



Нанопоровое секвенирование – новый подход к диагностике и лечению эндофтальмита: обзор современных исследований

Е.Н. Кузнецов, С.А. Абакаров, И.А. Лоскутов, д.м.н.

Адрес для переписки: Сапиюлла Анварович Абакаров, Boss@limesmedia.ru

Для цитирования: Кузнецов Е.Н., Абакаров С.А., Лоскутов И.А. Нанопоровое секвенирование – новый подход к диагностике и лечению эндофтальмита: обзор современных исследований. Эффективная фармакотерапия. 2024; 20 (47): 47–53.

DOI 10.33978/2307-3586-2024-20-47-47-53

Эндофтальмит – это острое офтальмологическое состояние, требующее своевременной и точной диагностики и лечения. На сегодняшний день микробиологические методы, такие как микроскопия с окрашиванием по Граму и культивирование, считаются золотым стандартом выявления возбудителей. Однако в ряде случаев возбудитель остается невыявленным, что может быть связано с неинфекционной природой воспаления, невозможностью идентификации нового микроорганизма или с тем, что патоген не культивируется после предварительного лечения антибиотиками. В статье рассматриваются микробиологические особенности эндофтальмита, существующие методы диагностики микроорганизмов, а также современные молекулярные технологии, в частности нанопоровое секвенирование нового поколения. Этот инновационный подход повышает точность диагностики и эффективность лечения инфекционных заболеваний, открывая новые возможности для более активного выявления микроорганизмов при эндофтальмите.

Ключевые слова: нанопоровое секвенирование, эндофтальмит, диагностика эндофтальмита

В ближайшие годы стремительное развитие молекулярных технологий может значительно изменить подходы к диагностике в клинической микробиологии. Сегодня особое внимание уделяется клинической метагеномике с использованием секвенирования нового поколения (СНП), которая позволяет глубоко секвенировать нуклеиновые кислоты из сложных биологических образцов. Преимущества этого непредвзятого метода выявления патогенов состоят в его исключительном потенциале для изучения резистентности к противомикробным препаратам, проведения молекулярной эпидемиологии, типирования штаммов и отслеживания вспышек заболеваний, причем в рамках одного анализа. Перед офтальмологами, занимающимися лечением глазных инфекций, особенно остро стоит вопрос разработки более

чувствительных и быстрых диагностических тестов, что крайне важно при эндофтальмите, поскольку традиционные методы культивирования и окрашивания часто не выявляют его возбудителей [1]. Тем не менее внедрение нанопорового секвенирования в клиническую практику потребует подготовки врачей, микробиологов и специалистов по биоинформатике. Будет необходима обработка огромного объема сложных данных, генерируемых в процессе исследований. Этот вызов, ранее описанный как «мальтузианская ловушка секвенирования», заключается в возможных трудностях с обработкой и интерпретацией больших массивов данных [2].

Эндофтальмит (от греч. *endo* – внутри и *ophthalmos* – глаз) – воспалительный процесс внутренних оболочек глаза, приводящий к образованию

гнойного выпота в стекловидном теле [3]. Эндофталмит представляет собой серьезное осложнение, требующее немедленного вмешательства со стороны офтальмологов.

Современные стандарты диагностики эндофталмита

Одна из главных проблем в борьбе с эндофталмитом – недостаток инновационных методов диагностики. За последние 50 лет стандарты определения возбудителей почти не изменились. Современные исследования показывают, что эти инфекции часто представляют серьезную диагностическую сложность, поскольку клинический осмотр сам по себе не предоставляет точной информации о микробной природе эндофталмита. Сказанное прежде всего касается бактериальных и грибковых эндофталмитов, которые в продромальном периоде не всегда сопровождаются явными признаками и требуют забора образцов стекловидного тела и внутриглазной жидкости для анализа. Однако в офтальмологии сбор тканей или внутриглазной жидкости весьма проблематичен из-за малого количества доступного материала.

Основным методом диагностики эндофталмита остается забор нескольких образцов из зоны инфицирования. Обычно это делается с помощью стерильного скальпеля, шпателя или специальных тампонов, затем образцы наносятся на предметные стекла для микроскопии или помещаются в питательные среды [4]. Однако метод требует значительных финансовых, временных и трудовых затрат, а также имеет невысокую чувствительность – менее 50% [1]. Как следствие, в половине случаев своевременное назначение противомикробной терапии невозможно. Кроме того, процесс инкубации для получения результатов может занимать свыше 30 дней, что существенно отсрочивает постановку диагноза и начало лечения.

Ключевым остается вопрос: содержат ли образцы биопсийного материала, не дающие роста в культуре, живые микроорганизмы [5]? Например, при эндофталмите молекулярные методы часто не выявляют бактериальную ДНК в культурах с отрицательным ростом. Вместе с тем в крупном исследовании, проведенном в Южной Индии, где преобладают как грибковые, так и бактериальные патогены, с помощью направленной ПЦР 16S или 18S [6] удалось обнаружить потенциальных возбудителей более чем в 95% образцов, хотя только в 50% случаев посев дал положительный результат. Это указывает на то, что низкий процент положительных результатов скорее всего связан с недостаточной чувствительностью методов посева, а не с отсутствием патогенов в стекловидном теле. Таким образом, необходимо совершенствовать диагностические технологии.

В клинической практике основная трудность для врача заключается в том, что, если эмпирическое лечение антибиотиками неэффективно,

ухудшение зрения у пациента может стать необратимым. Результаты посева, которые обычно доступны лишь через несколько дней, не всегда дают информацию, позволяющую скорректировать алгоритм лечения.

Пределы традиционной микробиологии

Традиционные методы диагностики в микробиологии ограничены и до сих пор зависят от фенотипических подходов. Процессы, базирующиеся на способности выращивать жизнеспособные микроорганизмы в культуре и дополнительно анализировать их на основе морфологии (например, с помощью окрашивания) и биохимических характеристик (в частности, тесты на антигены и серология), относятся к биотехнологии [7]. Хотя в последние годы методы диагностики расширились и теперь включают ПЦР и автоматизацию лабораторных процессов с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF [8] для быстрого определения патогенов, существуют значительные ограничения. Одним из главных недостатков является зависимость от культивирования микроорганизмов, что делает процесс длительным и дорогостоящим для медленно растущих или привередливых возбудителей [9].

Некоторые клинически значимые патогены, если они не растут на выбранных питательных средах (явление, известное как «аномалия чашки Петри») или их рост подавляется предварительным применением противомикробных препаратов, можно вообще не обнаружить [10]. И даже если патоген удалось вырастить, это только первый этап диагностики. В условиях возрастающей резистентности к антибиотикам важно также проводить анализ чувствительности к противомикробным препаратам – обязательное условие эффективного лечения. В случаях с патогенами, представляющими угрозу для общественного здоровья, может потребоваться дальнейшая типизация методом мультислокового секвенирования, с помощью гель-электрофореза ДНК в импульсном поле и микрочипов [11].

В силу ограничений современных подходов к диагностике эндофталмита возрос интерес к объединению существующих тестов в общий анализ, который мог бы предоставить более быстрые и клинически значимые результаты, а также расширить понимание эпидемиологии глазных инфекций.

Перспективы секвенирования в клинической микробиологии

Термин «секвенирование нового поколения» охватывает разнообразные, постоянно развивающиеся технологии высокопроизводительного секвенирования, которые позволяют одновременно и массово определять нуклеотидные последовательности в образцах [12, 13]. В отличие от более старого метода секвенирования по Сэнгеру, разработанного в 1970-х гг. и основанного на медленном процес-

се обнаружения отдельных цепей ДНК [14], СНП обеспечивает гораздо более высокую производительность, точность и экономичность. С внедрением таких технологий, как пиросеквенирование, появилась возможность одновременно секвенировать миллионы коротких фрагментов ДНК, что ускорило исследования в области геномики и микробиологии.

Несмотря на то что секвенирование по Сэнгеру по-прежнему используется для проверки данных или изучения труднодоступных участков генома, СНП вытеснило его в большинстве научных и клинических областей благодаря снижению затрат и улучшению автоматизации. Сегодня существует несколько коммерческих доступных платформ для СНП, каждая из которых предлагает уникальные химические реактивы и отличается длиной считывания, частотой ошибок и вычислительной поддержкой, что позволяет адаптировать технологию для разных целей и задач [15].

СНП включает в себя два ключевых подхода – целевое секвенирование ампликонов и метагеномное секвенирование. Целевое секвенирование фокусируется на конкретных участках генома, таких как 16S рРНК [16, 17] у бактерий, позволяет детально изучить микроорганизмы, но метод ограничен возможностью обнаружения только выбранных патогенов. Этот подход был успешно применен в исследованиях вспышек вирусных заболеваний, таких как лихорадка Зика [18, 19] и Эбола [20], но он не всегда подходит для изучения комплексных микробных сообществ. Метагеномное секвенирование более универсальное, поскольку позволяет одновременно исследовать все нуклеиновые кислоты в образце, а не ограничиваться конкретными патогенами. Этот метод особенно полезен при диагностике сложных инфекций, когда традиционные методы неэффективны.

Метагеномика становится ключевым инструментом в ситуациях, когда другие методы диагностики не позволяют точно определить возбудителя, например при тяжелых системных инфекциях. Данный подход помогает не только выявлять новые патогены, но и отслеживать распространение и эволюцию заболеваний, что делает его незаменимым в молекулярной эпидемиологии.

Современные технологии секвенирования также развиваются в направлении изучения экспрессии генов и открывают новые возможности в диагностике и мониторинге инфекций на основе динамики транскрипции. Анализ РНК-секвенирования позволяет различать активные и неактивные микроорганизмы, что может существенно улучшить диагностику и лечение пациентов [21–24].

Процесс секвенирования включает два этапа – «мокрый» и «сухой» [25–29]. На первом, «мокрое», этапе из образца выделяют нуклеиновые кислоты, фрагментируют их и подготавливают к секвенированию. Затем полученные данные обрабатываются на «сухом» этапе, включающем сложный анализ,

сборку и интерпретацию данных. Этот этап считается узким местом, поскольку требует мощных вычислительных ресурсов и строгого контроля качества на каждой стадии во избежание ошибок и ложных результатов.

С учетом расширения базы данных секвенированных патогенов будущее диагностики с использованием СНП представляется все более автоматизированным и точным, что позволит эффективнее выявлять патогены и бороться с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Нанопоровое секвенирование

В последние годы технология секвенирования с помощью нанопор, известная как технология секвенирования четвертого поколения, стала настоящим прорывом в области секвенирования генома. Благодаря появлению нанопорового секвенатора MinION с длительным считыванием, разработанного компанией Oxford Nanopore Technologies, а затем секвенатора PromethION с улучшенной производительностью, можно быстро выявлять патогены, несмотря на высокий процент ошибок на базовом уровне, необходимость повторных тестов, оптимизированное соотношение сигнала и шума, большее количество считывающих головок и т.д. [30–32]. Кроме того, применение технологии длинных считываний позволило интерпретировать сложные геномы и получать метагеномные сборки, что очень удобно для изучения микробных сообществ [33].

Технология секвенирования с помощью нанопор дает возможность одноцепочечной ДНК или РНК проходить через наноразмерные отверстия в искусственно созданных мембранах и преобразовывать биологические сигналы оснований в электрические, которые затем интерпретируются алгоритмами и могут быть сопоставлены с метагеномом [34]. В последнее время секвенатор Oxford Nanopore MinION пользуется большой популярностью благодаря портативности, скорости и возможности считывать полноразмерную 16S рРНК при чтении данных. Открываются широкие перспективы для его применения. С помощью технологии секвенирования Oxford Nanopore ген 16S рРНК бактерий был напрямую амплифицирован с помощью ПЦР, что позволило быстро идентифицировать бактерии [35]. Кроме того, несколько исследований продемонстрировали возможности нанопоровых секвенаторов в области метагеномики бактерий, особенно при бактериальных инфекциях [36, 37]. С помощью нанопоровых платформ для глубокого секвенирования с длинными считываниями было проведено сравнительное исследование [38]. Полученные результаты продемонстрировали потенциал нанопорового секвенирования для экономически эффективной идентификации возбудителей эндофтальмита в режиме реального времени. Более того, метод можно использовать

для изучения свойств генома бактерий, связанных с вирулентностью и устойчивостью к антибиотикам [39].

Диагностические пороги секвенирования

В клинической метагеномике возможности секвенирования определяются так называемым пределом обнаружения (ПО), который можно рассматривать как необходимую массу извлеченной ДНК/РНК, требуемую для последующего обнаружения [40]. ПО должен быть определен для ряда патогенов, предположительно участвующих в развитии заболевания. Определение ПО для анализов методом секвенирования – трудоемкий и длительный процесс. Но без этого этапа невозможно с уверенностью утверждать, что патоген отсутствует, поскольку сигнал не обнаружен [41]. Одна из трудностей, связанных с этим процессом, заключается в меньшем размере геномов микроорганизмов по сравнению с геномами людей. Кроме того, если ПО для определенного патогена выше ожидаемого для конкретного анализа, то это может привести к нежелательной доле ложноотрицательных результатов. В таких случаях необходимо оптимизировать процесс секвенирования, чтобы снизить ПО и повысить чувствительность теста для обнаружения прочтений, полученных от рассматриваемого патогена.

Как и в случае с любым диагностическим тестом, для определения истинно положительных результатов требуются точные пороговые значения. Очевидно, для уверенной идентификации положительных результатов требуется определенное количество или процент прочтений, специфичных для организма, но установить подтвержденные диагностические пороговые значения можно только путем проведения множества контролируемых экспериментов по секвенированию с использованием стандартизированных протоколов сбора образцов и секвенирования. Предпочтительным методом создания положительного контроля является использование имитаторов микробных сообществ, содержащих известные концентрации геномного материала из нескольких таксонов, для которых были составлены тщательно подобранные справочные базы данных [42]. Отрицательный контроль может включать в себя секвенирование пустых образцов, а также образцов, полученных из незараженных участков (например, здоровый глаз) для определения исходного микробного консорциума пациента. Сравнивая предполагаемый эталонный стандарт со значениями, полученными в результате анализов, проведенных на образцах пациентов, можно эмпирически оценить вероятность положительного (или отрицательного) результата теста. Добавление внутреннего контроля также может помочь в калибровке порогов чувствительности и специфичности, [43] особенно если ожидается, что количество микроорганизмов в образце пациента будет низким [44].

Загрязнение микробиома при секвенировании

Очевидно, что реагенты и устройства для сбора образцов, используемые при экстракции, амплификации и/или подготовке библиотеки, служат источником загрязняющих нуклеиновых кислот, которые обычно происходят от повсеместно распространенных микробов, обитающих в воде и почве [45–47]. В образцах с низким содержанием микробов количество прочтений, полученных из этих загрязняющих веществ, может превышать количество прочтений, полученных из интересующего патогена, искажая пропорцию популяций микробов, представленных в образце [48]. Характерными признаками загрязнения при секвенировании являются наличие распространенных загрязняющих организмов [49], эффекты, связанные с партиями образцов [50], низкая воспроизводимость внутри и между сериями, а также результаты, противоречащие общепринятому пониманию микробной экологии [45]. Прежде чем делать какие-либо выводы относительно наблюдаемого таксономического распределения, необходимо оценить вероятность загрязнения.

Определение чувствительности к противомикробным препаратам

Возникает закономерный вопрос: смогут ли врачи-клиницисты и микробиологи точно интерпретировать значимость обнаруженных генов устойчивости к противомикробным препаратам, зная, что их полный спектр и важность еще предстоит выяснить? Ситуация осложняется тем, что значимость этих маркеров может зависеть от заранее установленных пороговых значений и определения количества связанных с ними считываний, которые могут указывать на фенотипическую устойчивость. Справочные базы данных потребуют регулярного обновления, чтобы точно отражать динамичный характер приобретения устойчивости к противомикробным препаратам клинически значимыми патогенами. Пока эти проблемы не будут решены, придется использовать другие методы определения чувствительности к противомикробным препаратам (например, автоматизированный MALDI-TOF [51, 52]), которые сами по себе ограничены, поскольку зависят от культуры.

Затраты на секвенирование

Несмотря на то что стоимость секвенирования на одну базу и на один запуск продолжает снижаться, большинство анализов в области метагеномики по-прежнему непомерно дороги для многих областей применения. Большинство исследовательских проектов проводятся в условиях финансовых ограничений. Не случайно наиболее распространенным подходом к секвенированию долгое время оставалось объединение образцов в партии и отправка их в удаленные

центры секвенирования. Однако потребность в быстром проведении диагностических тестов на инфекционные заболевания означает, что клиническим микробиологическим лабораториям вскоре придется задуматься о создании собственных дорогостоящих центров секвенирования. Помимо затрат, связанных с процедурами в лабораторных условиях, необходимо вложить значительные средства в покупку и постоянное обновление вычислительной инфраструктуры и программного обеспечения, способных обрабатывать огромные объемы данных секвенирования [53], или использовать масштабируемые облачные платформы для биоинформатики [54, 55], которые обычно более доступны по цене. Кроме того, поскольку современные диагностические парадигмы в клинической микробиологии основаны на недорогих и массовых тестах, предложения о внедрении молекулярных тестов в клиническую практику почти наверняка будут подвергнуты анализу методами управления с использованием ресурсов [56, 57]. Возможно, секвенирование никогда не будет таким же недорогим, как обычные микробиологические тесты, но исследования экономической эффективности способны показать, можно ли компенсировать затраты на секвенирование его способностью быстро и точно ставить диагнозы, что в свою очередь предотвратит дорогостоящие осложнения у пациентов. В случае с эндофтальмитом экономическая целесообразность может быть определена на основе практической демонстрации того, что более быстрая диагностика инфекционных заболеваний приводит к меньшему количеству случаев, угрожающих зрению, наиболее тяжелые из которых способны привести к полной потере зрения и/или необходимости пожизненного наблюдения. Даже в этом случае скорее всего между научными учреждениями, больницами и компаниями медицинского страхования будут возникать бюрократические споры по поводу политики возмещения расходов, которая по-прежнему в значительной степени ориентирована на тестирование, основанное на гипотезах.

Будущее клинической метагеномики эндофтальмитов

По мере того как клиническая метагеномика становится реальностью, можно с уверенностью сказать, что в скором времени будут предприняты попытки внедрить секвенирование для диагностики целого ряда инфекций. Наше внимание неизбежно будет приковано к применению этой технологии для определения инфекций, в отношении которых существующие тесты неэффективны. При эндофтальмите рабочие процессы секвенирования должны решать проблемы, связанные с небольшим количеством образцов, склонных к загрязнению, и прогнозировать, как эти факторы повлияют на процесс валидации диагностики и интерпретацию результатов. Помимо технических вопросов клиницисты и микробиологи могут быть впечатлены объемом данных, предоставляемых секвенированием, проблемой, которая может быть распространена на другие инфекционные заболевания глаз и инфекции в целом. Это будет иметь значение в следующем десятилетии, поскольку мы создаем опытную базу для валидации новой технологии. Мы должны убедиться, что готовы обрабатывать эти данные в целях эффективного лечения пациентов, а также в соответствии с новыми этическими и правовыми стандартами, касающимися раскрытия информации о случайных находках и безопасного обмена данными. Однако в будущем можно представить день, когда быстро растущие базы данных секвенирования станут настолько актуальными и полными, что для высокоточного определения соответствующего патогена и его фенотипа потребуется лишь небольшое количество новых данных о последовательности. Теперь задача состоит в том, чтобы коллективно создать эту базу данных, а также получить подтвержденный клинический опыт, который будет использоваться для расчета, позволяющего быстро и просто определять патогены в будущем. Решив проблемы, связанные с интерпретацией и внедрением, желательно с помощью консорциума, мы сможем реализовать наш коллективный мандат по сохранению зрения у пациентов с этой распространенной и нередко разрушительной инфекцией. ●

Литература

1. Ung L., Bispo P.J.M., Shanbhag S.S., et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv. Ophthalmol.* 2019; 64 (3): 255–271.
2. Loman N., Pallen M. XDR-TB genome sequencing: a glimpse of the microbiology of the future. *Future Microbiol.* 2008; 3 (2): 111–113.
3. Астахов С.Ю., Вохмяков А.В. Эндофтальмит: профилактика, диагностика, лечение. *Офтальмологические ведомости.* 2008; 1 (1): 35–45.
4. Jones D.B., Liesegang T.J., Robinson N.M., Washington J.A. *Laboratory diagnosis of ocular infections.* Washington DC: American Society for Microbiology; 1981.
5. Lee A.Y., Akileswaran L., Tibbetts M.D., et al. Identification of torque teno virus in culture-negative endophthalmitis by representational deep DNA sequencing. *Ophthalmology.* 2015; 122 (3): 524–530.
6. Kim E., Chidambaram J.D., Srinivasan M., et al. Prospective comparison of microbial culture and polymerase chain reaction in the diagnosis of corneal ulcer. *Am. J. Ophthalmol.* 2008; 146 (5): 714–723, 723e.

7. Fournier P.-E., Drancourt M., Colson P., et al. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11 (8): 574.
8. Bertelli C., Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2013; 19 (9): 803–813.
9. Nakamura S., Maeda N., Miron I.M., et al. Metagenomic diagnosis of bacterial infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (11): 1784.
10. Staley J.T, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 1985; 39: 321–346.
11. Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A., et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J. Biotechnol.* 2017; 243: 16–24.
12. Goldberg B., Sichtig H., Geyer C., et al. Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics. *MBio.* 2015; 6 (6): e01888–01815.
13. Gu W., Miller S., Chiu C.Y. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection. *Annu. Rev. Pathol.* 2019; 14: 319–338.
14. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74 (12): 5463–5467.
15. Mardis E.R. Next-generation sequencing platforms. *Ann. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif).* 2013; 6: 287–303.
16. Fadrosch D.W., Ma B., Gajer P., et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome.* 2014; 2 (1): 6.
17. Janda J.M., Abbott S.L. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (9): 2761–2764.
18. Faria N.R., Quick J., Claro I., et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature.* 2017; 546 (7658): 406.
19. Thézé J., Li T., du Plessis L., et al. Genomic epidemiology reconstructs the introduction and spread of Zika virus in Central America and Mexico. *Cell Host Microbe.* 2018; 23 (6): 855–864.e857.
20. Quick J., Loman N.J., Duraffour S., et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature.* 2016; 530 (7589): 228.
21. Westermann A.J., Förstner K.U., Amman F., et al. Dual RNA-seq unveils noncoding RNA functions in host–pathogen interactions. *Nature.* 2016; 529 (7587): 496.
22. Westermann A.J., Gorski S.A., Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10 (9): 618.
23. Wang Z., Gerstein M., Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 2009; 10 (1): 57.
24. Zaas A.K., Chen M., Varkey J., et al. Gene expression signatures diagnose influenza and other symptomatic respiratory viral infections in humans. *Cell Host Microbe.* 2009; 6 (3): 207–217.
25. Besser J., Carleton H.A., Gerner-Smidt P., et al. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24 (4): 335–341.
26. Buermans H., Den Dunnen J. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842 (10): 1932–1941.
27. Goodwin S., McPherson J.D., McCombie W.R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics.* 2016; 17 (6): 333.
28. Loman N.J., Constantinidou C., Chan J.Z., et al. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10 (9): 599.
29. Pollard M.O., Gurdasani D., Mentzer A.J., et al. Long reads: their purpose and place. *Hum. Mol. Genet.* 2018; 27 (R2): R234–R241.
30. Lu H.Y., Giordano F., Ning Z.M. Oxford nanopore MinION sequencing and genome assembly. *Genom. Proteom. Bioinform.* 2016; 14 (5): 265–279.
31. Lin B., Hui J.N., Mao H.J. Nanopore technology and its applications in gene sequencing. *Biosensors.* 2021; 11 (7): 214.
32. Karawdeniya B.I., Bandara Y.M.N.D.Y., Nichols J.W., et al. Challenging nanopores with analyte scope and environment. *J. Anal. Test.* 2019; 3 (1): 61–79.
33. Ciuffreda L., Rodríguez-Pérez H., Flores C. Nanopore sequencing and its application to the study of microbial communities. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021; 19: 1497–1511.
34. Van Gelder R.N. Molecular diagnostics for ocular infectious diseases: LXXVIII Edward Jackson memorial lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 2022; 235: 300–312.
35. Kai S., Matsuo Y., Nakagawa S., et al. Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION™ nanopore sequencer. *FEBS Open Bio.* 2019; 9 (3): 548–557.
36. Charalampous T., Kay G.L., Richardson H., et al. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat. Biotechnol.* 2019; 37 (7): 783–792.
37. Tyler A.D., Mataseje L., Urfano C.J., et al. Evaluation of Oxford nanopore's MinION sequencing device for microbial whole genome sequencing applications. *Sci. Rep.* 2018; 8 (1): 10931.
38. Low L., Nakamichi K., Akileswaran L., et al. Deep metagenomic sequencing for endophthalmitis pathogen detection using a nanopore platform. *Am. J. Ophthalmol.* 2022; 242: 243–251.

39. Subedi D., Kohli G.S., Vijay A.K., et al. Accessory genome of the multi-drug resistant ocular isolate of *Pseudomonas aeruginosa* PA34. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215038.
40. Pochon X., Bott N.J., Smith K.F., Wood S.A. Evaluating detection limits of next-generation sequencing for the surveillance and monitoring of international marine pests. *PLoS One*. 2013; 8 (9): e73935.
41. Frey K.G., Herrera-Galeano J.E., Redden C.L., et al. Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. *BMC Genomics*. 2014; 15 (1): 96.
42. Hardwick S.A., Deveson I.W., Mercer T.R. Reference standards for next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 2017; 18 (8): 473.
43. Hasan M.R., Rawat A., Tang P., et al. Depletion of human DNA in spiked clinical specimens for improvement of sensitivity of pathogen detection by next-generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54 (4): 919–927.
44. Schlaberg R., Chiu C.Y., Miller S., et al. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2017; 141 (6): 776–786.
45. De Goffau M.C., Lager S., Salter S.J., et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat. Microbiol.* 2018; 3 (8): 851–853.
46. Eisenhofer R., Minich J.J., Marotz C., et al. Contamination in low microbial biomass microbiome studies: issues and recommendations. *Trends Microbiol.* 2019; 27 (2): 105–117.
47. Kim D., Hofstaedter C.E., Zhao C., et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome*. 2017; 5 (1): 52.
48. Dekker J.P. Metagenomics for clinical infectious disease diagnostics steps closer to reality. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00850–e00818.
49. Salter S.J., Cox M.J., Turek E.M., et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol.* 2014; 12 (1): 87.
50. Miller R.R., Uyaguari-Diaz M., McCabe M.N., et al. Metagenomic investigation of plasma in individuals with ME/CFS highlights the importance of technical controls to elucidate contamination and batch effects. *PloS One*. 2016; 11 (11): e0165691.
51. Perez K.K., Olsen R.J., Musick W.L., et al. Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. *Archiv. Pathol. Lab. Med.* 2012; 137 (9): 1247–1254.
52. Huang A.M., Newton D., Kunapuli A., et al. Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57 (9): 1237–1245.
53. Kwong J.C., McCallum N., Sintchenko V., Howden B.P. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. 2015; 47 (3): 199–210.
54. Wall D.P., Kudtarkar P., Fusaro V.A., et al. Cloud computing for comparative genomics. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11: 259.
55. Schatz M.C., Langmead B., Salzberg S.L. Cloud computing and the DNA data race. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (7): 691–693.
56. Greninger A.L. The challenge of diagnostic metagenomics. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2018; 18 (7): 605–615.
57. Ramanan P., Bryson A.L., Binnicker M.J., et al. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31 (1): e00024–e00017.

Nanopore Sequencing – a New Approach in the Diagnosis and Treatment of Endophthalmitis: a Review of Current Research

Ye.N. Kuznetsov, S.A. Abakarov, I.A. Loskutov, PhD

M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Scientific Research Institute

Contact person: Sapiyulla A. Abakarov, Boss@limesmedia.ru

Endophthalmitis is an acute ophthalmological condition that requires timely and accurate diagnosis and treatment. To date, microbiological methods such as Gram staining microscopy and cultivation are considered the gold standard for the detection of pathogens. However, in a significant number of cases, the pathogen remains undetected, which may be due to the non-infectious nature of inflammation, the inability to identify a new microorganism, or the fact that the pathogen is not cultivated after preliminary antibiotic treatment. The article discusses the microbiological features of endophthalmitis, existing methods for diagnosing microorganisms, as well as modern molecular technologies such as next-generation on-board sequencing. This innovative approach improves the accuracy of diagnosis and the effectiveness of treatment of infectious diseases, opening up new opportunities for more effective detection of microorganisms in endophthalmitis.

Keywords: nanopore sequencing, endophthalmitis, diagnosis of endophthalmitis