантине в течение 35 дней находились 474 пациента и 270 медицинских работников.

### **3.2.2 Оценка образования фомитов в непосредственной близости от пациента с COVID-19**

Одним из значительных рисков передачи патогенов, в том числе SARS-CoV-2, является контакт с зараженной поверхностью (фомитами). С начала пандемии данный способ распространения считался маловероятным, однако, современные исследования продемонстрировали большую значимость фомитов в распространения болезни [255]. Для углубленного изучения возможности образования фомитов содержащих SARS-CoV-2 вокруг пациента с COVID-19 нами был исследован аэрозоль в непосредственной близости (в радиусе 0.5 м) от пациента на наличие РНК SARS-CoV-2. Параллельно взятию мазка от пациентов были взяты образцы смывов с поверхностей предметов, которые находились в непосредственном контакте с пациентом; в частности, были взяты смывы с поверхностей прикроватной тумбы пациента, спинки кровати, кнопки вызова медперсонала, с одеяла и полотенца, ингаляционной маски (с наружной и внутренней стороны), а также с кружки, личного телефона пациента, горлышка бутылки воды и кожи кисти руки пациента. Из анамнеза известно, что пациент почувствовал первые признаки заболевания 08.06.2020, а через неделю (15.08.2020) поступил в отделение респираторных инфекций со следующими симптомами: слабость, головная боль, повышение температуры тела до 37,4 °С. ПЦР-анализ мазка на момент госпитализации подтвердил наличие РНК SARS-CoV-2 с циклом 25.4, что свидетельствует концентрации вируса  $5 \times 10^5$  ГЭ/мл. Пациенту была назначена противовирусная и антибактериальная терапия. Образцы аэрозоля и смывы с поверхностей были собраны на 3 сутки госпитализации и спустя 9 часов после утренней уборки помещений и дали отрицательный результат (Таблица 7). При этом результат ПЦР-анализа назофарингеального мазка оставался положительным с детекцией на 33 цикле (примерно  $10^4$  ГЭ/мл).

Таблица 7 – Значение цикла образцов в непосредственной близости от инфицированного пациента

| Номер точки | Точка  | Тип образца | Значения Ct |
|-------------|--|-------------|-------------|
| 62          | Тумба  | Смыв        | отр         |
| 63          | Спинка кровати   | Смыв        | отр         |
| 64          | Экран телефона   | Смыв        | отр         |
| 65          | Простынь   | Смыв        | отр         |
| 66          | Ингаляционная маска (наружная часть)                               | Смыв        | отр         |
| 80          | Ингаляционная маска (внутренняя часть)                             | Смыв        | отр         |
| 67          | Горлышко бутылки воды  | Смыв        | отр         |
| 68          | Кнопка вызова  | Смыв        | отр         |
| 69          | Личный халат   | Смыв        | отр         |
| 73          | Кружка   | Смыв        | отр         |
| 74          | Кожа на тыльной стороне кисти                                      | Смыв        | отр         |
| 76          | Личное полотенце   | Смыв        | отр         |
| 77          | Личный градусник   | Смыв        | отр         |
| 79          | Мазок из ротоглотки  | Мазок       | 33          |
| 8           | Пробоотборник на расстоянии 1,5 метров от инфицированного пациента | Аэрозоль    | отр         |
| 9           | Пробоотборник на расстоянии 0,5 метров от инфицированного пациента | Аэрозоль    | отр         |

Стоит отметить, что значения цикла (Ct) были близки к пределу обнаружения, что свидетельствует о низкой вирусной нагрузке. Причина такого низкого количества вируса может быть связана с госпитализацией пациента на поздних стадиях заболевания и их длительным пребыванием в отделении реанимации. К такому же выводу пришли и другие исследовательские группы [106]. При этом еще не известно о длительности выделения жизнеспособного вируса разными группами пациентов, что требует проведения дополнительных исследований.

### 3.2.3 Представленность возбудителей нозокомиальных инфекций бактериальной этиологии в условиях стационара

Различные поверхности, особенно в медицинских учреждениях, являются резервуаром и источником микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, таких как метициллин-устойчивый *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицин-резистентные

энтерококки и *Clostridium difficile* [256]. При этом были отмечены несколько вспышек, связанных с оказанием медицинской помощи через зараженные предметы ухода за больными [256]. Это подчеркивает необходимость проведения мониторинга и обеспечения надлежащей дезинфекции для предотвращения внутрибольничных вспышек связанных с фомитами.

Для исследования резервуаров нозокомиальных инфекций и патогенных микроорганизмов, потенциально вызывающих сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19, были использованы методы на основе количественной ПЦР и секвенирования гена 16S rRNA. Во всех образцах оценивали наличие метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus* spp. (CoNS), *Achromobacter* spp, *Burkholderia cepacia* complex, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*. В общей сложности были проанализированы 13 и 22 образца с различных поверхностей, собранных в отделении ОРИТ и ООТ соответственно. Результаты ПЦР анализа показали, что все образцы с поверхностей были контаминированными по крайней мере одним патогеном, включенным в группу тестирования (Таблица 8).

Таблица 8 – Количество положительных образцов при определении контаминации поверхностей методом ПЦР.

| Бактериальный патоген                   | ОРИТ<br>(n = 13) |                  |                   | ООТ<br>(n = 22) |                  |                    |
|---|------------------|------------------|-------------------|-----------------|------------------|--------------------|
|   | Пол<br>(n = 7)   | Ручки<br>(n = 3) | Другие<br>(n = 3) | Пол<br>(n = 6)  | Ручки<br>(n = 5) | Другие<br>(n = 11) |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>            | 7 (100%)         | 3 (100%)         | 3 (100%)          | 3 (50%)         | 3 (60%)          | 8 (72,7%)          |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>           | 1 (14,3%)        | 0 (0%)           | 0 (0%)            | 4 (66,7%)       | 1 (20%)          | 1 (9,1%)           |
| <i>Staphylococcus aureus</i>            | 1 (14,3%)        | 1 (33,3%)        | 0 (0%)            | 0 (0%)          | 0 (0%)           | 0 (0%)             |
| Коагулазонегативные стафилококки (CoNS) | 7 (100%)         | 3 (100%)         | 3 (100%)          | 6 (100%)        | 5 (100%)         | 11 (100%)          |
| <i>Achromobacter</i> spp.               | 3 (42,9%)        | 0 (0%)           | 0 (0%)            | 3 (50%)         | 0 (0%)           | 0 (0%)             |
| <i>Burkholderia cepacia</i> complex     | 0 (0%)           | 0 (0%)           | 0 (0%)            | 0 (0%)          | 0 (0%)           | 0 (0%)             |

Наиболее распространенными микроорганизмами были CoNS (n = 35), обнаруженные во всех образцах, независимо от места сбора. *Klebsiella pneumoniae* была идентифицирована в 100 % образцов в отделении ОРИТ и в 64 % образцах, собранных в отделении ООТ. По литературным данным коагулазонегативные стафилококки менее патогенны, чем золотистый стафилококк [257], но могут вызывать инфекции кожи и мягких тканей, особенно у пожилых людей и/или у лиц с ослабленным иммунитетом [258]. Среди пациентов с COVID-19 были зарегистрированы случаи инфекций кровотока CoNS и инфекций кровотока, связанных с катетером [259]. В то же время *Klebsiella pneumoniae*, которая была причиной ряда

внутрибольничных вспышек, встречается у пациентов наряду с новой коронавирусной инфекцией [260–262]. Помимо этого, в отделении ОРИТ были выявлены *Achromobacter* spp. (23%), *Staphylococcus aureus* (15%) и *Pseudomonas aeruginosa* (8%). Для образцов из отделения ООТ распределение было несколько иным, примерно в трети образцов был идентифицирована *Pseudomonas aeruginosa* (27%), в 14% - *Achromobacter* spp. В отличие от ОРИТ, *Staphylococcus aureus* в отделении ООТ не был идентифицирован. *Burkholderia cepacia* complex не найдены ни в одном из образцов. Такие бактерии как *Achromobacter* spp. и *Burkholderia cepacia* complex обычно выявляют у людей с ослабленным иммунитетом и больных муковисцидозом [263,264]. Однако, были отмечены случаи обнаружения *Burkholderia cepacia* complex и в дыхательных путях пациентов с COVID-19, у которых они способствовали развитию бактериальной пневмонии [265,266].

На поверхности дверных ручек и пола были обнаружены *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Также *P. aeruginosa* была обнаружена на смесителе раковины, расположенном в палате. Учитывая патогенный потенциал этих микроорганизмов, их выявление в отделении интенсивной терапии вызывает особую озабоченность. Результаты идентификации различных бактериальных микроорганизмов в целом согласуются с ранее опубликованными данными, несмотря на особенности организации систем здравоохранения в разных странах [267–270].

### **3.2.4 Разнообразие микробиома в зависимости от отделения и типов поверхностей**

Полученные результаты распространенности некоторых бактериальных патогенов показали большую представленность в отделении ОРИТ, что потенциально свидетельствует о наличии гетерогенности в микробиоме этих отделений. Также мы идентифицировали различную представленность бактериальных патогенов на различных поверхностях. Это служит предположением о различном вкладе каждого типа поверхности в качестве резервуара инфекции. Для проверки наших предположений мы провели секвенирование данных образцов.

Для метапрофилирования микроорганизмов бактериальной этиологии были получены последовательности варибельного региона V4 гена 16S rRNA. К полученным «сырым» данным секвенирования были применены строгие параметры фильтрации качества и удаления химерных последовательностей, в результате чего было получено 2389555 классифицируемых последовательностей, отнесенных к 8873 amplicon sequence variant (ASV), которые принадлежали к 990 родам и 357 семействам. Все образцы были нормализованы до глубины 40887 прочтений на образец.

Таксономическое распределение на уровне семейств было очень схожим между двумя отделениями (Рисунок 34А). Первые восемь наиболее распространенных семейств были практически идентичны для рассмотренных отделений. Основные различия в 15 наиболее

распространенных семейств для отделения ОРИТ были *Weeksellaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, в то время как для отделения ООТ были семейства *Flavobacteriaceae*, *Aerococcaceae*, *Prevotellaceae*. Мы также идентифицировали отличия в доминировании наиболее распространённых семейств в зависимости от типа поверхности. В целом, результаты ПЦР воспроизводились и образцы с пола продемонстрировали наибольшее разнообразие (Рисунок 34Б).

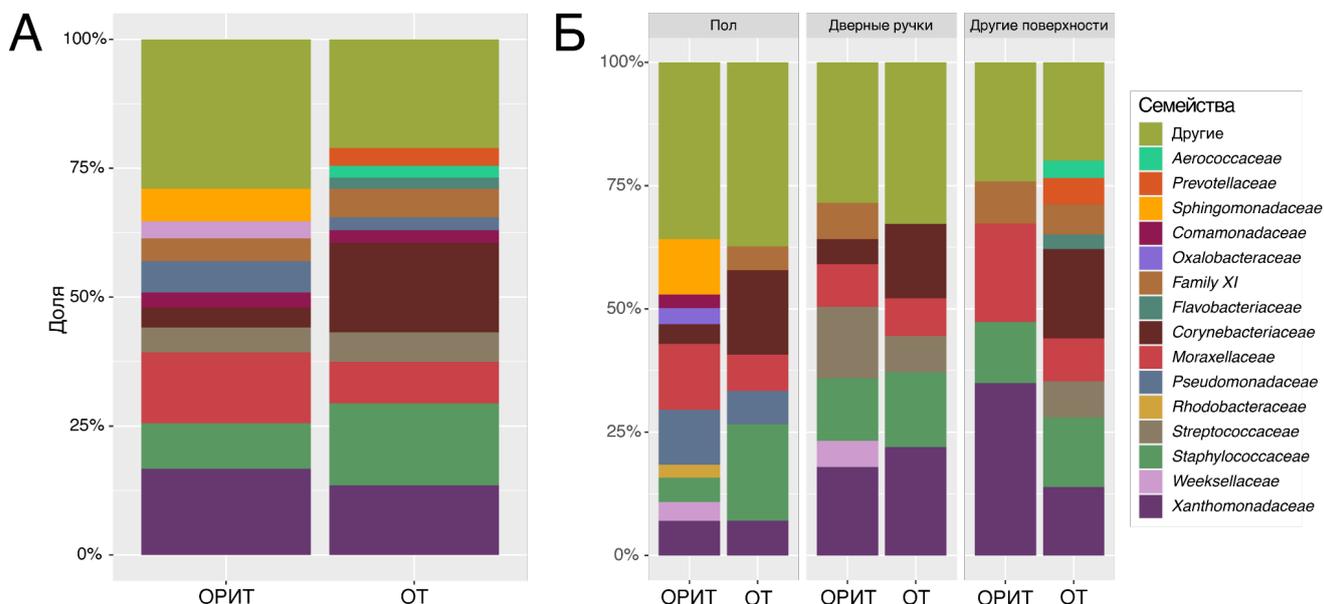


Рисунок 34 – Относительное таксономическое распределение на уровне семейств: А) в зависимости от отделения; Б) в зависимости от отделения и типа поверхности. Семейства с долей <2% указаны как «Другие».

Учитывая имеющиеся таксономические различия на уровне семейств и данным ПЦР анализа позволили нам предположить о большем разнообразии в отделении ОРИТ. Для проверки данного предположения мы провели оценку альфа-разнообразия с использованием индексов Chao1 и Shannon. Было выявлено, что наибольшее разнообразие по двум индексам демонстрируют образцы с пола независимо от отделений. Несмотря на отсутствие статистической разницы медианное значение индекса Chao1 было выше в отделении ОРИТ (1263,5) по сравнению с отделом ООТ (1045,3). Однако, разнообразие оцененным индексом Shannon позволил выявить разницу между образцами пола в различных отделениях ( $p = 0,01$ ), (Рисунок 35). Для других поверхностей значения индексов альфа-разнообразия были примерно на одинаковом уровне и отличались от пола примерно в 1,5-2 раза.

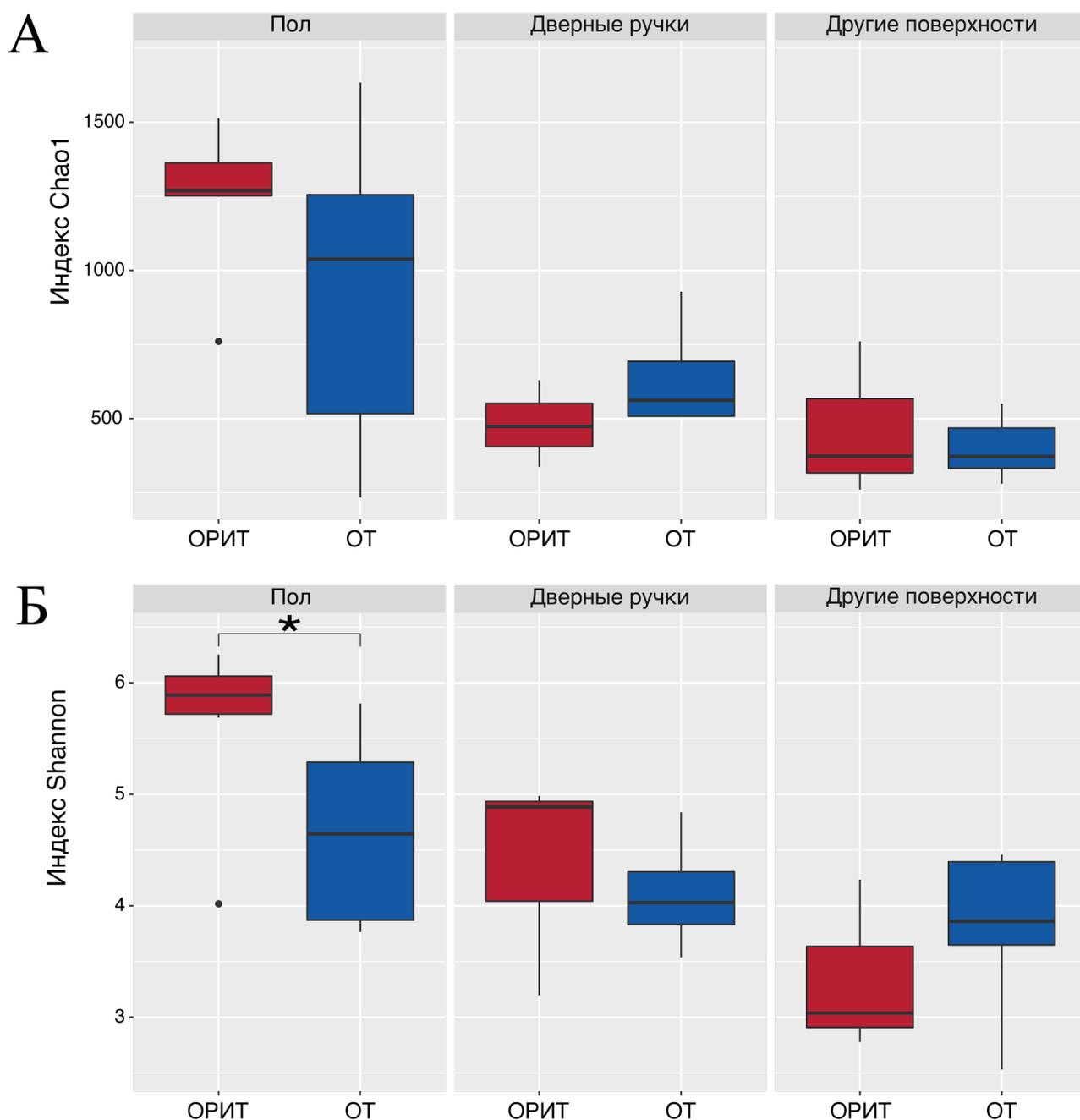


Рисунок 35 – Оценка альфа-разнообразия в зависимости от отделения и типа поверхности. А) разнообразие, оцененное индексом Chao1; Б) разнообразие, оцененное индексом Shannon

Проведенный анализ бета-разнообразия, основанный на несходстве Bray-Curtis с построением PCoA графика (Рисунок 36), продемонстрировали наличие общих и уникальных кластеров для каждого отделения и типа поверхностей. Мы наблюдали формирование отдельного кластера для образцов, полученных из ОРИТ с пола, что свидетельствует о наибольшем разнообразии данных образцов. Это также согласуется с данными альфа-разнообразия и таксономическим профилем. В многомерной модели PERMANOVA с такими переменными (предикторами) как отделение и тип образца мы обнаружили значимые различия ( $F=3,48$ ,  $R^2=0,091$ ,  $p=0,0015$  и  $F=2,24$ ,  $R^2=0,125$ ,  $p=0,0036$  соответственно).

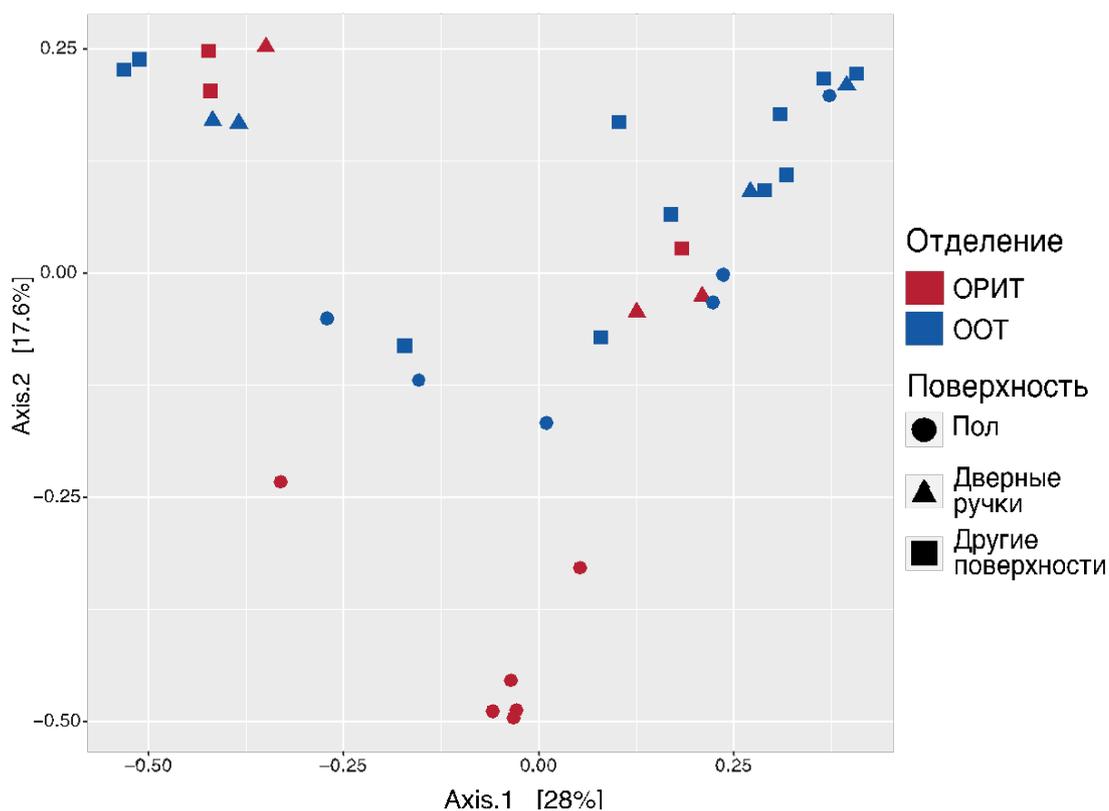


Рисунок 36 – PCoA график распределения образцов в зависимости от отделения и поверхности с использованием оценки Bray-Curtis.

С учетом полученных результатов данные поверхности (пол и дверные ручки) можно рассматривать как потенциальные резервуары внутрибольничных инфекций, повышающих риск распространения инфекции как внутри, так и за пределами стационара. По-видимому, распространение возбудителей может быть усилено медицинским персоналом, но также может быть связано с низкой эффективностью уборки и контаминацией ранее госпитализированными больными. Полученные результаты свидетельствуют об опасности недостаточной регулярной дезинфекции поверхностей вне зависимости от отделения в инфекционной больнице.

### 3.2.5 Поиск индикаторных родов

Полученные выше результаты свидетельствует о большей схожести/наличия уникальных микроорганизмов для отделений. Для лучшей характеристики микробиома различных отделений нами был использован метод машинного обучения Random Forest, который считается одним из успешных и широко используемым алгоритмом для построения прогностических моделей на основе микробиома [271]. В качестве классификационных признаков были использованы бактериальные рода. Модель имела коэффициент ошибок вне пакета (Out-of-bag estimate of error rate), равный 25,71%, причем наибольшая ошибка класса (42,86%) была обнаружена для 6 образцов из ОРИТ, ошибочно отнесенных к ООТ. Это может объясняться большим количеством образцов из отделения ООТ по отношению к образцам из

отделения ОРИТ (21 образец против 14 образцов соответственно). В результате анализа были определены пятнадцать различных родов, являющихся важными для правильной классификации отделений. Среди них наибольшую значимость имели рода *Prevotella*, *Polaromonas*, *Psychrobacter* и *Corynebacterium* (значения MDA 30,349; 20,570; 16,659 и 15,686 соответственно; Рисунок 37).

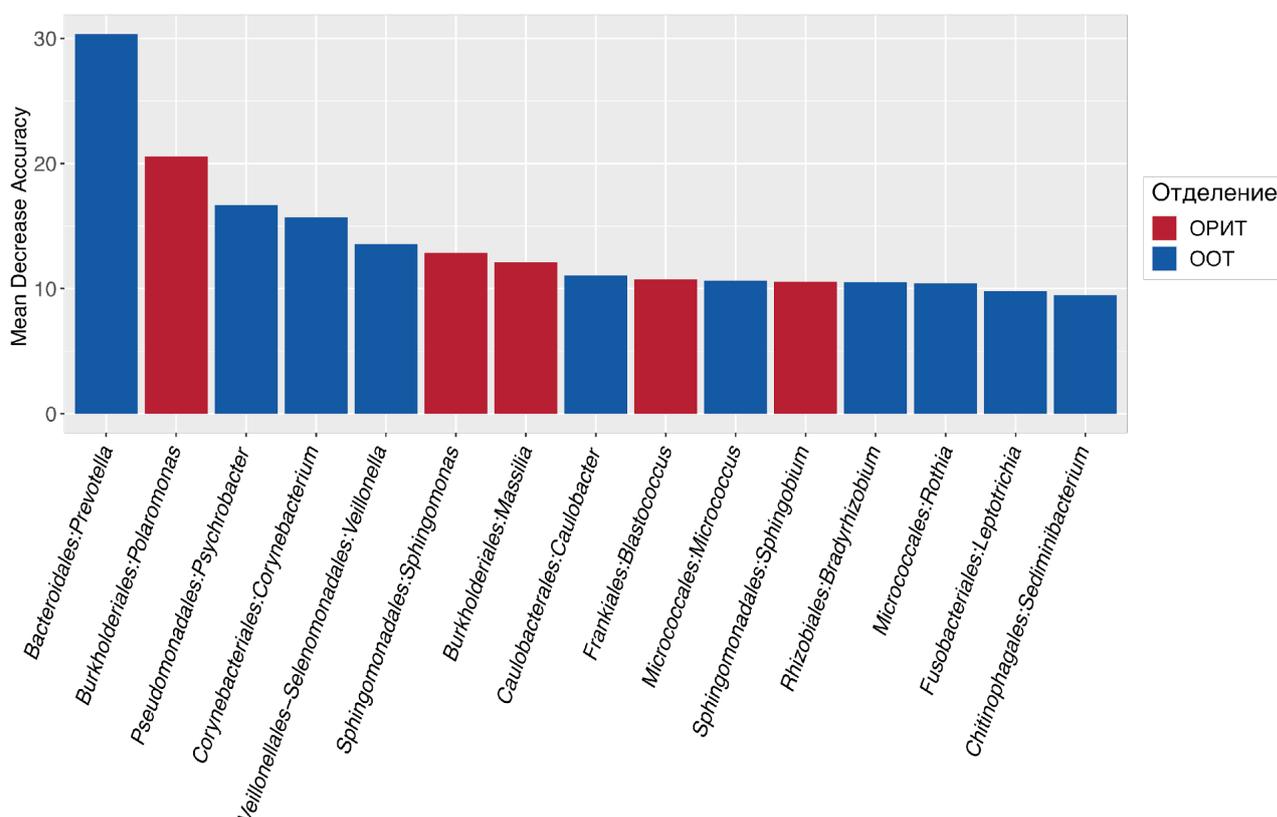


Рисунок 37 – Результаты анализа с использованием Random Forest образцов ОРИТ (n = 12) и образцов ООТ (n = 21), показывающий таксономические признаки с наивысшей важностью переменной классификации для правильной идентификации отдела.

Роды *Polaromonas*, *Sphingomonas* и *Massilia* были наиболее характерны для отделения ОРИТ, тогда как роды *Prevotella*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium* и *Veillonella* были наиболее характерны для ООТ. Данные рода можно рассматривать в качестве маркерных для идентификации отделения. Стоит отметить, что представителями данных родов являются комменсалы человека, а также широко встречающиеся в окружающей среде микроорганизмы. Однако, для некоторых родов была показана взаимосвязь с инфицированием COVID-19. По литературным данным представители рода *Sphingomonas* [272] были обнаружены в кровотоке пациентов с COVID-19, представители рода *Prevotella* встречались в верхних дыхательных путях пациентов с инфекцией SARS-CoV-2, в то время, как *Corynebacterium* были более распространены у пациентов у условно-здоровых людей или же пациентов с низкой вирусной нагрузкой SARS-CoV-2 [273]. Анализ микробиома ротоглотки пациентов с COVID-19 продемонстрировал высокий уровень рода *Veillonella* [274]. Zhong с соавторами [265]

сравнили респираторный микробиом пациентов с легким и тяжелым течением COVID-19. Среди 17 наиболее представленных родов, которые были обнаружены как минимум у 60% исследуемых пациентов, рода *Veillonella* и *Prevotella* в подавляющем большинстве встречались у пациентов с легким течением. В другом исследовании наличие *Prevotella* в микробиоме респираторного тракта также свидетельствовало о более лёгком течении болезни [275]. Стоит отметить, что проведение сравнительного анализа между различными исследованиями не совсем корректно ввиду различных дизайнов экспериментов и участия различных пациентов. Тем не менее, можно отметить общие черты между микробиомом респираторного тракта пациентов с COVID-19 и микробиомом окружающей среды и потенциального его влияния на тяжесть протекания болезни, что безусловно заслуживает дальнейших исследований.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была проведена комплексная оценка эффективности различных методов сбора аэрозоля, включая их сравнение со смывами с поверхностей использующихся в качестве широко распространенного стандартного метода оценки микробиома. В качестве критериев использовали различные индексы оценки альфа-разнообразия, а также характеризовали культивируемые микроорганизмы в собранных образцах. По совокупности исследованных характеристик, наибольшую эффективность продемонстрировал метод Cyclone-SASS. При этом, микробный состав биоаэрозоля и поверхностей отличался лишь незначительно, демонстрируя большее разнообразие в аэрозоле воздуха. В работе проведена характеристика культивируемого и некультивируемого микробиомов контрастных станций метрополитена г. Москвы. Для оценки культивируемого микробиома были использованы богатые питательные среды. В результате было выделено 48 различных морфотипов. Типирование данных морфотипов позволило определить 19 различных видов микроорганизмов, относящихся к 15 родам. Среди данных видов были микроорганизмы с высоким патогенным потенциалом (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*), а также оппортунистические патогены (*Ralstonia pickettii*, *Micrococcus luteus*, *Brevundimonas diminuta*, *Aerococcus viridans*, *Acinetobacter schindleri*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas stutzeri*, *Kocuria rosea*). Было продемонстрировано отличие в культивируемом микробиоме в зависимости от станций и типа образца. Так, микробиом образцов, собранных на станции Новокосино был представлен комменсальными и условно-патогенными микроорганизмами (различные виды *Staphylococcus*, *Micrococcus luteus*, *Aerococcus viridans*), в то время как станция Черкизовская характеризовалась меньшим количеством комменсальных видов и преобладанием почвенных микроорганизмов и грибов (*Paenibacillus* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* и *Mucor* spp.). Данные различия, по всей видимости, связаны с длительностью эксплуатации станций и различным уровнем пассажиропотока.

Проведенное исследование культивируемого микробиома позволили провести фенотипическую проверку устойчивости к антибактериальным препаратам. Была показана устойчивость к различным классам антибиотиков, в том числе из списка ЖВНЛП: макролидам, фторхинолонам, пенициллинам, защищенным бета-лактамам, аминогликозидам, а также к полипептидному антибиотику. Эти результаты являются подтверждение широкого распространения резистентности в городских условиях и, прежде всего, в аэрозоле. Это может приводить к распространению генов устойчивости между различными бактериями, делая окружающую городскую среду «резервуаром» различных факторов распространения АБР.

В работе представлены результаты метапрофилирования некультивируемого микробиома образцов аэрозоля и поверхностей двух станций метрополитена. Данные результаты подтвердили различия, выявленные на этапе культивирования. Помимо этого, было показано наличие общих и отличающихся родов в зависимости от метода сбора, станции и пассажиропотока. Наиболее распространенными были рода *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* и *Ralstonia*, которые в целом широко распространены в окружающей среде и являются комменсалами кожи человека. Увеличение пассажиропотока на станции Новокосино коррелировало с изменением доли родов *Corynebacterium*, *Methylobacterium* и *Staphylococcus* в аэрозоле и на поверхности. На станции Черкизовская было отмечено снижение разнообразия микробиома поверхностей за счет преобладания родов *Cutibacterium* и *Rheinheimera*. При этом мы отмечаем относительно стабильный состав родов в образцах аэрозоля независимо от уровня пассажиропотока. По данным метапрофилирования были выявлены роды *Methylobacterium* и *Cupriavidus*, которые могут выступать в качестве биологических индикаторов загрязнения окружающей среды в условиях метрополитена.

Сравнительный анализ с ранее проведенным исследованием микробиома поверхностей Московского метрополитена независимо от особенностей различных станций и времени года позволил выявить пятнадцать родов, встречающихся на всех исследованных станциях. Данные микроорганизмы представляют собой «коровый» микробиом Московского метрополитена. Среди этих бактерий *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Данные бактерии широко распространены в местах нахождения людей и являются компонентами микробиома человека.

В данной работе также был проведен молекулярно-эпидемиологический мониторинг в условиях COVID-стационара. В совокупности разработанный протокол сбора образцов и их последующего анализа показал свою эффективность для идентификации РНК вируса SARS-CoV-2, а также поиска резервуаров бактериальных патогенов, способных вызвать сочетанные инфекции у пациентов с COVID-19. По результатам проведенного исследования были внесены предложения к практическим рекомендациям для предотвращения внутрибольничного распространения инфекционных агентов.

На основании проведенных исследований была продемонстрирована перспективность анализа микробиома в замкнутых пространствах городской среды для решения различных задач, связанных с защитой здоровья людей. Разработанный подход возможно не только интегрировать в существующие системы мониторинга биологической безопасности в городской среде, но и использовать для разработки новых методов мониторинга биоразнообразия и способов управления микробиомом для снижения негативных последствий.

## ВЫВОДЫ

1. Сравнительный анализ систем сбора аэрозоля позволил определить в качестве оптимального метода сбора высокопроизводительный пробоотборник Cyclone-SASS, обладающий наибольшей эффективностью сбора и разнообразием собираемого микробиома.
2. Культивируемый микробиом станции Новокосино в основном представлен комменсальными и условно-патогенными микроорганизмами (*Staphylococcus* spp., *M. luteus*, *A. viridans*), а станция Черкизовская характеризовалась преобладанием почвенных микроорганизмов и грибов (*Paenibacillus* spp., *P. stutzeri*, *Aspergillus* spp. и *Mucor* ssp.).
3. На станциях Московского метрополитена присутствуют следующие условно патогенные микроорганизмы: *A. viridans*, *B. borstelensis*, *Paenibacillus* spp., *S. mizutaii*, *Staphylococcus* spp., *S. albus*, *M. luteus*, обладающие устойчивостью к антибиотикам. Значительно более представленными такие микроорганизмы были на станции Черкизовская, что, по всей видимости, связано с длительностью ее эксплуатации и большим пересечением потоков людей из различных транспортных систем.
4. Несмотря на преобладание во всех образцах родов *Acinetobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Ralstonia*, *Corynebacterium* и *Cutibacterium* отмечается различная их представленность на каждой станции. Увеличение пассажиропотока приводит к изменению представленности родов *Corynebacterium*, *Methylobacterium*, *Staphylococcus*, *Cupriavidus*, *Stenotrophomonas*, *Cutibacterium*, *Ralstonia* как в аэрозоле, так и на поверхностях.
5. Состав микроорганизмов в аэрозоле и на поверхностях на станциях Московского метрополитена пересекаются на 40,2%-59,0%, при этом микробиом аэрозоля воздуха независимо от станции более разнообразен, с долей уникальных родов 36,9%-55,9% от общего количества идентифицируемых родов.
6. Наличие РНК SARS-CoV-2 в аэрозоле воздуха было установлено только в отделении реанимации и интенсивной терапии COVID-стационара, в то время как поверхности были контаминированы как в отделении реанимации и интенсивной терапии, так и в отделении общей терапии.
7. Основными потенциальными источниками-резервуарами бактериальных инфекций являются поверхности с постоянным контактом (пол, дверные ручки). На данных поверхностях детектировано высокое разнообразие микроорганизмов, в том числе, присутствие *Klebsiella pneumoniae* и коагулазонегативных стафилококков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdel Hameed A.A. et al. Diurnal distribution of airborne bacteria and fungi in the atmosphere of Helwan area, Egypt // *Sci. Total Environ.* Elsevier B.V., 2009. Vol. 407, № 24. P. 6217–6222.
2. Hurtado L. et al. Characterization of atmospheric bioaerosols at 9 sites in Tijuana, Mexico // *Atmos. Environ.* 2014. Vol. 96. P. 430–436.
3. Schijven J. et al. Quantitative Microbial Risk Assessment for Airborne Transmission of SARS-CoV-2 via Breathing, Speaking, Singing, Coughing, and Sneezing // *Environ. Health Perspect.* 2021. Vol. 129, № 4. P. 47002.
4. Ma Y. et al. Assessment for the impact of dust events on measles incidence in western China // *Atmos. Environ.* Elsevier Ltd, 2017. Vol. 157. P. 1–9.
5. Shiomori T. et al. Evaluation of bedmaking-related airborne and surface methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination // *J. Hosp. Infect.* 2002. Vol. 50, № 1. P. 30–35.
6. Coleman K.K., Sigler W. V. Airborne Influenza A Virus Exposure in an Elementary School // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–7.
7. Douglas P. et al. A systematic review of the public health risks of bioaerosols from intensive farming // *Int. J. Hyg. Environ. Health.* Elsevier, 2018. Vol. 221, № 2. P. 134–173.
8. Eduard W. et al. Bioaerosol exposure assessment in the workplace: The past, present and recent advances // *J. Environ. Monit.* 2012. Vol. 14, № 2. P. 334–339.
9. Viegas C. et al. Assessment of fungal contamination in waste sorting and incineration - Case study in Portugal // *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues.* 2014. Vol. 77, № 1–3. P. 57–68.
10. Erkara I.P. et al. Airborne *Alternaria* and *Cladosporium* species and relationship with meteorological conditions in Eskisehir City, Turkey // *Environ. Monit. Assess.* 2008. Vol. 144, № 1–3. P. 31–41.
11. Jones A.M., Harrison R.M. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - A review // *Sci. Total Environ.* 2004. Vol. 326, № 1–3. P. 151–180.
12. Pepeljnjak S., Šegvić M. Occurrence of fungi in air and on plants in vegetation of different climatic regions in Croatia // *Aerobiologia (Bologna).* 2003. Vol. 19, № 1. P. 11–19.
13. Baker R.E. et al. Infectious disease in an era of global change // *Nat. Rev. Microbiol.* Springer US, 2021. Vol. 0123456789.
14. Fujiyoshi S., Tanaka D., Maruyama F. Transmission of airborne bacteria across built environments and its measurement standards: A review // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8, № NOV.
15. Tselebonis A. et al. Air contamination in different departments of a tertiary hospital. assessment of microbial load and of antimicrobial susceptibility // *Biomedicines.* 2020. Vol. 8, № 6. P. 1–9.
16. Schaal K.P. Medical and microbiological problems arising from airborne infection in

- hospitals // *J. Hosp. Infect.* 1991. Vol. 18, № SUPPL. A. P. 451–459.
17. Stanton I.C. et al. What is the research evidence for antibiotic resistance exposure and transmission to humans from the environment? A systematic map protocol // *Environ. Evid. BioMed Central*, 2020. Vol. 9, № 1. P. 1–8.
  18. Access O. The Metagenomics and Metadesign of the Subways and Urban Biomes (MetaSUB) International Consortium inaugural meeting report // *Microbiome*. 2016. Vol. 4, № 1. P. 24.
  19. Klimenko N.S. et al. Co-occurrence patterns of bacteria within microbiome of Moscow subway // *Comput. Struct. Biotechnol. J. The Authors*, 2020. Vol. 18, № February. P. 314–322.
  20. El Rakaiby M.T. et al. Hospital Microbiome Variations As Analyzed by High-Throughput Sequencing // *Omi. A J. Integr. Biol.* 2019. Vol. 23, № 9. P. 426–438.
  21. Haak B.W., Wiersinga W.J. Uncovering hidden antimicrobial resistance patterns within the hospital microbiome // *Nat. Med. Springer US*, 2020. Vol. 26, № 6. P. 826–828.
  22. Rampelotto P.H. et al. Exploring the hospital microbiome by high-resolution 16s rRNA profiling // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 12. P. 1–17.
  23. Stal L.J. Nitrogen Fixation in Cyanobacteria // *eLS*. 2015. P. 1–9.
  24. Zehr J.P. Nitrogen fixation by marine cyanobacteria // *Trends Microbiol. Elsevier Ltd*, 2011. Vol. 19, № 4. P. 162–173.
  25. Aasfar A. et al. Nitrogen Fixing Azotobacter Species as Potential Soil Biological Enhancers for Crop Nutrition and Yield Stability // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № February. P. 1–19.
  26. Plunkett M.H., Knutson C.M., Barney B.M. Key factors affecting ammonium production by an *Azotobacter vinelandii* strain deregulated for biological nitrogen fixation // *Microb. Cell Fact. BioMed Central*, 2020. Vol. 19, № 1. P. 1–12.
  27. Wang Q., Liu J., Zhu H. Genetic and molecular mechanisms underlying symbiotic specificity in legume-rhizobium interactions // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9, № March. P. 1–8.
  28. Lindström K., Mousavi S.A. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia // *Microb. Biotechnol.* 2020. Vol. 13, № 5. P. 1314–1335.
  29. Okabe S. et al. Topics in Ecological and Environmental Microbiology: Sulfur Cycle // *Water Sci. Technol.* 1998. Vol. 37, № 4–5. P. 131–138.
  30. Dai X. et al. Genome sequencing of *sulfolobus* sp. A20 from costa rica and comparative analyses of the putative pathways of carbon, nitrogen, and sulfur metabolism in various *sulfolobus* strains // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7, № NOV.
  31. Vidyalakshmi R., Paranthaman R., Bhakyaraj R. Sulphur Oxidizing Bacteria and Pulse Nutrition-A Review // *World J. Agric. Sci.* 2009. Vol. 5, № 3. P. 270–278.
  32. Rashid M.I. et al. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils // *Microbiol. Res. Elsevier GmbH*, 2016. Vol. 183. P. 26–41.

33. Of A.S., Nutrients I., Food M. Chapter 14 A Source of Inorganic Nutrients and Microbial Food. 1973. P. 277–300.
34. Dekaboruah E. et al. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role // Arch. Microbiol. Springer Berlin Heidelberg, 2020. Vol. 202, № 8. P. 2147–2167.
35. Rackaityte E., Lynch S. V. The human microbiome in the 21st century // Nat. Commun. Springer US, 2020. Vol. 11, № 1. P. 19–21.
36. Ursell L.K. et al. Defining the human microbiome // Nutr. Rev. 2012. Vol. 70, № SUPPL. 1.
37. Gallo R.L. Human Skin Is the Largest Epithelial Surface for Interaction with Microbes // J. Invest. Dermatol. 2017. Vol. 137, № 6. P. 1213–1214.
38. Oh J. et al. Temporal Stability of the Human Skin Microbiome // Cell. 2016. Vol. 165, № 4. P. 854–866.
39. Dorrestein P.C., Gallo R.L., Knight R. Microbial Skin Inhabitants: Friends Forever // Cell. Elsevier Inc., 2016. Vol. 165, № 4. P. 771–772.
40. Lax S. et al. Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital // Sci. Transl. Med. 2017. Vol. 9, № 391. P. 1–11.
41. Byrd A.L., Belkaid Y., Segre J.A. The human skin microbiome // Nat. Rev. Microbiol. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 16, № 3. P. 143–155.
42. Scholz C.F.P., Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus propionibacterium to the proposed novel genera acidipropionibacterium gen. nov., cutibacterium gen. nov. and pseudopropionibacterium gen. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2016. Vol. 66, № 11. P. 4422–4432.
43. Vijaya Chandra S.H. et al. Cutaneous Malassezia: Commensal, Pathogen, or Protector? // Front. Cell. Infect. Microbiol. 2021. Vol. 10, № January. P. 1–16.
44. Tao R., Li R., Wang R. Skin microbiome alterations in seborrheic dermatitis and dandruff: A systematic review // Exp. Dermatol. 2021. Vol. 30, № 10. P. 1546–1553.
45. Findley K. et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin // Nature. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 498, № 7454. P. 367–370.
46. Zipperer A. et al. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization // Nature. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 535, № 7613. P. 511–516.
47. Teruaki Nakatsuji, Tiffany H. Chen, Saisindhu Narala, Kimberly A. Chun, Aimee M. Two, Tong Yun, Faiza Shafiq, Paul F. Kotel, Amina Bouslimani, Alexey V. Melnik, Haythem Latif, Ji-Nu Kim, Alexandre Lockhart, Keli Artis, Gloria David, Patricia Taylor, Joann R.L.G. Antimicrobials from Human Skin Commensal Bacteria Protect against Staphylococcus aureus and Are Deficient in Atopic Dermatitis // Sci. Transl. Med. 2017. Vol. 378, № 9. P. eaah4680.
48. Man W.H., De Steenhuijsen Pitsers W.A.A., Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: Gatekeeper to respiratory health // Nat. Rev. Microbiol. Nature Publishing Group,

2017. Vol. 15, № 5. P. 259–270.
49. Holt P.G. et al. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract // *Nat. Rev. Immunol.* 2008. Vol. 8, № 2. P. 142–152.
  50. Bogaert D., De Groot R., Hermans P.W.M. Streptococcus pneumoniae colonisation: The key to pneumococcal disease // *Lancet Infect. Dis.* 2004. Vol. 4, № 3. P. 144–154.
  51. Yun Y. et al. Environmentally determined differences in the murine lung microbiota and their relation to alveolar architecture // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 12. P. 1–24.
  52. Olszak T. et al. Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function // *Science (80- )*. 2012. Vol. 336, № 6080. P. 489–493.
  53. Tap J. et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core // *Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 11, № 10. P. 2574–2584.
  54. Kho Z.Y., Lal S.K. The human gut microbiome - A potential controller of wellness and disease // *Front. Microbiol.* 2018. Vol. 9, № AUG. P. 1–23.
  55. Hooper L. V., Gordon J.I. Commensal host-bacterial relationships in the gut // *Science (80)*. 2001. Vol. 292, № 5519. P. 1115–1118.
  56. Cox L.M., Blaser M.J. Pathways in microbe-induced obesity // *Cell Metab.* 2013. Vol. 17, № 6. P. 883–894.
  57. Bergman E.N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species // *Physiol. Rev.* 1990. Vol. 70, № 2. P. 567–590.
  58. Cooke R. et al. Measuring, monitoring and managing the psychological well-being of first year university students // *Br. J. Guid. Couns.* 2006. Vol. 34, № 4. P. 505–517.
  59. Geleijnse J.M. et al. Dietary intake of menaquinone is associated with a reduced risk of coronary heart disease: The Rotterdam Study // *J. Nutr.* 2004. Vol. 134, № 11. P. 3100–3105.
  60. Gominak S.C. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a “pro-inflammatory” state associated with atherosclerosis and autoimmun // *Med. Hypotheses.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 94. P. 103–107.
  61. Voroshilina E.S. et al. Prevalence of lactobacillus iners in the vaginal microbiota of women with moderate dysbiosis is associated with clinical symptoms of infectious inflammatory condition of the vagina // *Bull. Russ. State Med. Univ.* 2017. Vol. 6, № 2. P. 43–47.
  62. Sokol H. et al. Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 43. P. 16731–16736.
  63. Polk D.B., Peek R.M. Helicobacter pylori: Gastric cancer and beyond // *Nat. Rev. Cancer.* Nature Publishing Group, 2010. Vol. 10, № 6. P. 403–414.
  64. Plowright R.K. et al. Pathways to zoonotic spillover // *Nat. Rev. Microbiol.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 15, № 8. P. 502–510.
  65. Fedorova M. V. et al. Dissemination of Invasive Mosquito Species, Aedes (Stegomyia)

- aegypti (L., 1762) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse, 1895) in the South of Krasnodar Region, Russia // *Probl. Part. Danger. Infect.* 2018. Vol. 771, № 2. P. 101–105.
66. Shaikovich E. V. et al. Invasive mosquito species *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* on the Black Sea coast of the Caucasus: genetics (COI, ITS2), *Wolbachia* and *Dirofilaria* infections // *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii.* 2018. Vol. 22, № 5. P. 574–585.
  67. Medeiros A.S. et al. Dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in urban areas in the state of Rio Grande do Norte, Brazil: Importance of virological and entomological surveillance // *PLoS One.* 2018. Vol. 13, № 3. P. 1–11.
  68. Mutebi J.P. et al. Yellow fever virus infectivity for Bolivian *Aedes aegypti* mosquitoes // *Emerg. Infect. Dis.* 2004. Vol. 10, № 9. P. 1657–1660.
  69. Sayfullin M.A. et al. Chikungunya fever in a child after visiting Thailand // *Pediatr. - Zhurnal im G.N. Speranskogo.* 2020. Vol. 99, № 6. P. 271–275.
  70. Jansen S. et al. Vector competence of the invasive mosquito species *Aedes koreicus* for arboviruses and interference with a novel insect specific virus // *Viruses.* 2021. Vol. 13, № 12.
  71. Leung M.H.Y. et al. Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics. 2014. Vol. 80, № 21. P. 6760–6770.
  72. Kembel S.W. et al. Architectural design influences the diversity and structure of the built environment microbiome // *ISME J. Nature Publishing Group,* 2012. Vol. 6, № 8. P. 1469–1479.
  73. Kettleson E. et al. *Stenotrophomonas*, *Mycobacterium*, and *Streptomyces* in home dust and air: Associations with moldiness and other home/family characteristics // *Indoor Air.* 2013. Vol. 23, № 5. P. 387–396.
  74. Stephens B. What Have We Learned about the Microbiomes of Indoor Environments? // *mSystems.* 2016. Vol. 1, № 4. P. 1–9.
  75. Thomas R.J. Particle size and pathogenicity in the respiratory tract // *Virulence.* 2013. Vol. 4, № 8.
  76. Božič A., Kanduč M. Relative humidity in droplet and airborne transmission of disease // *J. Biol. Phys.* 2021. Vol. 47, № 1. P. 1–29.
  77. Xie X. et al. How far droplets can move in indoor environments - revisiting the Wells evaporation-falling curve // *Indoor Air.* 2007. Vol. 17, № 3. P. 211–225.
  78. Gralton J. et al. The role of particle size in aerosolised pathogen transmission: A review // *J. Infect. Elsevier Ltd,* 2011. Vol. 62, № 1. P. 1–13.
  79. Thomas R.J. et al. Characterization and deposition of respirable large- and small-particle bioaerosols // *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 74, № 20. P. 6437–6443.
  80. Leung N.H.L. Transmissibility and transmission of respiratory viruses // *Nat. Rev. Microbiol. Springer US,* 2021. Vol. 19, № 8. P. 528–545.
  81. Gilbert Y., Duchaine C. Bioaerosols in industrial environments: A review // *Can. J. Civ. Eng.*

2009. Vol. 36, № 12. P. 1873–1886.
82. Amerithrax or Anthrax Investigation. [Электронный ресурс]. 2011. URL: <https://www.fbi.gov/history/famous-cases/amerithrax-or-anthrax-investigation> (дата обращения: 10.01.2022).
  83. Gilbert J.A. et al. Current understanding of the human microbiome // *Nat. Med.* 2018. Vol. 24, № 4. P. 392–400.
  84. Prussin A.J., Marr L.C. Sources of airborne microorganisms in the built environment // *Microbiome*. *Microbiome*, 2015. Vol. 3. P. 78.
  85. Nazaroff W.W. Indoor bioaerosol dynamics // *Indoor Air*. 2016. Vol. 26, № 1. P. 61–78.
  86. Meadow J.F. et al. Humans differ in their personal microbial cloud // *PeerJ*. 2015. Vol. 2015, № 9. P. 1–22.
  87. Bhangar S. et al. Chamber bioaerosol study: Human emissions of size-resolved fluorescent biological aerosol particles // *Indoor Air*. 2016. Vol. 26, № 2. P. 193–206.
  88. Qian J. et al. Size-resolved emission rates of airborne bacteria and fungi in an occupied classroom // *Indoor Air*. 2012. Vol. 22, № 4. P. 339–351.
  89. Timm C.M. et al. Isolation and characterization of diverse microbial representatives from the human skin microbiome // *Microbiome*. *Microbiome*, 2020. Vol. 8, № 1. P. 1–12.
  90. Charlson E.S. et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2011. Vol. 184, № 8. P. 957–963.
  91. Kumpitsch C. et al. The microbiome of the upper respiratory tract in health and disease // *BMC Biol.* *BMC Biology*, 2019. Vol. 17, № 1. P. 1–20.
  92. Dick E.C. et al. Aerosol Transmission of Rhinovirus Colds // *J. Infect. Dis.* 1987. Vol. 156, № 3. P. 442–448.
  93. Leung N.H.L. et al. Respiratory virus shedding in exhaled breath and efficacy of face masks // *Nat. Med.* *Springer US*, 2020. Vol. 26, № 5. P. 676–680.
  94. Castaño N. et al. Fomite Transmission, Physicochemical Origin of Virus-Surface Interactions, and Disinfection Strategies for Enveloped Viruses with Applications to SARS-CoV-2 // *ACS Omega*. 2021. Vol. 6, № 10. P. 6509–6527.
  95. Nardell E.A. Transmission and institutional infection control of tuberculosis // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016. Vol. 6, № 2.
  96. Tellier R. et al. Recognition of aerosol transmission of infectious agents: A commentary // *BMC Infect. Dis.* *BMC Infectious Diseases*, 2019. Vol. 19, № 1. P. 1–9.
  97. Wainwright C.E. et al. Cough-generated aerosols of *Pseudomonas aeruginosa* and other Gram-negative bacteria from patients with cystic fibrosis // *Thorax*. 2009. Vol. 64, № 11. P. 926–931.
  98. Chen C., Zhao B. Review of relationship between indoor and outdoor particles: I/O ratio, infiltration factor and penetration factor // *Atmos. Environ.* *Elsevier Ltd*, 2011. Vol. 45, № 2. P. 275–288.

99. Prussin A.J., Garcia E.B., Marr L.C. Total concentrations of virus and bacteria in indoor and outdoor air // *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2015. Vol. 2, № 4. P. 84–88.
100. Milton D.K. Risk of sick leave associated with outdoor air supply rate, humidification, and occupant complaints // *Indoor Air.* 2000. Vol. 10, № 4. P. 212–221.
101. Myatt T.A. et al. Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2004. Vol. 169, № 11. P. 1187–1190.
102. Horve P.F. et al. Identification of SARS-CoV-2 RNA in healthcare heating, ventilation, and air conditioning units // *Indoor Air.* 2021. Vol. 31, № 6. P. 1826–1832.
103. Krambrich J. et al. SARS-CoV-2 in hospital indoor environments is predominantly non-infectious // *Virol. J. BioMed Central*, 2021. Vol. 18, № 1. P. 1–9.
104. Sodiq A. et al. Addressing COVID-19 contagion through the HVAC systems by reviewing indoor airborne nature of infectious microbes: Will an innovative air recirculation concept provide a practical solution? // *Environ. Res. Elsevier Inc.*, 2021. Vol. 199, № March. P. 111329.
105. Mouchtouri V.A. et al. Environmental contamination of SARS-CoV-2 on surfaces, air-conditioner and ventilation systems // *Int. J. Hyg. Environ. Health. Elsevier GmbH*, 2020. Vol. 230, № July. P. 113599.
106. Nissen K. et al. Long-distance airborne dispersal of SARS-CoV-2 in COVID-19 wards // *Sci. Rep. Nature Publishing Group UK*, 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–9.
107. Bernstein R.S. et al. Exposures to Respirable, Airborne Penicillium from a Contaminated Ventilation System: Clinical, Environmental and Epidemiological Aspects // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1983. Vol. 44, № 3. P. 161–169.
108. Zhang B.Y., Liu F., Chen X.D. The effect of Legionella pneumophila contamination in the surface dust of the air ducts of central air conditioning systems on indoor air quality // *Int. J. Vent.* 2015. Vol. 14, № 3. P. 231–240.
109. Correia G. et al. Airborne route and bad use of ventilation systems as non-negligible factors in SARS-CoV-2 transmission // *Med. Hypotheses. Elsevier*, 2020. Vol. 141, № April. P. 109781.
110. Almilaji O. Air recirculation role in the spread of covid-19 onboard the diamond princess cruise ship during a quarantine period // *Aerosol Air Qual. Res.* 2021. Vol. 21, № 4.
111. Azimi P. et al. Mechanistic transmission modeling of COVID-19 on the Diamond Princess cruise ship demonstrates the importance of aerosol transmission // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2021. Vol. 118, № 8.
112. Johnson D. et al. Aerosol generation by modern flush toilets // *Aerosol Sci. Technol.* 2013. Vol. 47, № 9. P. 1047–1057.
113. Gerba C.P., Wallis C., Melnick J.L. Microbiological Hazards of Household Toilets: Droplet Production and the Fate of Residual Organisms // *Appl. Microbiol.* 1975. Vol. 30, № 2. P. 229–237.
114. Barker J., Jones M. V. The potential spread of infection caused by aerosol contamination of

- surfaces after flushing a domestic toilet // *J. Appl. Microbiol.* 2005. Vol. 99, № 2. P. 339–347.
115. Knowlton S.D. et al. Bioaerosol concentrations generated from toilet flushing in a hospital-based patient care setting // *Antimicrob. Resist. Infect. Control. Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2018. Vol. 7, № 1. P. 1–8.
  116. S.B. Levy. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance // *J. Antimicrob. Chemother.* 2002. Vol. 49. P. 25–30.
  117. Hota B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: Are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? // *Clin. Infect. Dis.* 2004. Vol. 39, № 8. P. 1182–1189.
  118. Best E.L. et al. The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* from symptomatic patients // *Clin. Infect. Dis.* 2010. Vol. 50, № 11. P. 1450–1457.
  119. Drees M. et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci // *Clin. Infect. Dis.* 2008. Vol. 46, № 5. P. 678–685.
  120. Malamou-Ladas H. et al. Isolation of *Clostridium difficile* from patients and the environment of hospital wards // *J. Clin. Pathol.* 1983. Vol. 36, № 1. P. 88–92.
  121. Shaughnessy M.K. et al. Evaluation of Hospital Room Assignment and Acquisition of *Clostridium difficile* Infection // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2011. Vol. 32, № 3. P. 201–206.
  122. Chang C.W., Hung P.Y. Evaluation of sampling techniques for detection and quantification of airborne legionellae at biological aeration basins and shower rooms // *J. Aerosol Sci. Elsevier*, 2012. Vol. 48, № 17. P. 63–74.
  123. Deloge-Abarkan M. et al. Detection of airborne *Legionella* while showering using liquid impingement and fluorescent in situ hybridization (FISH) // *J. Environ. Monit.* 2007. Vol. 9, № 1. P. 91–97.
  124. Perkins S.D. et al. Potentially pathogenic bacteria in shower water and air of a stem cell transplant unit // *Appl. Environ. Microbiol.* 2009. Vol. 75, № 16. P. 5363–5372.
  125. Anaissie E.J. et al. Cleaning patient shower facilities: a novel approach to reducing patient exposure to aerosolized *Aspergillus* species and other opportunistic molds // *Clin. Infect. Dis.* 2002. Vol. 35, № 8. P. 86–88.
  126. Anaissie E.J. et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: A new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections // *Clin. Infect. Dis.* 2001. Vol. 33, № 11. P. 1871–1878.
  127. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. [Электронный ресурс]. 2018. URL: <https://population.un.org/wup/Download/>; (дата обращения: 08.01.2022).
  128. Портал открытых данных Правительства Москвы. [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://data.mos.ru/opendata/7704786030-godovoy-passajiropotok-po-vsem-vidam-obshchestvennogo-transporta-v-gorode-moskve/data/table?versionNumber=1&releaseNumber=2> (дата обращения: 08.01.2022).

129. New York City Transit. Subway and bus ridership for 2019. [Электронный ресурс]. 2019. URL: <https://new.mta.info/agency/new-york-city-transit/subway-bus-ridership-2019> (дата обращения: 08.01.2022).
130. CityTransitData – New York City. [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://citytransit.uitp.org/new-york/public-transport-ridership> (дата обращения: 08.01.2022).
131. CityTransitData – Berlin. [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://citytransit.uitp.org/berlin/public-transport-ridership> (дата обращения: 08.01.2022).
132. Комплекс градостроительной политики и строительства города Москвы. [Электронный ресурс]. 2021. URL: <https://stroi.mos.ru/news/v-moskvie-otkroiut-50-60-stantsii-mietro-i-tri-novye-linii-v-blizhaishie-ghody?from=cl> (дата обращения: 08.01.2022).
133. Hsu T. et al. Urban Transit System Microbial Communities Differ by Surface Type and Interaction with Humans and the Environment // *mSystems*. 2016. Vol. 1, № 3. P. e00018-16.
134. Afshinnekoo E. et al. Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics // *Cell Syst*. 2015. Vol. 1, № 1. P. 72–87.
135. Hernández A.M. et al. Station and train surface microbiomes of Mexico City’s metro (subway/underground) // *bioRxiv*. 2019. P. 735027.
136. Leung M.H.Y. et al. Indoor-air microbiome in an urban subway network: Diversity and dynamics // *Appl. Environ. Microbiol*. 2014. Vol. 80, № 21. P. 6760–6770.
137. Gohli J. et al. The subway microbiome: Seasonal dynamics and direct comparison of air and surface bacterial communities // *Microbiome*. 2019. Vol. 7, № 1. P. 1–16.
138. Stone P.W. Economic burden of healthcare-associated infections: An American perspective // *Expert Rev. Pharmacoeconomics Outcomes Res*. 2009. Vol. 9, № 5. P. 417–422.
139. PatientCareLink – Healthcare-Acquired Infections (HAIs). [Электронный ресурс]. 2022. URL: <https://patientcarelink.org/improving-patient-care/healthcare-acquired-infections-hais> (дата обращения: 08.01.2022).
140. Questions and Answers on patient safety, including the prevention and control of healthcare associated infections. [Электронный ресурс]. 2008. URL: [https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/hu/MEMO\\_08\\_788](https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/hu/MEMO_08_788); (дата обращения: 08.01.2022).
141. Council E.A.S.A. Healthcare-associated infections: the view from EASAC // *EASAC Secr. R. Soc*. 2009. № April. P. 1–11.
142. Орлова О.А. Совершенствование системы эпидемиологического надзора и профилактики внутрибольничных инфекций дыхательных путей среди пациентов хирургической реанимации: дис. д.мед.наук: 14.02.02 - Эпидемиология. Москва, 2017. с. 340.
143. Lobdell K.W., Stamou S., Sanchez J.A. Hospital-Acquired Infections // *Surg. Clin. North Am*. 2012. Vol. 92, № 1. P. 65–77.

144. Haque M. et al. Health care-associated infections – an overview. 2018. P. 2321–2333.
145. Weiner L.M. et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014 // *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2016. Vol. 37, № 11. P. 1288–1301.
146. Parajuli N.P. et al. High burden of antimicrobial resistance among gram negative bacteria causing healthcare associated infections in a critical care unit of Nepal // *Antimicrob. Resist. Infect. Control. Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2017. Vol. 6, № 1. P. 1–9.
147. Forrester J.D., Maggio P.M., Tennakoon L. Cost of Health Care–Associated Infections in the United States // *J. Patient Saf.* 2022. Vol. 18, № 2. P. e477-e479.
148. Murphy F., Tchetchik A., Furxhi I. Reduction of health care-associated infections (Hais) with antimicrobial inorganic nanoparticles incorporated in medical textiles: An economic assessment // *Nanomaterials*. 2020. Vol. 10, № 5.
149. ИнфоМедФарм Диалог. ИСМП-2020. ПОДВОДИМ ИТОГИ. [Электронный ресурс]. 2020. URL: <https://imfd.ru/2021/06/25/ismp2020podvodimitog/> (дата обращения: 08.01.2022).
150. Pochtovyi A.A. et al. Contamination of hospital surfaces with bacterial pathogens under the current COVID-19 outbreak // *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021. Vol. 18, № 17. P. 1–13.
151. Comar M. et al. Introduction of NGS in environmental surveillance for healthcare-associated infection control // *Microorganisms*. 2019. Vol. 7, № 12.
152. Sereia A.F.R. et al. Healthcare-Associated Infections-Related Bacteriome and Antimicrobial Resistance Profiling: Assessing Contamination Hotspots in a Developing Country Public Hospital // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № August. P. 1–18.
153. Berendonk T.U. et al. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. Vol. 13, № 5. P. 310–317.
154. Zhu Y.G. et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes // *Nat. Microbiol.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 2, № January.
155. Avershina E., Shapovalova V., Shipulin G. Fighting Antibiotic Resistance in Hospital-Acquired Infections: Current State and Emerging Technologies in Disease Prevention, Diagnostics and Therapy // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № July.
156. Holmes A.H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance // *Lancet*. 2016. Vol. 387, № 10014. P. 176–187.
157. Fresia P. et al. Urban metagenomics uncover antibiotic resistance reservoirs in coastal beach and sewage waters // *Microbiome. Microbiome*, 2019. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
158. Gao F.Z. et al. Swine farming elevated the proliferation of *Acinetobacter* with the prevalence of antibiotic resistance genes in the groundwater // *Environ. Int.* Elsevier, 2020. Vol. 136, № January. P. 105484.
159. Augusto M.R. et al. Sampling strategies for wastewater surveillance: Evaluating the

- variability of SARS-COV-2 RNA concentration in composite and grab samples // *J. Environ. Chem. Eng.* 2022. Vol. 10, № 3. P. 107478.
160. Hu J. et al. Metagenomic profiling of ARGs in airborne particulate matters during a severe smog event // *Sci. Total Environ.* Elsevier B.V., 2018. Vol. 615. P. 1332–1340.
  161. Leung M.H.Y. et al. Characterization of the public transit air microbiome and resistome reveals geographical specificity // *Microbiome.* Microbiome, 2021. Vol. 9, № 1. P. 1–19.
  162. Jin L. et al. Airborne transmission as an integral environmental dimension of antimicrobial resistance through the “One Health” lens // *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* Taylor & Francis, 2021. Vol. 0, № 0. P. 1–22.
  163. Ashbolt N.J. et al. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance // *Environ. Health Perspect.* 2013. Vol. 121, № 9. P. 993–1001.
  164. Jansson L. et al. Impact of swab material on microbial surface sampling // *J. Microbiol. Methods.* Elsevier, 2020. Vol. 176, № July. P. 106006.
  165. Mainelis G. Bioaerosol sampling: Classical approaches, advances, and perspectives // *Aerosol Sci. Technol.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 54, № 5. P. 496–519.
  166. Lewandowski R. et al. Evaluation of applicability of the Sartorius Airport MD8 sampler for detection of *Bacillus* endospores in indoor air // *Environ. Monit. Assess.* 2013. Vol. 185, № 4. P. 3517–3526.
  167. Burton N.C., Grinshpun S.A., Reponen T. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses // *Ann. Occup. Hyg.* 2007. Vol. 51, № 2. P. 143–151.
  168. Uhrbrand K. et al. Evaluation of air samplers and filter materials for collection and recovery of airborne norovirus // *J. Appl. Microbiol.* 2018. Vol. 124, № 4. P. 990–1000.
  169. McDade C.E., Dillner A.M., Indresand H. Particulate matter sample deposit geometry and effective filter face velocities // *J. Air Waste Manag. Assoc.* 2009. Vol. 59, № 9. P. 1045–1048.
  170. Li J. et al. Comparing the performance of 3 bioaerosol samplers for influenza virus // *J. Aerosol Sci.* Elsevier Ltd, 2018. Vol. 115, № August 2017. P. 133–145.
  171. Mikheev A.Y. et al. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6 // *Eur. Polym. J.* Elsevier Ltd, 2016. Vol. 75. P. 317–328.
  172. Guo J. et al. Bacterial community analysis of floor dust and HEPA filters in air purifiers used in office rooms in ILAS, Beijing // *Sci. Rep.* Springer US, 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–11.
  173. Maestre J.P. et al. Filter forensics: Microbiota recovery from residential HVAC filters // *Microbiome.* Microbiome, 2018. Vol. 6, № 1. P. 1–14.
  174. Lopez-Cuesta J.M., Longuet C., Chivas-Joly C. Thermal degradation, flammability, and potential toxicity of polymer nanocomposites // *Health and Environmental Safety of Nanomaterials: Polymer Nanocomposites and Other Materials Containing Nanoparticles.* Woodhead Publishing Limited, 2014. 278–310 p.

175. Cox J. et al. Field sampling of indoor bioaerosols // *Aerosol Sci. Technol.* Taylor & Francis, 2020. Vol. 54, № 5. P. 572–584.
176. Jones W. et al. Evaluation of the Andersen Viable Impactor for Single Stage Sampling // *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1985. Vol. 46, № 5. P. 294–298.
177. Li C.S. et al. Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms // *Aerosol Sci. Technol.* 1999. Vol. 30, № 2. P. 100–108.
178. Wu Y., Shen F., Yao M. Use of gelatin filter and BioSampler in detecting airborne H5N1 nucleotides, bacteria and allergens // *J. Aerosol Sci.* Elsevier, 2010. Vol. 41, № 9. P. 869–879.
179. Tseng C.C. et al. Optimization of propidium monoazide quantitative PCR for evaluating performances of bioaerosol samplers for sampling airborne staphylococcus aureus // *Aerosol Sci. Technol.* 2014. Vol. 48, № 12. P. 1308–1319.
180. Grinshpun S.A. et al. Sampling for Airborne Microorganisms // *Man. Environ. Microbiol.* 2015. P. 3.2.2-1-3.2.2-17.
181. SASS4000 aerosol concentrator. [Электронный ресурс] .2022. URL: [https://www.resrchintl.com/SASS\\_4000\\_Concentrator.html](https://www.resrchintl.com/SASS_4000_Concentrator.html) (дата обращения: 08.01.2022).
182. Ресурc]. S. wetted-wall A.S. [Электронный. URL: [https://www.resrchintl.com/SASS\\_2300\\_air\\_sampler.html](https://www.resrchintl.com/SASS_2300_air_sampler.html) (дата обращения: 13.12.2021).
183. Akmalov A.E. et al. High-performance aerosol sampler with liquid phase recirculation and pre-concentration of particles // *Bull. Russ. State Med. Univ.* 2018. Vol. 7, № 4. P. 25–31.
184. Sinclair L. et al. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 2. P. 1–18.
185. Mas-Lloret J. et al. Gut microbiome diversity detected by high-coverage 16S and shotgun sequencing of paired stool and colon sample // *Sci. Data.* 2020. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
186. Callahan B.J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nat. Methods.* 2016. Vol. 13, № 7. P. 581–583.
187. Quast C. et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № D1. P. 590–596.
188. McMurdie P.J., Holmes S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data // *PLoS One.* 2013. Vol. 8, № 4.
189. Davis N.M. et al. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data // *Microbiome.* 2018. Vol. 6, № 1. P. 1–39.
190. dplyr: A Grammar of Data Manipulation . [Электронный ресурс]. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr> (дата обращения: 15.01.2022).
191. Conway J.R., Lex A., Gehlenborg N. UpSetR: An R package for the visualization of intersecting sets and their properties // *Bioinformatics.* 2017. Vol. 33, № 18. P. 2938–2940.
192. Wickham H. *Elegant Graphics for Data Analysis: ggplot2* // New York: Springer-Verlag. 2009. 1–213 p.

193. Ресурc]. ggpubr: “ggplot2” В.Р.Р.Р. [Электронный. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html> (дата обращения: 15.01.2022).
194. Martinucci M. et al. Accurate identification of members of the Burkholderia cepacia complex in cystic fibrosis sputum // *Lett. Appl. Microbiol.* 2016. Vol. 62, № 3. P. 221–229.
195. Deschaght P. et al. Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients // *BMC Microbiol.* 2009. Vol. 9. P. 1–7.
196. Price E.P. et al. Duplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Achromobacter xylosoxidans* and *Achromobacter* spp. // *Microb. Genomics.* 2020. Vol. 6, № 7. P. 1–11.
197. Hartman L.J. et al. Rapid real-time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype: Screening of nonhuman primates // *J. Mol. Diagnostics. American Society for Investigative Pathology and Association for Molecular Pathology*, 2009. Vol. 11, № 5. P. 464–471.
198. Caporaso J.G. et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № SUPPL. 1. P. 4516–4522.
199. vegan: an R package for community ecologists . [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/vegandevs/vegan/> (дата обращения: 15.01.2022).
200. randomForest: Breiman and Cutler’s Random Forests for Classification and Regression. [Электронный ресурс]. URL: <https://cran.r-project.org/web/packages/randomForest/index.html> (дата обращения: 15.01.2022).
201. Peccia J., Hernandez M. Incorporating polymerase chain reaction-based identification, population characterization, and quantification of microorganisms into aerosol science: A review // *Atmos. Environ.* 2006. Vol. 40, № 21. P. 3941–3961.
202. Vladimirsky M.A. et al. Application of water-soluble nanofilters for collection of airborne *Mycobacterium tuberculosis* DNA in hospital wards // *J. Hosp. Infect. Elsevier Ltd*, 2016. Vol. 93, № 1. P. 100–104.
203. Danko D. et al. A global metagenomic map of urban microbiomes and antimicrobial resistance // *Cell.* 2021. Vol. 184, № 13. P. 3376-3393.e17.
204. Wu D. et al. Inhalable antibiotic resistomes emitted from hospitals: metagenomic insights into bacterial hosts, clinical relevance, and environmental risks // *Microbiome. BioMed Central*, 2022. Vol. 10, № 1. P. 1–16.
205. Hendriksen R.S. et al. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1.
206. Szaniawski M.A., Spivak A.M. Recurrent *Paenibacillus* infection // *Oxford Med. Case Reports.* 2019. Vol. 2019, № 5. P. 216–218.
207. Sáez-Nieto J.A. et al. *Paenibacillus* spp. isolated from human and environmental samples in Spain: detection of 11 new species // *New Microbes New Infect. Elsevier Ltd*, 2017. Vol. 19. P. 19–27.

208. Mohan B. et al. *Aerococcus viridans*: A rare pathogen causing urinary tract infection // *J. Clin. Diagnostic Res.* 2017. Vol. 11, № 1. P. DR01–DR03.
209. Zhao Y. et al. Significant higher airborne antibiotic resistance genes and the associated inhalation risk in the indoor than the outdoor // *Environ. Pollut. Elsevier Ltd*, 2021. Vol. 268. P. 115620.
210. Ginn O. et al. Detection and Quantification of Enteric Pathogens in Aerosols near Open Wastewater Canals in Cities with Poor Sanitation // *Environ. Sci. Technol.* 2021. Vol. 55, № 21. P. 14758–14771.
211. Bai H. et al. Spread of airborne antibiotic resistance from animal farms to the environment: Dispersal pattern and exposure risk // *Environ. Int.* Elsevier Ltd, 2022. Vol. 158. P. 106927.
212. Ravin N. V., Mardanov A. V., Skryabin K.G. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms // *Russ. J. Genet.* 2015. Vol. 51, № 5. P. 431–439.
213. Barb J.J. et al. Development of an Analysis Pipeline Characterizing Multiple Hypervariable Regions of 16S rRNA Using Mock Samples // *PLoS One.* 2016. Vol. 11, № 2. P. 1–18.
214. Klindworth A. et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 1. P. 1–11.
215. Kameoka S. et al. Benchmark of 16S rRNA gene amplicon sequencing using Japanese gut microbiome data from the V1–V2 and V3–V4 primer sets // *BMC Genomics.* BMC Genomics, 2021. Vol. 22, № 1. P. 1–10.
216. Fadeev E. et al. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities // *Front. Microbiol.* 2021. Vol. 12, № February. P. 1–11.
217. Chen P., Sun W., He Y. Comparison of the next-generation sequencing (NGS) technology with culture methods in the diagnosis of bacterial and fungal infections // *J. Thorac. Dis.* 2020. Vol. 12, № 9. P. 4924–4929.
218. Sugira V. et al. Predictors of Mortality From Sepsis Among an African Patient Cohort: A Prospective Study From Two Tertiary Healthcare Facilities in Kigali, Rwanda. 2015. Vol. 1, № 821. P. 1.
219. Zheng Y. et al. The Diagnostic Value of Metagenomic Next–Generation Sequencing in Lower Respiratory Tract Infection // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021. Vol. 11, № September. P. 1–10.
220. Pochtovyi A.A. et al. Microbiological Characteristics of Some Stations of Moscow Subway // *Biology (Basel).* 2022. Vol. 11, № 2.
221. Grydaki N. et al. Bioaerosols in the Athens Metro: Metagenetic insights into the PM10 microbiome in a naturally ventilated subway station // *Environ. Int.* Elsevier Ltd, 2021. Vol. 146, № April 2020. P. 106186.
222. Ramsey M.M. et al. *Staphylococcus aureus* Shifts toward commensalism in response to *Corynebacterium* species // *Front. Microbiol.* 2016. Vol. 7, № AUG. P. 1–15.
223. Hernández A.M. et al. Station and train surface microbiomes of Mexico City’s metro

- (subway/underground) // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1–10.
224. Triadó-Margarit X. et al. Bioaerosols in the Barcelona subway system // *Indoor Air.* 2017. Vol. 27, № 3. P. 564–575.
  225. Green P.N. *Methylobacterium*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E et al. (editors). *The Prokaryotes*. New York: Springer; 2006. pp. 257–265. // *The Prokaryotes*. 2006. P. 257–265.
  226. Monchy S. et al. Plasmids pMOL28 and pMOL30 of *Cupriavidus metallidurans* are specialized in the maximal viable response to heavy metals // *J. Bacteriol.* 2007. Vol. 189, № 20. P. 7417–7425.
  227. Monsieurs P. et al. Heavy metal resistance in *Cupriavidus metallidurans* CH34 is governed by an intricate transcriptional network // *BioMetals*. 2011. Vol. 24, № 6. P. 1133–1151.
  228. Bukhtiyarova P.A. et al. Isolation, characterization, and genome insights into an anaerobic sulfidogenic *Tissierella* bacterium from Cu-bearing coins // *Anaerobe*. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 56. P. 66–77.
  229. Kim B.C. et al. *Caproiciproducens galactitolivorans* gen. Nov., sp. nov., a bacterium capable of producing caproic acid from galactitol, isolated from a wastewater treatment plant // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2015. Vol. 65, № 12. P. 4902–4908.
  230. Routh J., Saraswathy A., Collins M.D. *Arsenicicoccus bolidensis* a novel arsenic reducing actinomycete in contaminated sediments near the Adak mine (northern Sweden): Impact on water chemistry // *Sci. Total Environ.* 2007. Vol. 379, № 2–3. P. 216–225.
  231. Gilbert J.A., Neufeld J.D. Life in a World without Microbes // *PLoS Biol.* 2014. Vol. 12, № 12. P. 1–3.
  232. Ghinai I. et al. First known person-to-person transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) in the USA // *Lancet.* 2020. Vol. 395, № 10230. P. 1137–1144.
  233. Pastorino B. et al. Prolonged Infectivity of SARS-CoV-2 in Fomites // *Emerg. Infect. Dis.* 2020. Vol. 26, № 9. P. 2256–2257.
  234. Peng X. et al. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice // *Int. J. Oral Sci.* Springer US, 2020. Vol. 12, № 1. P. 1–6.
  235. Richard M. et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets // *Nat. Commun.* Springer US, 2020. Vol. 11, № 1. P. 1–6.
  236. Fears A.C. et al. Persistence of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Aerosol Suspensions // *Emerg. Infect. Dis.* 2020. Vol. 26, № 9.
  237. Neeltje van Doremalen P. et al. Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 as Compared with SARS-CoV-1 // *N. Engl. J. Med.* 2020. P. 0–2.
  238. Chia P.Y. et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1.
  239. Wu S. et al. Environmental contamination by SARS-CoV-2 in a designated hospital for

- coronavirus disease 2019 // *Am. J. Infect. Control.* Elsevier Inc., 2020. Vol. 48, № 8. P. 910–914.
240. Rella S.A. et al. Rates of SARS-CoV-2 transmission and vaccination impact the fate of vaccine-resistant strains // *Sci. Rep.* Nature Publishing Group UK, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–10.
  241. Anderson R.M. et al. Challenges in creating herd immunity to SARS-CoV-2 infection by mass vaccination // *Lancet.* 2020. Vol. 396, № 10263. P. 1614–1616.
  242. Harvey W.T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape // *Nat. Rev. Microbiol.* Springer US, 2021. Vol. 19, № 7. P. 409–424.
  243. Alenquer M. et al. Signatures in SARS-CoV-2 spike protein conferring escape to neutralizing antibodies // *PLOS Pathog.* 2021. Vol. 17, № 8. P. e1009772.
  244. Gushchin V.A. et al. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants // *Vaccines.* 2021. Vol. 9, № 7. P. 779.
  245. Karimzadeh S., Bhopal R., Huy N.T. Review of infective dose, routes of transmission, and outcome of COVID-19 caused by the SARS-COV-2: comparison with other respiratory viruses // *Epidemiol. Infect.* 2021.
  246. Ryan K. et al. Dose-dependent response to infection with SARS-CoV-2 in the ferret model: evidence of protection to re-challenge. 2020. Vol. 2. P. 1–39.
  247. Watanabe T. et al. Development of a dose-response model for SARS coronavirus // *Risk Anal.* 2010. Vol. 30, № 7. P. 1129–1138.
  248. Schröder I. COVID-19: A Risk Assessment Perspective // *ACS Chem. Heal. Saf.* 2020. Vol. 27, № 3. P. 160–169.
  249. Lednicky J.A. et al. Viable SARS-CoV-2 in the air of a hospital room with COVID-19 patients // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. № 1. P. 1–20.
  250. Pochtovyi A.A. et al. Sars-cov-2 aerosol and surface contamination in health care settings: The moscow pilot study // *Aerosol Air Qual. Res.* 2021. Vol. 21, № 4. P. 1–10.
  251. Hirota K. Air contamination with SARS-CoV-2 in the operating room // *J. Anesth.* Springer Singapore, 2020. № 0123456789. P. 1–4.
  252. Ye G. et al. Environmental contamination of SARS-CoV-2 in healthcare premises // *J. Infect.* Elsevier Ltd, 2020. Vol. 81, № 2. P. e1–e5.
  253. Siegel J.D. et al. 2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Health Care Settings // *Am. J. Infect. Control.* 2007. Vol. 35, № 10 SUPPL. 2.
  254. Komissarov A.B. et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 1–13.
  255. Kraay A.N.M. et al. Risk for Fomite-Mediated Transmission of SARS-CoV-2 in Child Daycares, Schools, Nursing Homes, and Offices - Volume 27, Number 4—April 2021 -

- Emerging Infectious Diseases journal - CDC // *Emerg. Infect. Dis.* 2021. Vol. 27, № 4. P. 1229–1231.
256. Kanamori H., Rutala W.A., Weber D.J. The role of patient care items as a fomite in healthcare-associated outbreaks and infection prevention // *Clin. Infect. Dis.* 2017. Vol. 65, № 8. P. 1412–1419.
  257. Becker K., Heilmann C., Peters G. Coagulase-negative staphylococci // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 27, № 4. P. 870–926.
  258. Natsis N.E., Cohen P.R. Coagulase-Negative Staphylococcus Skin and Soft Tissue Infections // *Am. J. Clin. Dermatol.* Springer International Publishing, 2018. Vol. 19, № 5. P. 671–677.
  259. Bardi T. et al. Nosocomial infections associated to COVID-19 in the intensive care unit : clinical characteristics and outcome // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2021. № 40. P. 495–502.
  260. Arcari G. et al. Klebsiella pneumoniae infections in COVID-19 patients: a 2-month retrospective analysis in an Italian hospital // *Int. J. Antimicrob. Agents.* Elsevier Ltd, 2021. Vol. 57, № 1. P. 106245.
  261. Hassan M.Z. et al. Contamination of hospital surfaces with respiratory pathogens in Bangladesh // *PLoS One.* 2019. Vol. 14, № 10. P. 1–10.
  262. Hosoda T. et al. COVID-19 and fatal sepsis caused by hypervirulent klebsiella pneumoniae, Japan, 2020 // *Emerg. Infect. Dis.* 2021. Vol. 27, № 2. P. 556–559.
  263. Scoffone V.C. et al. Burkholderia cenocepacia infections in cystic fibrosis patients: Drug resistance and therapeutic approaches // *Front. Microbiol.* 2017. Vol. 8, № AUG. P. 1–13.
  264. Edwards B.D. et al. Prevalence and outcomes of achromobacter species infections in adults with cystic fibrosis: A North American cohort study // *J. Clin. Microbiol.* 2017. Vol. 55, № 7. P. 2074–2085.
  265. Zhong H. et al. Characterization of respiratory microbial dysbiosis in hospitalized COVID-19 patients // *Cell Discov.* Springer US, 2021. Vol. 7, № 1.
  266. Osman H., Nguyen P. First Case of Covid-19 Complicated With Burkholderia Cepacia Pneumonia and Bacteremia // *Chest.* American College of Chest Physicians, 2020. Vol. 158, № 4. P. A544.
  267. Caneiras C. et al. Community-and hospital-acquired Klebsiella Pneumoniae urinary tract infections in Portugal: Virulence and antibiotic resistance // *Microorganisms.* 2019. Vol. 7, № 5. P. 1–14.
  268. Engelhart S.T. et al. Pseudomonas aeruginosa outbreak in a haematology-oncology unit associated with contaminated surface cleaning equipment // *J. Hosp. Infect.* 2002. Vol. 52, № 2. P. 93–98.
  269. Nkuwi E.J. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus contamination and distribution in patient's care environment at Muhimbili National Hospital, Dar es Salaam-Tanzania // *BMC Res. Notes.* BioMed Central, 2018. Vol. 11, № 1. P. 4–9.
  270. De Abreu P.M. et al. Persistence of microbial communities including Pseudomonas

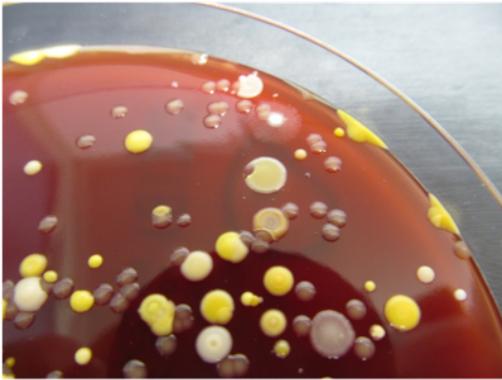
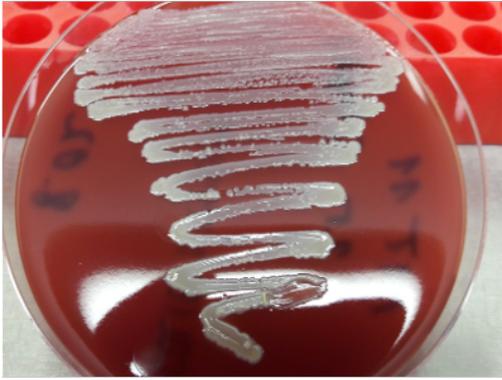
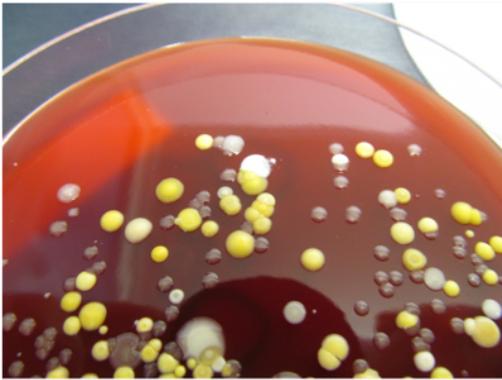
- aeruginosa in a hospital environment: A potential health hazard // *BMC Microbiol.* 2014. Vol. 14, № 1. P. 1–10.
271. Zhang L. et al. RFtest: A Robust and Flexible Community-Level Test for Microbiome Data Powerfully Detects Phylogenetically Clustered Signals // *Front. Genet.* 2022. Vol. 12, № January. P. 1–11.
272. Sirivongrangson P. et al. Endotoxemia and circulating bacteriome in severe COVID-19 patients // *Intensive Care Med. Exp.* Springer International Publishing, 2020. Vol. 8, № 1.
273. Rosas-Salazar C. et al. SARS-CoV-2 infection and viral load are associated with the upper respiratory tract microbiome // *J. Allergy Clin. Immunol.* Elsevier Inc., 2021. Vol. 147, № 4. P. 1226-1233.e2.
274. Ma S. et al. Metagenomic analysis reveals oropharyngeal microbiota alterations in patients with COVID-19 // *Signal Transduct. Target. Ther.* Springer US, 2021. Vol. 6, № 1.
275. Babenko V. et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiota in mild and severe COVID-19 patients // *bioRxiv.* 2021. P. 2021.09.20.461025.

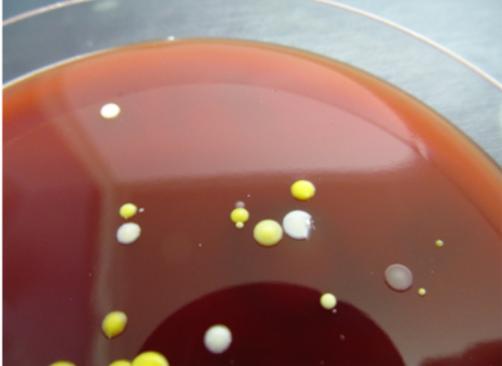
Приложение №1. Описание используемых питательных сред для культивируемого микробиома.

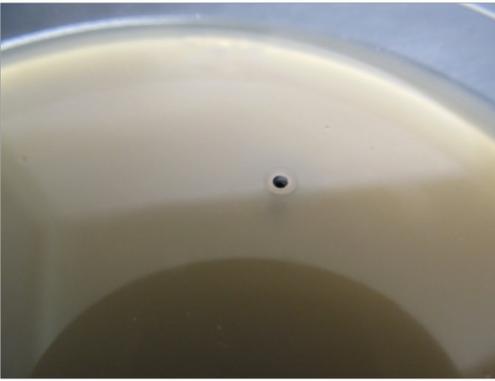
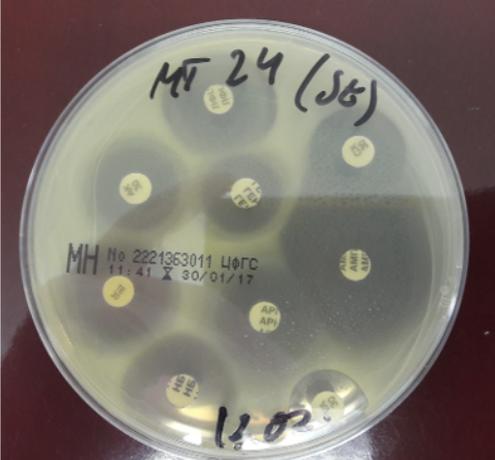
| Название среды  | Производитель              | Состав среды, г/л  | Назначение  |
|---|----------------------------|--|---|
| Универсальные питательные среды                                 |                            |  |   |
| Колумбийский агар с дефибринированной кровью                    | ООО «ЦФГС»,<br>Россия      | Пептоны – 23,0<br>Крахмал – 1,0<br>NaCl – 5,0<br>Агар – 11,0<br>Дефибринированная баранья кровь – 5%<br>(добавляется к готовой среде после стерилизации)   | Универсальная среда общего назначения, для выделения как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, в т.ч. прихотливых. Определение гемолитических свойств микроорганизмов |
| Среда LB-агар (lysogeny broth)                                  | Собственного приготовления | Триптон – 10,0<br>Дрожжевой экстракт – 5,0<br>NaCl – 5,0<br>Агар – 17,0  | Среда общего назначения для выделения грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов.  |
| Селективные и дифференциально-диагностические питательные среды |                            |  |   |
| Среда Байрда-Паркера  | ООО «ЦФГС»,<br>Россия      | Казеиновый пептон – 10,0<br>Мясной экстракт – 5,0<br>Дрожжевой экстракт – 1,0<br>Пируват натрия – 10,0<br>Глицин – 12,0<br>Хлористый литий – 5,0<br>Агар-агар – 15,0<br>В стерилизованную среду вносят 50 мл желточно-теллуритовой эмульсии  | Среда предназначена для селективного выделения стафилококков и определения среди них коагулазоположительных видов стафилококков ( <i>S. aureus</i> )  |
| Среда Эндо  | ООО «ЦФГС»,<br>Россия      | Пептон – 10,0<br>Лактоза – 10,0<br>Калия гидрофосфат – 3,50<br>Натрия сульфит – 2,50<br>Фуксин основной – 0,50<br>Агар – 15,0  | Предназначена для селективного выделения и предварительной идентификации грамотрицательных энтеробактерий, включая роды <i>Escherichia</i> , <i>Klebsiella</i> и др.                        |
| Среда Энтерококк-агар   | ООО «ЦФГС»,<br>Россия      | Панкреатический гидролизат рыбной муки с твином сухой – 10,5<br>Дрожжевой экстракт – 5,0<br>Глюкоза – 2,0<br>Калий фосфорнокислый однозамещенный – 2,0<br>Натрий углекислый – 0,5<br>Натрия азид – 0,5<br>2,3,5-трифенилтетразолий хлорид – 0,1<br>Кристаллический фиолетовый – 0,001<br>Агар – 10,0 | Предназначена для селективного выделения и предварительной идентификации рода <i>Enterococcus</i> , а также поддерживает рост некоторых видов <i>Streptococcus</i> .                        |
| Среда Сабуро с декстрозой хлорамфениколом                       | ООО «ЦФГС»,<br>Россия      | Декстроза – 40,0<br>Пептон (перевар животной ткани и панкреатический гидролизат казеина) – 10,0<br>Хлорамфеникол – 0,05<br>Агар – 12,0   | Среда предназначена для селективного выделения мицелиальных и дрожжевых грибов  |

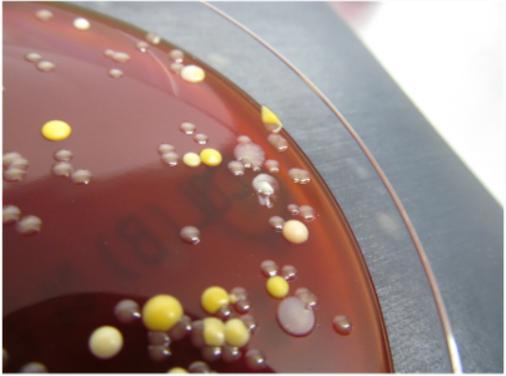
| Определение антибиотикочувствительности |                       |  |   |
|---|-----------------------|--|---|
| Среда Мюллера-Хинтона                   | ООО «ЦФГС»,<br>Россия | Кислый казеиновый пептон – 17,5<br>Вытяжка из говядины – 2,0<br>Крахмал – 1,5<br>Агар – 17,0 | Определение антибиотикочувствительности на стандартизованной для этих целей среде Мюллера-Хинтона |

Приложение №2. Фотографии высеянных образцов, морфотипов и их устойчивость к антибактериальным препаратам.

| Идентифицируемый микроорганизм             | Питательная среда и этап исследования   | Фотография колоний   |
|--|---|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (MT11)        | Кровяной агар, 1 генерация (исходная культура)                                  |    |
|  | Кровяной агар, 2 генерация (отсеянная колония)                                  |   |
|  | Среда Мюллера-Хинтона для определения устойчивости диско-диффузионным способом. |  |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> (MT12) | Кровяной агар, 1 генерация (исходная культура)                                  |  |

|   |   |  |
|---|---|--|
|   | <p>Кровяной агар,<br/>2 генерация<br/>(отсеянная колония)</p>   |    |
|   | <p>Среда Мюллера-Хинтона<br/>для определения<br/>устойчивости диско-<br/>диффузионным<br/>способом.</p> |    |
| <p><i>Staphylococcus<br/>epidermidis</i><br/>(MT22)</p> | <p>Кровяной агар,<br/>1 генерация<br/>(исходная культура)</p>   |  |
|   | <p>Кровяной агар,<br/>2 генерация<br/>(отсеянная колония)</p>   |  |

|   |  |  |
|---|--|--|
|   | <p>Среда Мюллера-Хинтона для определения устойчивости диско-диффузионным способом.</p> |    |
| <p><i>Staphylococcus warneri</i> (MT24)</p> | <p>Среда Байрда-Паркера, 1 генерация (исходная культура)</p>                           |    |
|   | <p>Кровяной агар, 2 генерация (отсеянная колония)</p>                                  |   |
|   | <p>Среда Мюллера-Хинтона для определения устойчивости диско-диффузионным способом.</p> |  |

|   |   |  |
|---|---|--|
| <p><i>Aerococcus viridans</i><br/>(MT8)</p> | <p>Кровяной агар,<br/>1 генерация<br/>(исходная культура)</p> |  |
|   | <p>Кровяной агар,<br/>2 генерация<br/>(отсеянная колония)</p> |  |

Приложение №3. Точки сбора аэрозольных образцов.

| Помещение                                  | Длительность сбора, мин | Объем воздуха, м <sup>3</sup> | Номер образца | Ст (ГЭ/мл)     | Ст пациента        |
|--|-------------------------|-------------------------------|---------------|----------------|--------------------|
| Отделение общей терапии                    |                         |                               |               |                |                    |
| Сестринская                                | 5                       | 1,625                         | 1             | отр            | -                  |
| Сестринская                                | 5                       | 1,625                         | 2             | отр            | -                  |
| Сестринская                                | 5                       | 1,625                         | 3             | отр            | -                  |
| Палата №14,<br>2 пациента                  | 5                       | 1,625                         | 4             | отр            | 1. 26,7<br>2. 25,5 |
| Палата №14,<br>2 пациента                  | 5                       | 1,625                         | 5             | отр            | 1. 26,7<br>2. 25,5 |
| Палата №14,<br>2 пациента                  | 2                       | 0,625                         | 6             | отр            | 1. 26,7<br>2. 25,5 |
| Палата №17,<br>4 пациента                  | 15                      | 4,875                         | 7             | отр            | 1. 25,2<br>2. 33,0 |
| Палата №17,<br>4 пациента                  | 15                      | 4,875                         | 8             | отр            | 1. 25,2<br>2. 33,0 |
| Комната сотрудников                        | 15                      | 4,875                         | 9             | отр            | -                  |
| Отделение реанимации и интенсивной терапии |                         |                               |               |                |                    |
| Коридор                                    | 20                      | 80,0                          | В1            | 40,06<br>(100) | -                  |
| Коридор                                    | 20                      | 80,0                          | В2            | отр            | -                  |
| Коридор                                    | 20                      | 80,0                          | В3            | 37,6<br>(500)  | -                  |
| Бокс №49,<br>2 пациента                    | 5                       | 1,625                         | В4            | 38,35<br>(100) | 1. 31,5<br>2. 28,4 |
| Бокс №52,<br>2 пациента                    | 5                       | 1,625                         | В5            | 38,45<br>(100) | -                  |
| Бокс №58,<br>1 пациент                     | 5                       | 1,625                         | В6            | 39,25<br>(100) | 1. 22,3            |

Приложение №4. Точки сбора образцов с поверхностей.

| Помещение                 | Номер образца            | Образец                               | Ст (ГЭ/мл)      | Ст пациента        |
|---------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-----------------|--------------------|
| Отделение общей терапии   |                          |                                       |                 |                    |
| Палата №14,<br>2 пациента | 1                        | Пол возле кровати пациента            | 35,34<br>(1000) | 1. 26.7<br>2. 25.5 |
|                           | 2                        | Пол в туалете                         | 38,5<br>(100)   |                    |
|                           | 3                        | Сиденье для унитаза                   | отр             |                    |
|                           | 4                        | Ручка от раковины                     | отр             |                    |
|                           | 5                        | Прикроватная тумба                    | 38,23<br>(100)  |                    |
|                           | 6                        | Оконная ручка                         | 39,12<br>(100)  |                    |
|                           | 7                        | Кнопка унитаза                        | отр             |                    |
|                           | 8                        | Ингалятор                             | отр             |                    |
|                           | 9                        | Выключатель                           | отр             |                    |
|                           | 10                       | Подоконник                            | отр             |                    |
|                           | 55                       | Прикроватная тумба                    | отр             |                    |
|                           | 56                       | Пол                                   | отр             |                    |
|                           | 57                       | Сиденье для унитаза + ручка для смыва | отр             |                    |
|                           | Палата №18,<br>1 пациент | 11                                    | Ингалятор       |                    |
| 12                        |                          | Выключатель                           | отр             |                    |
| 13                        |                          | Прикроватная тумба                    | отр             |                    |
| Сестринский пост          | 14                       | Дверная ручка                         | отр             | -                  |
|                           | 16                       | Телефонная трубка поста               | отр             | -                  |
|                           | 50                       | Контейнер для термометров             | отр             | -                  |
|                           | 39                       | Обеденный стол                        | отр             | -                  |
|                           | 40                       | Зеркало                               | отр             | -                  |
| Комната сотрудников       | 15                       | Дверная ручка                         | отр             | -                  |
|                           | 41                       | Стул, на который сбрасывают СИЗ       | отр             | -                  |
|                           | 42                       | Пол                                   | отр             | -                  |
|                           | 84                       | Пол                                   | отр             | -                  |
|                           | 85                       | Обувь врача                           | отр             | -                  |
| Зона снятия СИЗ           | 17                       | СИЗ костюм (грудная часть)            | отр             | -                  |

|                                |    |   |                |   |
|--------------------------------|----|---|----------------|---|
| Буфет                          | 18 | Ручка холодильника                            | отр            | - |
|                                | 31 | Пол   | отр            | - |
|                                | 32 | Раковина                                      | отр            | - |
| Кабинет заведующего отделением | 19 | Дверная ручка                                 | 38,76<br>(100) | - |
|                                | 21 | Тумбочка                                      | отр            | - |
|                                | 22 | Раковина                                      | отр            | - |
|                                | 23 | Зеркало                                       | отр            | - |
| Коридор                        | 20 | Парапет приемного холла                       | отр            | - |
|                                | 45 | Ручка инвалидного кресла<br>ковид-больной     | отр            | - |
|                                | 46 | Диван   | отр            | - |
|                                | 47 | Раздевалка для сотрудников                    | отр            | - |
|                                | 48 | Шкаф для чистого белья                        | отр            | - |
|                                | 49 | Стол раздаточный                              | отр            | - |
|                                | 28 | Стол для грязной посуды                       | отр            | - |
|                                | 35 | Каталка для транспортировки<br>грязного белья | отр            | - |
| Вход в отделение               | 24 | Стол для оформления документов                | отр            | - |
| Санузел для персонала          | 25 | Сиденье для унитаза                           | отр            | - |
|                                | 26 | Раковина                                      | отр            | - |
|                                | 27 | Зеркало                                       | отр            | - |
| Процедурный кабинет            | 29 | Письменный стол                               | отр            | - |
|                                | 30 | Пол   | отр            | - |
| Зона отдыха                    | 33 | Холодильник для передач                       | отр            | - |
|                                | 34 | Стол  | отр            | - |
| Ингаляционная комната          | 36 | Манипуляцией стол                             | отр            | - |
|                                | 37 | Стол с расходным материалом                   | отр            | - |
|                                | 38 | Холодильник для лекарств                      | отр            | - |
| Санитарная комната             | 43 | Дверная ручка                                 | отр            | - |
|                                | 44 | Раковина                                      | отр            | - |
|                                | 51 | Пол   | отр            | - |
|                                | 52 | Обеденный стол                                | отр            | - |

|  |                         |   |                 |                    |
|--|-------------------------|---|-----------------|--------------------|
|  | 53                      | Шкаф сотрудника                           | отр             | -                  |
|  | 54                      | Дверная ручка                             | отр             | -                  |
| Палата № 17,<br>4 пациента                 | 61                      | Пол                                       | отр             | 1. 25.2<br>2. 25.4 |
|  | 62                      | Прикроватная тумба                        | отр             |                    |
|  | 63                      | Подголовник                               | отр             |                    |
|  | 64                      | Экран телефона                            | отр             |                    |
|  | 65                      | Простынь                                  | отр             |                    |
|  | 66                      | Ингаляционная маска                       | отр             |                    |
|  | 67                      | Бутылка с водой (горлышко)                | отр             |                    |
|  | 68                      | Кнопка вызова                             | отр             |                    |
|  | 69                      | Личные вещи (одежда: халат)               | отр             |                    |
|  | 70                      | Ручка ванной комнаты                      | отр             |                    |
|  | 71                      | Кондиционер                               | отр             |                    |
|  | 72                      | Кондиционер                               | отр             |                    |
|  | 73                      | Кружка                                    | отр             |                    |
|  | 74                      | Кожа (кость: тыльная сторона)             | отр             |                    |
|  | 75                      | Сиденье для унитаза                       | отр             |                    |
|  | 76                      | Личное полотенце                          | отр             |                    |
|  | 77                      | Личный градусник                          | отр             |                    |
|  | 78                      | Раковина (кран)                           | отр             |                    |
|  | 79                      | Мазок из ротоглотки пациента              | 33,14<br>(1000) |                    |
|  | 80                      | Ингаляционная маска<br>(внутренняя часть) | отр             |                    |
| 81   | Ручка двери палаты      | 37,95<br>(500)                            |                 |                    |
| 82   | Боковые поручни кровати | отр                                       |                 |                    |
| 83   | Ручка от тумбы          | отр                                       |                 |                    |
| Отделение реанимации и интенсивной терапии |                         |   |                 |                    |
| Вход в отделение,<br>коридор               | A1                      | Пол                                       | отр             | -                  |
|  | A2                      | Дверная ручка                             | отр             | -                  |
| Кабинет старшей м/с                        | A4                      | Рабочий стол                              | отр             | -                  |
|  | A5                      | Дверная ручка                             | отр             | -                  |
|  | A6                      | Пол                                       | отр             | -                  |

|                         |     |  |                   |                         |
|-------------------------|-----|--|-------------------|-------------------------|
| Комната сотрудников     | A9  | Пол  | отр               | -                       |
|                         | A10 | Дверная ручка                                | отр               | -                       |
| Предбоксник №56         | A3  | Дверная ручка<br>(со стороны чистой зоны)    | отр               | Пациент без<br>COVID-19 |
|                         | A7  | Пол  | отр               |                         |
|                         | A8  | Дверная ручка<br>(со стороны «красной зоны») | отр               |                         |
| Бокс №49,<br>2 пациента | A11 | Пол  | 40,27<br>(50-100) | 1. 31,5<br>2. 28,4      |
|                         | A12 | Экран ИВЛ 1 пациента                         | 36,46<br>(1000)   |                         |
|                         | A13 | Экран ИВЛ 2 пациента                         | отр               |                         |
|                         | A14 | Дверная ручка<br>(со стороны «красной зоны») | отр               |                         |
| Предбоксник №49         | A15 | Дверная ручка<br>(со стороны чистой зоны)    | 40,06<br>(50-100) |                         |
|                         | A41 | Пол  | 40,23<br>(50-100) |                         |
| Бокс №52,<br>2 пациента | A17 | Пол  | 39,76<br>(100)    | 1. Отр<br>2. Отр        |
|                         | A18 | Экран ИВЛ 1 пациента                         | отр               |                         |
|                         | A19 | Экран ИВЛ 2 пациента                         | отр               |                         |
|                         | A20 | Дверная ручка<br>(со стороны «красной зоны») | отр               |                         |
| Предбоксник №52         | A22 | Дверная ручка<br>(со стороны чистой зоны)    | отр               |                         |
|                         | A42 | Пол  | отр               |                         |
| Бокс №54,<br>1 пациент  | A23 | Пол  | отр               | Пациент без<br>COVID-19 |
|                         | A24 | Экран ИВЛ                                    | отр               |                         |
|                         | A25 | Трубка ИВЛ                                   | отр               |                         |
|                         | A26 | Дверная ручка<br>(со стороны «красной зоны») | отр               |                         |
| Предбоксник №54         | A28 | Дверная ручка<br>(со стороны чистой зоны)    | отр               |                         |
|                         | A43 | Пол  | отр               |                         |
| Бокс №58,<br>1 пациент  | A35 | Пол  | отр               | 1. 22,3                 |
|                         | A36 | Экран ИВЛ                                    | отр               |                         |
|                         | A37 | Трубка ИВЛ                                   | отр               |                         |
|                         | A38 | Дверная ручка<br>(со стороны «красной зоны») | отр               |                         |
| Предбоксник №58         | A40 | Дверная ручка<br>(со стороны чистой зоны)    | отр               |                         |
|                         | A45 | Пол  | 37,43<br>(500)    |                         |

## БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает благодарность и глубокую признательность своему научному руководителю Гущину Владимиру Алексеевичу за руководство, неоценимую помощь и поддержку на всех этапах работы. Автор выражает благодарность к.б.н. Ткачуку Артему Петровичу за поддержку и ценные советы; д.б.н. Бутенко Александру Михайловичу за обсуждение результатов; к.б.н. Вердиеву Бахтияру Исраил оглы, к.б.н. Овчинникову Роману Сергеевичу, к.б.н. Кузнецовой Надежде Анатольевне, а также коллективу лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов, лаборатории трансляционной биомедицины, лаборатории индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России за помощь в проведении различных экспериментов. Особую благодарность автор выражает к.б.н. Васиной Дарье Владимировне за поддержку и помощь в проведении исследований.

Автор выражает благодарность кафедре вирусологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова». Особую признательность автор выражает д.б.н. Карповой Ольге Вячеславовне, д.б.н. Аграновскому Алексею Анатольевичу, д.б.н. Никитину Николаю Александровичу и к.б.н. Борисовой Ольге Викторовне за ценные советы и обсуждение результатов работы.

Автор выражает благодарность д.м.н. Колобухиной Людмиле Васильевне, д.м.н. Бургасовой Ольге Александровне и Бакалин Валерии Валерьевне за помощь в проведении ряда исследований.