

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной
медицины»

На правах рукописи

Сулян Офелия Спартаковна

**Характеристика генов *tsr*-типа и других значимых детерминант
резистентности у грамотрицательных бактерий, выделенных от людей и
животных**

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук, профессор
Сухинин Александр Александрович

Санкт-Петербург - 2026

Оглавление

Введение	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Применение антибиотиков и развитие резистентности.....	14
1.2. Происхождение и механизмы распространения устойчивости к полимиксидам	17
1.3. Устойчивость к бета-лактамным антибиотикам, классификация β -лактамаз.....	27
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Фенотипические методы исследования	34
2.1.1. Выделение, идентификация и хранение изолятов	34
2.1.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам	35
2.1.3. Фенотипические тесты для определения МПК колистина	39
2.2. Подбор праймеров и ПЦР.....	41
2.3. Секвенирование	43
2.3.1. Секвенирование гена 16S рибосомальной РНК	43
2.3.2. Полногеномное секвенирование	45
2.4. Биоинформатический анализ данных	46
2.5. Определение вирулентных свойств на септической модели.....	48
2.6. Обработка результатов исследования.....	51
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	52
3.1. Рабочая коллекция изолятов и характеристика	52
3.2. Оценка распространения генов БЛРС	62
3.3. Оценка распространения генов карбапенемаз	72
3.3.1. <i>Thiopseudomonas alkaliphila</i> , несущий ген <i>bla</i> _{IMP-27}	83
3.4. Устойчивость к колистину	89
3.4.1. Гены <i>mcr</i> -типа у изолятов выделенных из животноводческих комплексов 89	
3.4.2. Ген <i>mcr</i> -типа, у изолятов клинического происхождения	98
3.4.3. Сравнительный анализ методов определения МПК к колистину	105
3.5. Оценка резистенции изолятов и генетических линий <i>Escherichia coli</i>	110

Заключение	118
Выводы	125
Список сокращений	127
Благодарности	128
Список литературы	129

Введение

Актуальность темы исследования

Проблема антибиотикорезистентности является одним из критических вызовов 21 века, связанная с увеличением средней продолжительности жизни населения, ростом их численности, интенсификации миграций, многократно возросшей нагрузкой на животноводческие комплексы, где активно применяются препараты, аналогичные используемым в медицине. Приобретение людьми устойчивых бактерий к тем или иным антибиотикам возможно: во-первых - при контакте с внутрибольничной средой, где устойчивость к антибактериальным препаратам является глобальной проблемой; во-вторых - при получении устойчивых форм бактерий, несущих маркеры генов резистентности через животноводческую продукцию. Последнее связано с тем, что животноводческие комплексы имеют ряд признаков, характерных для отделений реанимации и интенсивной терапии: высокая плотность микроорганизмов и интенсивный прессинг антимикробными препаратами, в том числе в качестве стимуляторов роста [1]. За счет контакта с почвенным биоценозом животноводческие комплексы могут быть местом формирования новых детерминант резистентности при мобилизации генов устойчивости свободноживущих бактерий на мобильные генетические элементы с последующей передачей клинически-значимым бактериям. В отличие от внутрибольничной среды, распространению генетических детерминант резистентности в животноводческих комплексах уделяется несравнимо меньшее внимание. Более рациональный подход соответствует концепции «Единое здоровье» (One Health EJP), при котором здоровье человека, состояние внутрибольничной среды, животноводческих комплексов и экосистем рассматривается как единая система и используется единый методический подход для их изучения.

Отрасль сельского хозяйства является одним из крупнейших потребителей антимикробных препаратов. На животноводство приходится три четверти

производимых в мире объемов противомикробных средств, общих для медицины и ветеринарии. В США на эти цели уходит 80% потребляемых в стране антибиотиков (Questions and Answers: Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals | FDA). Мониторинг использования антимикробных препаратов в российском животноводстве затруднен из-за отсутствия публичной национальной статистики, доступной в США и странах ЕС. О масштабах проблемы позволяют судить данные агентства RNC Pharma, согласно которым общие объемы ветеринарных лекарств достигают до 35 тысяч тонн в год, с доминированием антибиотиков и противопаразитарных препаратов. В то же время цифры МАКМАХ (платформа АМСmodel) демонстрируют схожую проблему нерационального расхода в медицине, где препараты группы риска формируют до 86% совокупного медицинского потребления. В сельском хозяйстве применяются критически важные группы антимикробных препаратов, которые являются часто основой антибактериальной терапии в медицинской практике: полимиксины, цефалоспорины третьего поколения, аминогликозиды и макролиды [2, 3].

В инфекционной патологии животных и человека ведущую роль занимают микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, характеризующиеся большим разнообразием механизмов устойчивости к антимикробным препаратам [4-6]. Микроорганизмы *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. и другие виды бактерий, обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), и как правило являются носителями различных детерминант резистентности. По данным мониторингов 2019-2020 года, выявлено 66,7% устойчивых форм *E. coli* к 6-7 группам антимикробных препаратов (АМП), а количество выделенных мультирезистентных штаммов увеличилось на 5,2% среди изолятов из сельскохозяйственных комплексов [1, 7]. Согласно данным «МАРАФОН 2013-2014» - многоцентрового эпидемиологического исследования клинических изолятов, 82,2% изолятов *Enterobacteriaceae* обладали фенотипом множественной устойчивости, 1,1% - экстремальной устойчивости [8]. Активное использование

АМП в сельском хозяйстве имеет прямую корреляцию с увеличением частоты устойчивых форм *E. coli*, выделенных от здоровых животных [9, 10]. С каждым годом растет количество бактерий, продуцирующих β -лактамазы, в мясной продукции особенно в мясе птицы [11]. Помимо передачи устойчивых форм бактерий через продукты животноводства, происходит распространение через сточные воды и животных, таких как птицы и грызуны [12]. В России роль животноводческих комплексов и их вклад в формирование проблемы антибиотикоустойчивости исследуется в меньшей степени, чем внутрибольничная среда, что является неблагоприятным фактором для общественного здравоохранения в контексте борьбы с распространением детерминант резистентности [13].

Одним из ярких примеров роли животноводства в распространении устойчивости к критически важным группам антибактериальных препаратов является появление генов *mcr*-группы, устойчивости к полимиксидам, которые на данный момент являются основой антибактериальной терапии инфекций, вызванных множественно-резистентными грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [14, 15]. В настоящее время, согласно списку Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) критических антимикробных препаратов, полимиксины отнесены к критически важным, резервным антибиотикам для здравоохранения. Формирование устойчивости к полимиксидам (колистин) и распространение соответствующих генетических детерминант связано непосредственно с их применением в сельском хозяйстве [16, 17].

Цель исследования

Охарактеризовать изоляты грамотрицательных бактерий, выделенных от людей и сельскохозяйственных животных и несущих гены *mcr*-типа и другие детерминанты резистентности.

Задачи исследования

1. Определить профиль устойчивости к антибактериальным препаратам у грамотрицательных бактерий, выделенных из образцов животноводческих комплексов.
2. Оценить распространение генов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз в животноводческих комплексах.
3. Установить распространение генов *mcr*-типа в животноводческих комплексах, внебольничной и внутрибольничной среде.
4. Охарактеризовать изоляты *E. coli*, выделенные в разных животноводческих комплексах, на основе полногеномного секвенирования.

Научная новизна

Впервые на территории Российской Федерации проведен скрининг изолятов с генами устойчивости к колистину *mcr*-типа в животноводческих хозяйствах, внебольничной и внутрибольничной среде в рамках концепции единого здоровья; показана циркуляция продуцентов приобретенной фосфоэтаноламинтрансферазы во всех трех группах; дана молекулярно-генетическая характеристика выявленных изолятов.

Впервые в России выявлен продуцент карбапенемазы *bla*_{IMP-27}, принадлежащий к новому для отечественной микробиологии виду *Thiopseudomonas alkaliphila*. Впервые для данного вида микроорганизма проведена оценка вирулентных свойств *in vivo* на септической модели на мышах.

Найдены консервативные участки генов СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8 и СТХ-М-9, TEM, GES и SHV, на основе которых разработаны и апробированы ПЦР-системы для определения наличия генов БЛРС у бактерий.

Установлено, что в животноводческих комплексах широко распространены гены *bla*_{СТХ-М-9} – в 34% и *bla*_{СТХ-М-1} – 25%, что требует мер по ограничению

применения ряда препаратов в животноводстве, включая цефалоспорины III-IV поколений.

Выявлены патогенные для птиц эшерихии (АРЕС) серотипов O:83 и O:185, характерные как для инфекций человека, так и животных. Их высокий вирулентный потенциал и схожий набор генов с уропатогенными эшерихиями (UPEC) указывают на возможный зоонозный путь передачи.

На основании результатов проведенной работы получены два патента:

1. Сулян О.С., Агеевец В.А., Сухинин А.А., Чулкова П.С., Цветкова И.А., Сидоренко С.В. Эталонный штамм вида *Thiopseudomonas alkaliphila*, впервые идентифицированный в России. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2785117C1, номер заявки: 2022122086, дата регистрации: 12.08.2022, дата публикации: 02.12.2022.
2. Моисеева К.А., Сухинин А.А., Приходько Е.И., Макавчик С.А., Сулян О.С. Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных. Тип: полезная модель, номер патента RU204004U1, номер заявки: 2020136875, дата регистрации: 09.11.2020, дата публикации: 04.05.2021.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний о механизмах и путях распространения генов *mcr*-типа, карбапенемаз и β -лактамаз расширенного спектра, определяющих устойчивость к критически важным антибактериальным препаратам, эффективность которых напрямую связана с долей летальных исходов при терапии инфекций, ассоциированных с оказанием медицинской помощи, что в совокупности является критичной областью современного здравоохранения.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные данные могут использоваться как основание для разработки новых концепций и стратегий борьбы по ограничению применения антибактериальных препаратов, в частности,

группы полимиксинов, подобно мерам, принятым в ряде стран (Эстония, Китай) [18, 19].

Создана рабочая коллекция штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных из сельскохозяйственных комплексов (191 шт.), с фенотипической и генотипической характеристикой.

В результате данной работы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – ОБОЛЕНСК» депонировано три авторских штамма микроорганизмов: *E. coli* №Есо-103 и №Есо-151 (свидетельства о депонировании №323 и №324 от 6 июня 2022 года) и *T. alkaliphila* 177 (свидетельство о депонировании № 336 от 6 июня 2022 года). В международную базу данных NCBI GenBank депонированы: нуклеотидная последовательность полноразмерного генома изолята *T. alkaliphila* 177 с номером доступа CP168247.1; плазида с геном *mcr-1*: *Escherichia coli* strain 5571 plasmid pMCR-1_Msc_2 с номером доступа NZ_MT119279.1; последовательность с геном NDM: *Escherichia coli* strain 5571 plasmid pNDM-1_Msc_Eco-5571 с номером доступа MT119280.1.

Полученные результаты внедрены в учебный процесс ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» в виде учебно-методического пособия «Лабораторные методы детекции колистин-резистентных изолятов» (2026 год) – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования

Объектом исследования являлись грамотрицательные микроорганизмы, выделенные из животноводческих комплексов (крупный рогатый скот (КРС), свиньи, птицы и рыб). Методология спланирована в соответствии с целью диссертационного исследования, а подходы выбраны с учетом микробиологического, молекулярно-генетического (включая полногеномное секвенирование), а также биологического и статистического методов.

Микробиологические методы: культуральный, микроскопия (оптический микроскоп и сканирующий электронный микроскоп (СЭМ)), видовая идентификация с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам - метод серийных разведений и диско-диффузионный метод. Фенотипические тесты для определения чувствительности к колистину. Тесты для определения ферментативной активности.

Молекулярно-генетические методы: определение генетических детерминант резистентности методом ПЦР, анализ последовательностей ДНК с помощью секвенирования по Сэнгеру, на платформах Illumina MiSeq и Oxford Nanopore.

Биологический метод: выявление вирулентных свойств изолята *T. alkaliphila* *in vivo* на септической модели на мышах.

Статистические методы анализа биологических данных: критерии хи-квадрата Пирсона, однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.1.1.

Положения, выносимые на защиту

1. Для скотоводческих комплексов Ленинградской области характерно присутствие в них микроорганизмов, несущих гены БЛРС групп *bla*_{CTX-M-9} – 34%, *bla*_{CTX-M-1} – 25%, *bla*_{CTX-M-8} – 6,2%, включая варианты их одновременного наличия;
2. Устойчивость микроорганизмов к карбапенемным антибиотикам в скотоводческих комплексах обусловлена наличием гена *bla*_{IMP-27}. Карбапенемаза типа *bla*_{IMP-27} кодируется геном, находящимся в составе генной кассеты *aadA - sat2 - bla*_{IMP-27} - *IntI2*, встроенной в состав хромосомы путем фаговой трансдукции у микроорганизма – *T. alkaliphila*, впервые идентифицированного на территории России;
3. Циркуляция генов *mcr*-типа наблюдается: в животноводческих комплексах у здорового стада КРС, во внутрибольничной среде у детей без истории госпитализации, во внебольничной среде – среди множественно резистентных

изолятов, где наблюдается одновременное наличие генов *mcr-1* и *bla*_{NDM-1} у изолята *E. coli* ST31, выделенного от новорождённого ребёнка с вентилятор-ассоциированной пневмонией. Анализ плазмидной ДНК показывает возможное межрегиональное и межвидовое распространение резистентных генов. С плазмидой, несущей ген *mcr-1*, наиболее близкой является плазида, выделенная от черного коршуна в Алтайском крае, а с плазмидой, содержащей ген *bla*_{NDM-1} — плазмиды у нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* из Китая (№ GenBank MN310375), США (№ GenBank CP018817.1) и *E. coli* (№ GenBank CP040884.1) из Норвегии.

Апробация результатов работы и публикации

Научно-исследовательская работа апробирована на заседании кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины».

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на семи международных, всероссийских конгрессах.

Международная научно-практическая конференция «Инновационные научные исследования: теория, методология, тенденции развития» (Россия, Уфа, 2019);

- XIV международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия» (Россия, Санкт-Петербург, 2019);
- II ежегодный Европейский конгресс «Единое здоровье» по зоонозам пищевого происхождения, устойчивости к противомикробным препаратам и новым угрозам (OneHealth EJP) (Чешская республика, Прага, 2020);
- XXII Российская конференция «Современные проблемы и перспективы антимикробной терапии» (Россия, Москва, 2020);

- I Всероссийский конгресс с международным участием по фундаментальным проблемам лабораторной диагностики (Россия, Москва, 2021);
- Семинар ученых ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России «Infections and children» (Россия, Санкт-Петербург, 2021);
- XVI международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень» (Россия, Санкт-Петербург, 2021).

Основные положения диссертации изложены в 8 научных работах. Научных работ, рекомендованных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации и индексируемых международных базах данных опубликовано четыре статьи. Получены два патента (на изобретение и полезную модель). Тезисы опубликованы в материалах Европейского научного конгресса (Чешская республика, Прага, 2020). В образовательный процесс внедрено одно учебно-методическое пособие, зарегистрированное в РИНЦ.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 149 страницах компьютерного текста, включает в себя введение, обзор литературы, основную часть, заключение, выводы, список сокращенных терминов, благодарности, список литературы и приложения. Диссертационная работа иллюстрирована 22 рисунками и 25 таблицами. Список использованной литературы представлен 160 источниками, из которых 37 отечественной литературы, 123 публикаций иностранных авторов.

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора

Работа проводилась в рамках гранта Российского Научного фонда в период 2018-2019 гг. «Распространение генов устойчивости к полимиксинам *mcr*-типа у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге и Ленинградской области», руководитель - старший научный сотрудник, к.б.н. Агеев В.А. (номер гранта: 18-74-00098). Все этапы экспериментальной части диссертационной работы, а также литературный обзор

выполнены автором самостоятельно, за исключением определения вирулентности *in vivo* на септической модели на мышах, проводимые в ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская область) и электронной сканирующей микроскопии, проводимой в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Применение антибиотиков и развитие резистентности

Применение антибактериальных препаратов произвело революцию с начала 1940-х годов в лечении инфекционных заболеваний. Интенсивное использование антибиотиков привело к появлению устойчивых форм бактерий. Так, через семь лет после применения пенициллина, появились устойчивые штаммы *Staphylococcus aureus*, продуцирующие пенициллиназу. На всем протяжении применения АМП наблюдается относительно быстрое появление устойчивости к ним. В среднем, период от внедрения в практику антибиотика и до времени появления резистентных штаммов варьируется от 1 до 10 лет [20]. Однако из-за того, что вновь выпускаемые антибиотики принадлежат к известным фармакологическим классам, появление устойчивости у бактерий регистрируется все чаще. За последнее 5 лет было потрачено 17 млн. долларов на исследование и разработку новых этиотропных препаратов [21].

Быстрому развитию антибиотикорезистентности способствует нерациональное и неоправданное применение антибиотиков в ветеринарной практике. Применение большого количества антибиотиков в животноводстве позволяет устойчивым формам бактерий передаваться через пищевую цепь от сельскохозяйственных животных к людям [22]. Так, например, бактерии вида *E. coli* животного происхождения являются источником различных генов устойчивости к антибактериальным препаратам, контаминирующие пищевые продукты [23]. В связи с этим, ВОЗ и Международное эпизоотическое бюро создали список критических антимикробных средств, используемых в ветеринарии и медицине. В ветеринарии применяются антибиотики тех же классов, что и в медицине для лечения тяжелых инфекций у людей.

Из-за большого количества производственных предприятий с интенсивным развитием животноводства масштаб применения антибиотиков в производстве пищевых продуктов значительно вырос по сравнению с применением в

медицинских целях. Как известно, в условиях интенсивного животноводства, очень важно не допускать возникновения и развитие инфекционных болезней. У сельскохозяйственных животных, антибиотики преимущественно применяются при различных острых и хронических формах болезней. Так, например, наиболее частыми этиологическими агентами при инфекционных гастроэнтеритах молодняка сельскохозяйственных животных являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Проведенный мониторинг среди энтеробактерий этиологических значимых групп, вызывающих острые кишечные расстройства у телят, показал, что в течение продолжительного времени отмечается рост числа резистентных изолятов ко всем группам АМП [7, 24].

Использование антибиотиков, особенно «кормовых», можно отследить в птицеводстве, где нет замкнутого цикла производства (племенное яйцо и/или суточные цыплята поступают в хозяйства из сторонних организаций). Обработку с антибиотиками проводят на различных этапах жизни цыплят (на момент ввода, когда птица сталкивается с окружающей средой; по окончании вакцинации живыми противовирусными вакцинами). С одной стороны, данные меры оправданы с экономической точки зрения, так как помогают сохранить поголовье (откормочное) и снизить влияние патогенного фона с завезенной птицей на птицефабрику. С другой стороны, в геометрической прогрессии растет число возбудителей болезней, приобретающих устойчивость к нескольким видам АМП. По данным Американской медицинской ассоциации (American Medical Association) «сельскохозяйственные» антибиотики также являются фактором загрязнения почвы и воды [25-27].

Антибиотики в больших количествах применяются, в том числе и в промышленном разведении рыб, где также распространены бактериальные инфекции. В связи с этим, без применения антимикробных препаратов для профилактики инфекционных болезней животных становится невозможным поддерживать продуктивность животных в условиях интенсивного животноводства. Кроме того, в некоторых странах антибиотики используются в

качестве кормовых добавок для увеличения прироста животных, особенно у молодых, например, у цыплят-бройлеров, поросят и телят, находившихся на искусственном вскармливании [28, 29].

Один из важнейших факторов, способствующих возникновению антибиотикорезистентности – это применение АМП как стимуляторов роста в субтерапевтических концентрациях (т.е. в дозах, меньших, чем для применения в терапевтических целях для лечения инфекционных болезней) [30, 31].

В некоторых странах, после появления в 1950-х гг. стимуляторов роста животных, применение антибиотиков достигло больших масштабов, что привело к «буму» их применения. Так, в США количество антибиотиков, используемых как стимуляторов роста животных, возросло в 50 раз (с 110 тонн до 5500 тонн). При этом применение антибиотиков для терапевтических целей в медицине и ветеринарии возросло в 10 раз. Данные действия привели к тому, что чувствительные изоляты бактерий приобрели устойчивость ко многим антибиотикам. Так, в Англии количество штаммов *E. coli*, устойчивых к тетрациклину, увеличилась с 3,5% до 63,2% за несколько лет (с 1957 по 1990 гг.) [32]. Глобальное использование антибиотиков продолжалось до 1986 года, и после этого некоторые страны начали вводить запреты на использование тех или иных антибиотиков. Одной из первых стран, запретивших использование антибиотиков как стимуляторов роста, была Швеция [33]. Однако, обеспокоенность в связи с увеличением количества устойчивых штаммов не угасала. Вслед за Швецией, Дания и Норвегия в 1995 году запретили использование авоперацина [34-36]. С 2006 года на территории ЕС запретили использование антибиотиков как стимуляторов роста для животных [37]. Интересен тот факт, что, несмотря на запрет в 2014 году, по данным Европейского медицинского агентства, в 26 странах ЕС для ветеринарных нужд было продано 8122 тонны антибиотиков разных классов [38].

Во Всероссийском центре качества и стандартизации кормов и лекарственных средств для животных (ФГБУ «ВГНКИ») были проведены

исследования 200 штаммов сальмонелл. Результаты сравнительных исследований с периодами 1987 - 2009 гг. и 2010 – 2012 гг. показали, что количество сальмонелл, обладающих устойчивостью к ампициллину, доксициллину и стрептомицину, оказалось в два раза выше, чем среди сальмонелл, полученных до 2000 года. Также было показано многократное увеличение устойчивых штаммов к фторхинолонам, что вызывает особую озабоченность, так как данная группа антибиотиков входит в список препаратов «последнего резерва» для лечения инфекционных заболеваний [39].

В настоящее время в мире, в том числе и в России, нет четкой системы учета и контроля за использованием антибиотиков в ветеринарии. Таким образом, полученные данные показывают, что страны должны стремиться к ограничению масштабов применения антибиотиков в животноводстве с целью улучшения не только здоровья животных, но и людей.

1.2. Происхождение и механизмы распространения устойчивости к полимиксинам

Природная устойчивость к полимиксинам

Природная устойчивость к полимиксинам впервые была описана Muyembe T. у бактерий вида *Edwardsiella tarda* в 1973 году [40]. После, была описана природная устойчивость к полимиксинам у различных микроорганизмов рода *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Burkholderia* spp. [41, 42].

В основном, природная резистентность к полимиксинам характеризуется модификацией липополисахарида (ЛПС). Происходит снижение отрицательного заряда внешней мембраны из-за присоединения 4-амино-4-дезоксид-арабинозы (L – Ara4N), вызванной экспрессией оперона *arnBCADTEF*, и фосфотаноламина (PEtN). Устойчивость к полимиксинам также обуславливается мутацией в гене *galU*, который участвует в биосинтезе L – Ara4N, и генах, отвечающих за активацию оперона *arnBCADTEF*, двухкомпонентной системой

RppA/RppB. Еще один механизм устойчивости связан с опероном *arnBCADTEF*, регулируемым двухкомпонентной системой PhoP/PhoQ, а также мутациями в генах *arnB* и *arnC* [43, 44].

Таким образом, механизм устойчивости связан так или иначе с липидом А, входящим в состав ЛПС, либо с добавлением катионных групп, либо с ингибированием биосинтеза.

Хромосомные мутации

Подобно механизму природной устойчивости к полимиксинам, для хромосомных мутаций также характерно модификация ЛПС посредством присоединения катионных групп (L-Ara4N и PEtN).

Другой механизм резистентности к полимиксинам связан с различными генами и оперонами, приводящий к модификации липида А. К таковым относятся гены, кодирующие белки двухкомпонентных систем - PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ. Модификация липида А происходит посредством трансфераз группы Pmr и регулируется вышеупомянутыми двухкомпонентными системами [45, 46].

Экспрессия гена трансферазы PmrD происходит после активации двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ, приводящей к экспрессии генов, кодирующих системы транспорта магния (Mg^{2+}), участвующих в модификации ЛПС, снижающих клеточный стресс, связанный либо с факторами вирулентности, либо с низким pH. Далее, активируется двухкомпонентная система PmrA/PmrB, которая кодируется генами *pmrA* и *pmrB*. Фагосомы макрофагов, повышенное содержание железа (Fe^{2+}), алюминия (Al^{3+}) и низкий pH активируют PmrB, который в свою очередь активирует PmrA. Активация последней приводит к усилению экспрессии оперона *arnBCADTEF-pmrE*, генов *pmrCAB* и *pmrE*, которые ответственны за синтез и присоединение L-Ara4N и PEtN к липиду А. Вследствие этого происходит изменение общего заряда ЛПС (Рисунок 1) [46-48].

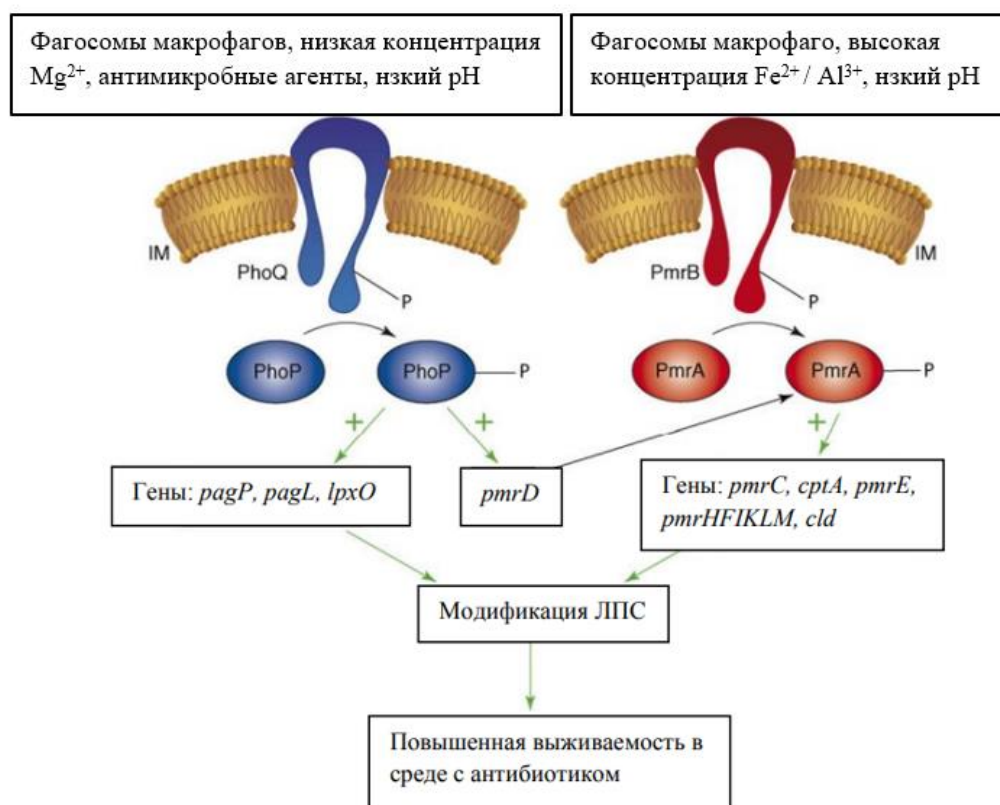


Рисунок 1 - Модификация ЛПС посредством активации двухкомпонентных сигнальных систем PhoP/PhoQ и PmrA/PmrB [45]

Плазмидопосредованная устойчивость

Новый плазмидопосредованный механизм устойчивости бактерий к полимиксинам был описан в Китае в 2015г. Данный механизм опосредован экспрессией генов *mcr*-типа (Mobile Colistine Resistance). Ген приобретенной устойчивости был локализован на мобильном генетическом элементе у изолятов микроорганизмов *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенный из помета кур [16].

Гены *mcr*-типа кодируют фосфоэтаноламинтрансферазу, PEtN в позицию 1(4')-фосфатной группы глюкозамина, которая модифицирует фосфатную группу липида A. Образующийся в результате 4' – фосфоэтаноламин – липид A препятствует связыванию полимиксинов. Фосфоэтаноламинтрансферазы MCR представляют собой трансмембранные белки, состоящие из трансмембранного домена, состоящего из пяти α -цепей на N-конце и каталитического периплазматического домена на C-конце [49].

Плазмида, в составе которой переносится ген *mcr*-типа, относится к группе несовместимости IncX [50]. Особенность данной группы несовместимости является наличие токсин-антитоксин системы, обеспечивающая высокую экспрессию генов в составе плазмид [51].

В отличие от классических механизмов, которые обеспечивают только вертикальную передачу устойчивости внутри клональной группы или штамма, гены *mcr*-типа могут распространяться также с помощью горизонтальной передачи в составе плазмид между разными штаммами и видами бактерий.

Происхождение и механизмы распространения

Из-за относительно небольшой роли полимиксинов в клинической практике последние десятилетия, распространение генов *mcr*-типа долгое время оставалось скрытым от научного сообщества. Однако после первого описания гена *mcr-1* [16] последовало множество публикаций, посвященных обнаружению генов *mcr*-типа в ранее собранных коллекциях грамотрицательных бактерий. При ретроспективном анализе одной из коллекций был обнаружен *mcr*-положительный изолят, полученный из животноводческого комплекса более трёх десятилетий назад, что примерно совпадает с началом применения полимиксинов в животноводстве (Рисунок 2) [52].

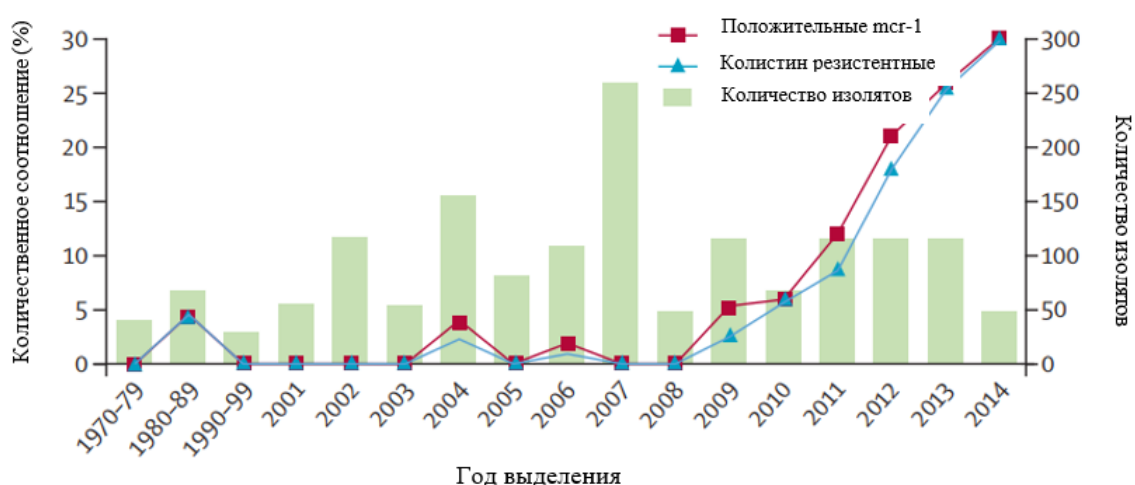


Рисунок 2 - График появления устойчивости к колистину и *mcr-1* у *Escherichia coli* в период 1970 по 2014 гг. [52]

Согласно основной гипотезе, резервуаром штаммов с генами *mcr*-типа, являются животноводческие комплексы, где наиболее активно применяются полимиксины и, как следствие, действует мощный селективный отбор в условиях контакта с почвенным биоценозом [53]. Появление и распространение генов *mcr*-типа связано с несколькими независимыми событиями переноса хромосомно-локализованных генов фосфоэтаноламинтрансферазы, например, от представителей рода *Moraxella* spp. (*mcr*-1), *Buttiauxella* spp. (*mcr*-10) на мобильные генетические элементы, в составе которых они включились в процесс горизонтального переноса. Хромосомно-локализованные предшественники генов *mcr* выполняют аналогичную функцию модификации липида А при изменении катионного состава окружающей среды и определяют природную резистентность к полимиксинам.

В основе кластеризации условного филогенетического древа генов *mcr*-типа, лежат отдельные независимые генетические события переноса хромосомно-локализованных предшественников генов *mcr*-типа от различных первичных хозяев на мобильные генетические элементы. Вероятные предшественники найдены для семейства (группы) *mcr*-1 – хромосомные гены у представителей рода *Moraxella* [54], *mcr*-2 имеет близкий вариант в геноме бактерии *Moraxella pluranimalium* [55], *mcr*-3 связан с *Aeromonas* spp. [56], *mcr*-4 - *Shewanella* spp. [57]. Происхождение вариантов *mcr*-5 – 8 пока остается неизвестным. Варианты *mcr*-9 и *mcr*-10 берут свое начало от хромосомных генов бактерий рода *Buttiauxella* [58, 59]. Вероятно, список вариантов *mcr*-подобных генов будет расти за счет новых мобилизованных вариантов и их хромосомно-локализованных предшественников. Кластерный анализ описанных на сегодняшний день вариантов генов *mcr*-типа представлен на рисунке 3 [59].

Наиболее крупным резервуаром *mcr*-положительных штаммов, преимущественно у бактерии вида *E. coli*, являются свиноводческие хозяйства и птицефабрики. Предполагаемым географическим центром, откуда происходило

распространение генов *mcr-1*, является Китай и соседние регионы [60]. Частота образцов, в которых обнаруживается ген *mcr-1* в животноводческих и птицеводческих комплексах Китая варьирует от 5 % до 61% [16, 61]. Оценка существенно отличается в зависимости от метода скрининга, так число *mcr*-положительных биологических образцов, выявляемых в ПЦР, существенно выше, чем число положительных изолятов, выделенных культуральным методом. Гены *mcr*-типа описаны в подавляющем числе стран и имеют глобальное распространение. Так, в Бельгии по данным 2016 года - 13,2% образцов из свиноводческих хозяйств *mcr*-положительны [62], Южная Африка – 2,4 % изолятов [63], США - всего 0,35% изолятов из свиноводческих хозяйств, что существенно ниже чем во многих европейских странах [64], что, вероятно, объясняется тем, что колистин в США и Канаде не одобрен для ветеринарного применения [65].

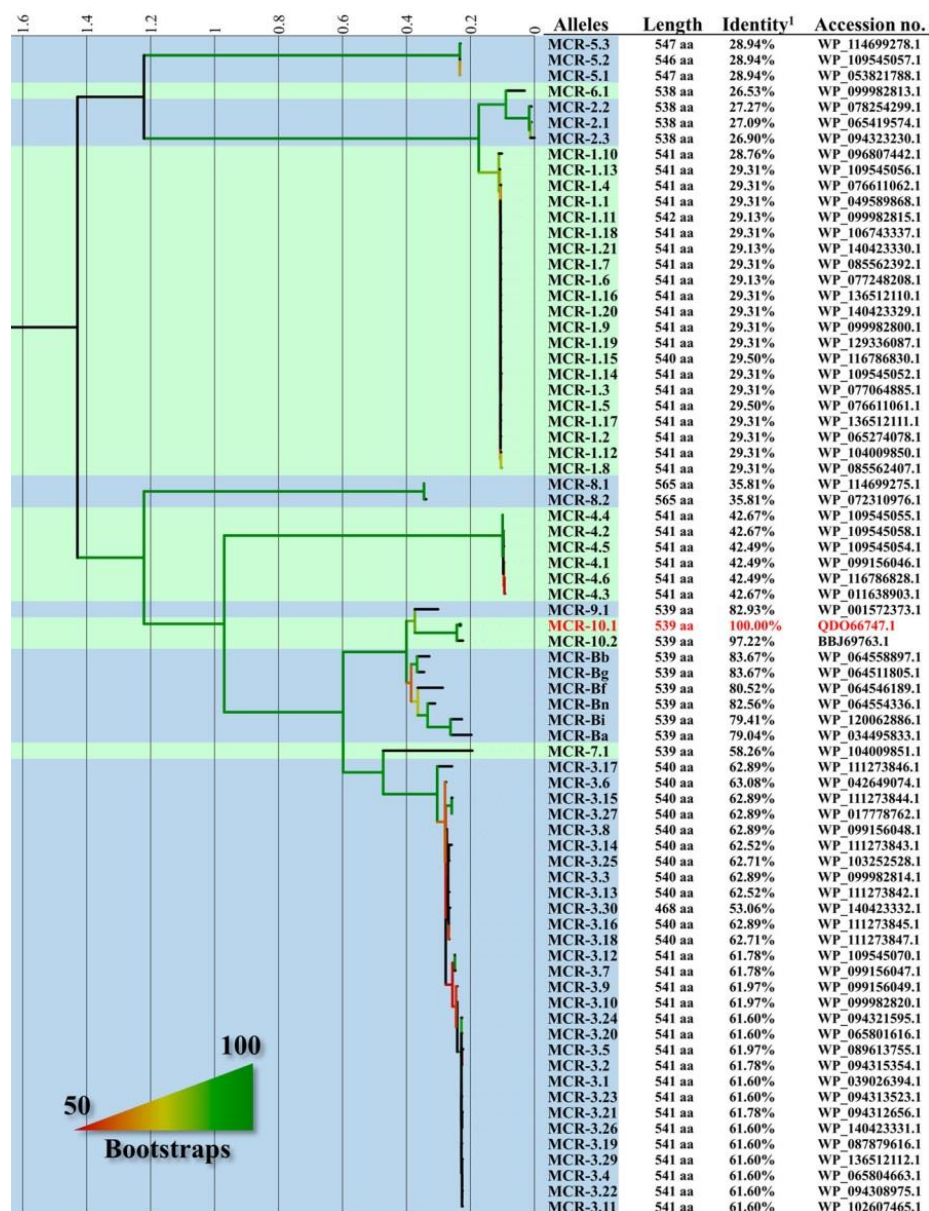


Рисунок 3 - Результат кластерного анализа аминокислотных последовательностей описанных вариантов генов *mcr*-типа, включая предшественников варианта *mcr*-10 (MCR-Bb –Bg –Bf –Bn –Bi –Ba –хромосомные варианты рода *Buttiauxella*). Зеленой и голубой горизонтальной заливкой выделены группы генов *mcr*-типа [59].

MCR-1-положительные изоляты описаны более чем в сорока странах и регионах на шести континентах. Среди животноводческих изолятов самая высокая частота *mcr*-положительных энтеробактерий выявлена в Японии, Китае, Индии, Таиланде и варьирует от 0,05% до 4,73% [60, 66-69]. Наиболее значимым можно

считать распространение генов *mcr-1* среди микроорганизмов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *Salmonella* spp.

Описано носительство штаммов с генами *mcr*-группы у домашних и диких животных. Домашние животные, обитающие вместе с людьми («животные-компаньоны»), вероятно, связаны с теми же источниками *mcr*-положительных бактерий, что и их хозяева. Наличие генов *mcr*-типа у представителей микробиома диких животных представляет достаточно большой интерес, так как преимущественно описывается у птиц, которые могут играть существенную роль в глобальном распространении генов резистентности, в первую очередь, во время сезонных миграций. Например, гены *mcr*-типа были обнаружены у чаек (*Larus argentatus*) в 2016 году в Южной Африке и Европе [70, 71].

Горизонтальный перенос генов *mcr-1*. Описано, как минимум, 15 групп плазмид, несущих ген *mcr-1*, это IncFII, IncHI1, IncHI2, IncI2, IncP1, IncX4, IncY, IncF, IncK, IncFIB, IncI1-1Y, IncN, IncFIIs, IncO111 [72]. Подавляющее число плазмид обладают конъюгативной активностью. Доминирующими и наиболее распространенными группами плазмид являются IncX4, IncI2 и IncHI2. Плазмиды указанных групп несовместимости демонстрируют высокий уровень консервативности, а также отсутствие выраженных доминирующих генетических линий бактерий, с которыми бы эти типы плазмид ассоциировались [73, 74].

Особенности распространения генов *mcr-2-10*. Ген *mcr-2* гомологичен с *mcr-1* на 76,7% по нуклеотидной последовательности и на 83,1 % по аминокислотной последовательности [75]. Впервые описан в 2016 году в Бельгии, при чем ген *mcr-2* по распространению превосходил в Бельгии *mcr-1*. Также гены *mcr-2* группы обнаружены в Англии, Ираке, Китае, Канаде и Египте [76-79]. Гены *mcr-2* менее распространены по сравнению с *mcr-1*.

Ген *mcr-3* описан, как минимум, в 22 странах. Аналогично всей группе генов *mcr*-типа преимущественно распространен в животноводческих хозяйствах [76]. Имеет всего 34,2% гомологии аминокислотной последовательности с *mcr-1*.

Ген *mcr-4* выявлен в Италии, Испании, Бельгии, Китае, Бразилии, Сингапуре. Первое описание связано с изолятом *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, выделенным в 2013 году в свиноводческом хозяйстве в Италии [57]. Также в Италии впервые был обнаружен ген *mcr-4* у клинического изолята, при чем также *S. enterica* serovar *Typhimurium* [80]. После описания генов *mcr-4* группы в Италии, также были обнаружены в Китае у *Acinetobacter baumannii* из свиноводческого комплекса [81]. Гомологичен по аминокислотной последовательности на 32,7% с *mcr-1*.

Ген *mcr-5* обнаружен в 15 странах, а первое описание гена этой группы связано с ретроспективным скринингом генов *mcr*-типа в коллекции *Salmonella paratyphi* в Германии, собранной в 2011-2016 годах [82]. Ген *mcr-5* имеет аминокислотную гомологию с геном *mcr-1* – 35,5%. Несмотря на первое описание в Европе, также был обнаружен в азиатском регионе у представителей разных видов, в том числе у *Aeromonas hydrophila* в Китае [83]. Также *mcr-5* первый из генов *mcr*-типа, обнаруженный у *Pseudomonas aeruginosa* (в США) [84].

Ген *mcr-6* является наименее распространенным в мире и единственным не выявленным в Китае. Опубликовано всего одно описание данного гена [77]. MCR-6.1 на 82,8% гомологичен *mcr-1* по аминокислотной последовательности. Локализован на хромосоме *Moraxella pluranimalium*. В оригинальной публикации ему был присвоен номер *mcr-2.2*, но в дальнейшем было сделано изменение в номенклатуре [85].

Ген *mcr-7* впервые описан в 2018 году у изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в период 2010-2015 в птицефабриках нескольких провинций Китая [86]. По аминокислотной последовательности соответствует *mcr-1* на 34,1%. Кроме Китая ген *mcr-7* обнаружен пока только в сточных водах Германии [87].

Ген *mcr-8* также описан впервые в Китае. Изолят *K. pneumoniae* выделен от свиньи в период между 2015 и 2017 годами. Анализ международных баз данных выявил изолят *K. pneumoniae*, полученный из мокроты пациента одного из

китайских госпиталей, имеющий на 99% идентичную аминокислотную последовательность с *mcr-8* [88]. Для группы генов *mcr-8* в большей степени, чем для других описанных вариантов характерна циркуляция среди изолятов не относящихся к роду *Escherichia*. Хотя число описаний генов *mcr-8* группы насчитывает около двух десятков, они охватывают различные регионы и преимущественно связаны с множественно-резистентными изолятами, что принципиально отличает эту группу [89, 90].

Ген *mcr-9* является самым широко распространенным после варианта *mcr-1*. Впервые описан в 2019 году в США у клинического изолята *S. enterica* [91]. После первого описания, изоляты с данным геном были выявлены в Китае, Швеции и Франции [92]. Анализ базы данных GenBank выявил гены *mcr-9* у изолятов семейства *Enterobacteriaceae* по всему миру [91]. Среди выявленных изолятов по видовой принадлежности на первом месте бактерии рода *Enterobacter* spp. (31% от числа выявленных *mcr-9* положительных изолятов), на втором месте *Klebsiella* spp. (30%), *Salmonella* spp. (n = 14, 10.1%), а *Escherichia* spp. находятся только на четвертом месте (n = 13, 9.4%). По происхождению изоляты с геном *mcr-9* также отличаются от варианта *mcr-1*, 55,8% (n=77) изолятов выделены от людей, на втором месте изоляты от животных – 29%, потом единичные изоляты из окружающей среды и продуктов питания [92]. По аминокислотной последовательности *mcr-9* гомологичен другим вариантам *mcr* на 33-65%. Происхождение гена *mcr-9* связывают с *Buttiauxella* spp., представители которого имеют хромосомно-локализованные гены на 84% гомологичные *mcr-9* [58].

Гены группы *mcr-10* являются последними на этот момент описанными вариантами. Впервые описан у клинического изолята микроорганизма *Enterobacter roggenkampii*. Аналогично другим вариантам генов *mcr* (кроме *mcr-6*) имеет плазмидную локализацию. По аминокислотной последовательности на 82,93% гомологичен *mcr-9*, поэтому происхождение этого варианта гена может быть также связано с представителями рода *Buttiauxella* spp. После первого описания, гены *mcr-10* были обнаружены в базе данных GenBank. Самый ранний из обнаруженных

изолятов выделен в 1998 году - *Citrobacter freundii* в Китае. В списке стран, где ретроспективно обнаружены изоляты с *mcr-10* есть США, Канада, Германия, Вьетнам, Япония, Таиланд, таким образом, *mcr-10* относится к глобально распространенным вариантам [59].

Распространение генов *mcr*-типа в России. Первое упоминание детекции гена *mcr-1* в России было сделано в 2018 году Марком Вёзе. Изолят был выделен в ходе международного клинического исследования в период с 2014 по 2016 гг и представлен без подробных характеристик [93]. В 2018г. в докладе на европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ECCMID 2018, P2468) было упоминание одного изолята, несущего ген *mcr-1* клинического происхождения и выделенного в 2015 году. Еще один изолят был детектирован в 2019 году как относящийся к виду *E. coli* и выделен от новорожденного при вентилятор-ассоциированной пневмонии [73]. В том же году ген *mcr-1* был обнаружен у бактерии вида *E. coli*, выделенной от черного коршуна в Алтайском крае [94]. На момент написания работы, а именно в период с 2018 до 2020 года, дополнительных публикаций на тему обнаружения *mcr-1* положительных изолятов в России не было. После 2020 года в некоторых научных работах было описание данного гена именно клинического происхождения [95, 96]. Об обнаружении *mcr-1* положительных изолятов, выделенных от сельскохозяйственных животных в России, сведения отсутствуют, помимо опубликованных результатов на основании настоящей работы [97].

1.3. Устойчивость к бета-лактамам антибиотикам, классификация β -лактамаз

Бета-лактамазы представляют собой генетически и функционально различные ферменты, способные разрушать бета-лактамы антибиотики (БЛА). Общим фрагментом в химической структуре является бета-лактамное кольцо, с чем связана их микробиологическая активность.

Механизм действия β -лактамовых антибиотиков заключается в подавлении активности бактериальных ферментов транспептидаз, участвующих в стадии синтеза пептидогликана – основного компонента клеточной стенки бактерий. Благодаря способности связываться с пенициллином, транспептидазы получили название «пенициллинсвязывающих белков» (ПСБ) [98]. Связывание БЛА и ПСБ ведет к инаktivации ПСБ, прекращению роста и последующей гибели микробной клетки.

Бета-лактамазы вероятно появились одновременно со способностью к продукции БЛА, как нейтрализующий фактор действия синтезируемых антимикробных веществ. В результате межвидового переноса, β -лактамазы получили широкое распространение среди микроорганизмов.

В 40-х годах была обнаружена резистентность к пенициллинам, связанная с разрушением данных антибиотиков ферментами бета-лактамазами. В 80-х годах через год после разработки цефалоспоринов III поколения (цефалоспорины расширенного спектра действия), таких как цефотаксим, цефтазидим, цефтриаксон и др., была обнаружена устойчивость у штаммов *K. pneumoniae* к цефотаксиму. Данные клебсиеллы являлись продуцентами новых ферментов SHV-2, относящихся к БЛРС, которые в течении короткого промежутка времени стали широко распространены [99, 100]. На сегодняшний день, продукция БЛРС является одним из наиболее распространенных механизмов резистентности у энтеробактерий.

С начала 2000-х годов проводится мониторинг по изучению распространения БЛРС-положительных бактерий среди нозокомиальных (внутрибольничных) и внебольничных бактерий в различных странах [101, 102]. К 2014 году было отмечено существенное увеличение до угрожающих масштабов распространения продуцентов БЛРС в большинстве стран Европы [103]. С этого же периода и дальше, в результате многоцентровых исследований было показано, что количество БЛРС продуцирующих энтеробактерий среди нозокомиальных изолятов достигло до 78% [104, 105].

В России первые упоминания об обнаружении продуцента БЛРС у изолята *Salmonella typhimurium* относятся к 1990 году [106]. Существует мнение, что передача многих генетических детерминант резистентности людям исходит именно от животных из-за чрезмерного потребления АМП или их применения в качестве стимуляторов роста, через мясную продукцию и т.д. Мясо птицы является самым загрязненным бактериями продуктом, устойчивых к БЛРС, чем мясо от других животных, например, говядина, где значительно низкое их содержание. При анализе энтеробактерий, выделенных от птиц, крупного рогатого скота (КРС), других животных и человека, было показано, что эшерхии, выделенные от людей и птиц имеют наибольшую схожесть между собой, чем от КРС [107, 108].

В следствие глобального распространения БЛРС среди энтеробактерий, в Европе ввели запрет на использование кормовых добавок с антибиотиками (<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160809-0>). Однако в странах, таких как Швеция и Бельгия, где запрещено использование цефалоспоринов, наблюдается высокое распространение бактерий, несущих БЛРС [109, 110].

В Ленинградской области циркулируют энтеробактерии, выделенные от животных, несущие БЛРС групп СТХ-М-1 и СТХ-М-9, SHV, а также встречается циркуляция одновременно несколько детерминант резистентности БЛРС: $bla_{TEM} + bla_{CTX-M-1}$ и $bla_{TEM} + bla_{CTX-M-9}$ [111, 112].

Несмотря на широкое распространение БЛРС, все же генетический профиль микроорганизмов отличается у животных и людей. Так, например, распространение группы СТХ-М-15 выражено больше у людей, а СТХ-М-1 у животных. Было показано, что намного велик риск обмена схожих детерминант резистентности между клинически здоровыми людьми и находящимся в стационаре, чем через потребление мясной продукции [113]. Чтобы точно ответить на эти вопросы, требуется более глобальный анализ данных и проведения исследований образцов от людей, животных, контакта между собой и окружающей среды.

В настоящее время известно более 2000 различных β -лактамаз, которые классифицируются на две системы: молекулярная и функциональная (рисунок 4).

Молекулярную систему классификации предложила R. Ambler в 1980 году. Данная классификация делит все β -лактамазы в зависимости от химического строения молекулы на четыре молекулярных класса (A, B, C, D). Согласно данной классификации, ферменты классов A, C и D относятся к сериновым- β -лактамам, так как в активном центре находится аминокислота – серин, а фермент класса D – к металло- β -лактамам, в которых один или два двухвалентных атома цинка (Zn^{2+}) связаны с активным центром [114].



Рисунок 4 - Классификация β -лактамаз [115, 116]

Классификация на основании функциональных особенностей была впервые выдвинута К. Bush в 1989 году [117]. С годами предложенная классификация была модифицирована и дополнена [115, 116]. На основании профилей субстратной специфичности и чувствительности к ингибиторам все β -лактамазы делятся на 3 функциональные группы.

В первую группу входят ферменты цефалоспориназы (класс С) с представителем β -лактамазы AmpC, которые расщепляют все цефалоспорины, кроме цефалоспоринов IV поколения. Гены, кодирующие данные ферменты располагаются в основном на хромосоме бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [118].

Во вторую группу входят сериновые бета-лактамазы группы А и D. Эта группа самая обширная и разнообразная по своему составу, они распространены по всему миру за счет плазмид-кодируемых ферментов. Группы 2be и 2de способны расщеплять цефалоспорины II, III и IV поколений и монобактамы, помимо пенициллинов и цефалоспоринов I поколения и были названы БЛРС, с основными представителями типов CTX-M, TEM и SHV [119].

К третьей функциональной группе относятся цинк содержащие ферменты – металло-бета-лактамазы, молекулярного класса В. Помимо пенициллинов и цефалоспоринов данная группа ферментов разрушает карбапенемы. К функциональной группе В относятся подгруппы: 3a и 3b, расщепляющие все β -лактамазы, кроме азтреонама и карбапенемов, соответственно. Глобальное распространение основных метало-бета-лактамаз – VIM-, IMP- и NDM-типов и всех карбапенемаз (классы А, В, С, D) представляют наибольшую угрозу для здравоохранения [99, 120].

К карбапенемазам молекулярного класса А относятся KPC (Klebsiella pneumonia carbarpenemasa), которые имеют плазмидную локализацию, SME и GES (функциональная группа 2f) [121]. Класс В (функциональная группа 3) – IMP, VIM, NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), SIM, GIM, SPM. Класс С (функциональная группа 1) – CMY-10 и класс D, его же называют оксациллиназами или OXA-бета-лактамазами (группа 2 df) [115].

Полирезистентность таких микроорганизмов, как *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. и др., обусловленная продуцированием БЛРС, приводит к резистентности к пенициллинам и цефалоспорином, а также сопутствующей

полирезистентности к другим антибиотикам [122]. Для борьбы с полирезистентными бактериями, в клиническую практику с середины 1980-х годов были внедрены карбапенемы, отличающиеся от остальных β -лактамов широким спектром антимикробной активностью и используемые как препарат «резерва». Впервые в Санкт-Петербурге и других регионах России в 2012 году появились сообщения о выделении продуцентов карбапенемаз NDM-, OXA- и KPC-типов [123-126]. Глобальное распространение энтеробактерий, продуцирующих карбапенемазы, являются серьезной угрозой здравоохранению. С 2012 года Европейский Центр профилактики и контроля болезней осуществляет программу по контролю распространения карбапенемаз в странах Европейского союза. В 2017 году ВОЗ опубликовала список приоритетных высокорезистентных патогенов, для борьбы с которыми необходима разработка новых методов лечения. В 2024 году в список вошли карбапенем-резистентные энтеробактерии (CRE – Carbapenem-resistant *Enterobacterales*), занимающие значимую роль наряду с *K. pneumoniae* и *E. coli*.

Анализ научной литературы показал, что внутрибольничная среда играет важную роль в появлении и распространении карбапенем-резистентных генов. Несмотря на то, что существуют научные работы, в которых описана детекция таких резистентных изолятов у животных, их количество существенно меньше по сравнению с обнаружением у нозокомиальных штаммов. Следует также учитывать, что исследований, посвященных изучению карбапенем-резистентных изолятов в ветеринарии, значительно меньше, чем работ, посвященных изолятам клинического происхождения [127].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследованы животноводческие комплексы в Ленинградской области (5,7%) включающие: скотоводческие комплексы (КРС) (n=3); птицеводческие комплексы (n=2); свиноводческий комплекс (n=1) и рыбоводческие комплексы (n=2). Материалом для исследования служил биологический материал, который представлял собой образцы в количестве 10-15 проб из проточных каналов для удаления навоза из скотоводческих комплексов, из клеток в птицеводческих комплексах и стойлах свиноводческих комплексов. Для получения образцов от рыб была исследована аквариумная вода, в которой они содержались.

Объектом исследования из животноводческих комплексов служили 191 культура микроорганизмов, принадлежащих к разным семействам (n=6): *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* и *Pseudomonadaceae*.

Исследованы образцы биологического материала, собранные во внутрибольничной и внебольничной среде, представленные фекальными образцами от пациентов.

Объектом исследования являлись *E. coli* в количестве 475 изолятов из внутрибольничной среды, 453 изолятов из внебольничной среды.

В связи с природной устойчивостью, изоляты семейства *Morganellaceae* для определения чувствительности к колистину и детекции генов *mcr*-типа в исследование не входили [128-130].

2.1. Фенотипические методы исследования

2.1.1. Выделение, идентификация и хранение изолятов

Для подавления грамположительной микрофлоры и выделения грамотрицательной с сохранением разумного количества чувствительных и специфичных изолятов, каждый образец стерильным тампоном помещали в две пробирки с содержанием 10 мл бульона Мюллера-Хинтон («Bio-Rad», Франция) с добавлением: ванкомицина (4 мг/л) (Molekula, Англия) + полимиксина В (3 мг/л) и ванкомицина (4 мг/л) (Molekula, Англия) + цефтриаксона (3 мг/л). Пробирки инкубировались при температуре 37°C в течение 18-24 ч.

Первичный бактериологический посев осуществляли на плотной питательной среде «Агар Эндо-ГРМ» (Оболенск, Россия) с последующей инкубацией в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 ч.

Идентификацию большинства выросших колоний проводили с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF Microflex LT («Bruker Daltonik», Германия) согласно инструкции производителя. Заключение о таксономической принадлежности осуществляли на основании значения индекса совпадения (параметр score — S). Значение S от 1,7 до 1,99 — идентификация до рода; S > 2 — идентификация до вида.

Ввиду уникальности одного изолята из коллекции и отсутствия референсных спектров в масс-спектрометре MALDI-TOF Microflex LT, для идентификации были применены следующие методы: микроскопия (окрашивание по Граму, оптическая и сканирующая электронная микроскопия), оценка ферментативной активности (тесты API 20 NE и API ZYM (BioMerieux SA, Франция), оценка вирулентных свойств *in vivo* на септической модели на мышах, а также генотипирование (определение гена 16S рПНК – п.2.3.1.).

Культуры микроорганизмов хранили при -75°C в пробирках объемом 2 мл, содержащих 1 мл среды для криоконсервирования: триптиказо-соевый бульон («Merk KGaA», Германия) с добавлением глицерина (20%).

2.1.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Стратегия выбора антимикробных препаратов для тестирования чувствительности изолятов из коллекции была основана на рекомендациях международного комитета EUCAST, согласно которым данные классы антибактериальных препаратов предназначены для широкого применения как в ветеринарии, так и в медицине.

Определение чувствительности диско-диффузионным методом

Определение чувствительности к ципрофлоксацину (CIP), цефтазидиму (CZD), цефтазидим/авибактаму (CZA), гентамицину (GEN), фосфомицину (FOS), меропенему (MEM), тигециклину (TGC), ампициллину (AMP), проводили в соответствии с методическими указаниями (МУК 4.2.1890-04) и рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST v.13) с использованием коммерческих дисков («Bio-Rad», Франция). Нагрузка каждого антибиотика на диск составила: CIP – 5 мкг, CZD – 10 мкг, CZA – 14 мкг, TGC – 15 мкг, AMP – 10 мкг.

Интерпретация результатов диско-диффузионного метода проводилась согласно рекомендациям EUCAST, в ходе чего выделенные микроорганизмы были разделены на 3 группы:

- чувствительные (Ч) «S» (susceptible) –штамм подавляется при концентрациях АМП, при рекомендуемых режимах дозирования;
- резистентные (Р) «R» (resistant) – штамм не подавляется при концентрациях АМП, при рекомендуемых режимах дозирования;

- чувствительные при повышенной экспозиции антибиотика (П) «I» (increased exposure). (мм).

В качестве референс-штамма для контроля определения чувствительности использовали штамм Американской коллекции типовых культур *E. coli* ATCC 25922.

Определение чувствительности методом серийных микроразведений

При определении антибиотикочувствительности методом серийных микроразведений согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям EUCAST, использовали испытуемую культуру, выращенную на агаре Мюллера-Хинтон («Bio-Rad», Франция).

Для изолятов *E. coli* чувствительность определяли к следующим антимикробным препаратам: амикацин (AMI), гентамицин (GEN), цефотаксим (CTM), цефтазидим (CZD), ципрофлоксацин (CIP), тигециклин (TGC), колистин (COL), меропенем (MEM), дорипенем (DOR), триметоприм/сульфаметоксазол (SxT), азтреонам (AZT).

Для изолята *T. alkaliphila* определение чувствительности проводилось к следующим АПБ в двух планшетах. В первый планшет вошли следующие АБП: ампициллин (AMP), цефепим (CER), азтреонам (AZT), имипенем (IMI), дорипенем (DOR), меропенем (MEM), биапенем (BIAP), гентамицин (GEN), амикацин (AMI), тигециклин (TGC), колистин (COL) и отрицательный контроль; во второй планшет: ципрофлоксацин (CIP), триметоприм/сульфаметоксазол (SxT), хлорамфеникол (CHL), цефепим/сульбактам (CER/SUL), цефоперазон/сульбактам (CEFO/SUL), азтреонам/авибактам (AZT/AVI), пиперациллин/тазобактам (PIT).

Конечные результаты диапазона концентраций антибактериальных препаратов для изолятов *E. coli* и *T. alkaliphila* представлены в таблице 1 и 2 для определения диапазона значений МПК (1 планшет и 2 планшета).

Субстанции антибиотиков хранились в соответствии с инструкциями, базовые растворы – при -75°C не более 6 месяцев, а рабочие растворы – *ex tempore*.

В качестве референс-штамма для контроля определения чувствительности изолятов *E. coli* к АБП использовали штамм Американской коллекции типовых культур *E. coli* ATCC 25922, а для *T. alkaliphila* использовали штамм Американской коллекции типовых культур *P. aeruginosa* ATCC 27853, согласно рекомендациям EUCAST.

Результат учитывали при помощи камеры для визуального считывания Sensititre Manual View. За МПК к антибиотикам принимали лунку, где полностью отсутствует рост культуры и помутнение раствора.

Интерпретацию результатов осуществляли согласно рекомендациям EUCAST v.13 и МУК 4.2.1890-04 [131].

Таблица 1 - Схема планшета с указанием диапазона концентрации каждого антибиотика для изолятов *E. coli*

	AMI	GEN	CTM	CZD	CIP	TGC	COL	MEM	DOR	SxT	AZT	K-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	64	16	32	32	8	16	32	16	16	32	32	-
B	32	8	16	16	4	8	16	8	8	16	16	-
C	16	4	8	8	2	4	8	4	4	8	8	-
D	8	2	4	4	1	2	4	2	2	4	4	-
E	4	1	2	2	0.5	1	2	1	1	2	2	-
F	2	0.5	1	1	0.25	0.5	1	0.5	0.5	1	1	-
G	1	0.25	0.5	0.5	0.125	0.25	0.5	0.25	0.25	0.5	0.5	-
H	0.5	0.125	0.25	0.25	0.06	0.125	0.25	0.125	0.125	0.25	0.25	-

Примечание - AMI-амикацин, GEN-гентамицин, CTM-цефотаксим, CZD-цефтазидим, CIP-ципрофлоксацин, TGC-тигексиклин, COL-колистин, MEM-меропенем, DOR-дорипенем, SxT-триметоприм-сульфометаксозол, AZT-азтреонам.

Таблица 2 - Схема планшета с указанием диапазона концентрации каждого антибиотика для микроорганизма *T. alkaliphila*.

1 планшет

	AMP	CEP	AZT	IMI	DOR	MEM	BIAP	GEN	AMI	TGC	COL	K-
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	32	16	16	16	16	16	32	16	32	32	32	-
B	16	8	8	8	8	8	16	8	16	16	16	-
C	8	4	4	4	4	4	8	4	8	8	8	-
D	4	2	2	2	2	2	4	2	4	4	4	-
E	2	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	-
F	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	1	1	1	-
G	0.5	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	-
H	0.25	0.125	0.125	0.125	0.125	0.125	0.25	0.125	0.25	0.25	0.25	-

2 планшет

	CIP	SxT	CHL	CEP/ SUL	CEFO/ SUL	AZT/ AVI	PIT	K-				
	1	2	3	4	5	6	7	8				
A	16	32	32	8/4	32/4	8/4	32/4	-				

B	8	16	16	4/4	16/4	4/4	16/4	-				
C	4	8	8	2/4	8/4	2/4	8/4	-				
D	2	4	4	1/4	4/4	1/4	4/4	-				
E	1	2	2	0.5/4	2/4	0.5/4	2/4	-				
F	0.5	1	1	0.25/4	1/4	0.25/4	1/4	-				
G	0.25	0.5	0.5	0.125/4	0.5/4	0.125/4	0.5/4	-				
H	0.125	0.25	0.25	0.06/8	0.25/8	0.06/8	0.25/8	-				

2.1.3. Определение МПК колистина

Оценку антибиотикочувствительности бактерий вида *E. coli* (n=105) к колистину для определения минимальных подавляющих концентраций использовали три метода: метод серийных разведений; определение МПК на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция) и метод дисковой элюции.

Определения МПК методом серийных разведений

Данный метод проводили по схеме, описанной в п. 2.1.2 для колистина. Диапазон МПК с минимальным и максимальным значением составлял 0,25-32 мкг/мл.

Определение МПК на автоматическом бактериологическом анализаторе Vitek 2 Compact

Данный автоматический бактериологический анализатор Vitek 2 Compact (BioMerieux, Франция) предназначен для идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антимикробным препаратам в короткие сроки (от 5 до 8 часов). Все этапы подготовки и загрузки образцов в прибор осуществляли согласно инструкции производителя. После получения суточной культуры и

подготовки стандартизированного инокулюма, суспензию с инокулюмом разместили в Vitek 2 Cassette at the Smart Carrier Station и загрузили в прибор. В приборе автономно происходила инкубация и считывание, после окончания получали результат по идентификации и чувствительности к АМП.

Метод дисковой элюции

Метод дисковой элюции представляет собой метод разведений в бульоне, с использованием коммерческих дисков с антибиотиками. Для данного метода использовали диски с колистином с нагрузкой антибиотика на диск 10 мкг трех производителей: НИЦФ (Россия), «Bio-Rad» (Франция), Oxoid (Англия).

Методика проведения исследования заключается в следующем. Используются стерильные пробирки для инокуляции диска с антибиотиком в бульоне Мюллера-Хинтон. Для подготовки необходимых разведений в работе использовали несколько коммерческих дисков. Так, для получения раствора с концентрацией 1 мкг/мл в 10 мл бульона Мюллера-Хинтона вносили один диск с нагрузкой антибиотика 10 мкг, для получения раствора с концентрацией 2 мкг/мл использовали 2 коммерческих диска с нагрузкой 10 мкг и так далее.

После внесения дисков в пробирку с бульоном перемешивали при минимальных оборотах на приборе Vortex и инкубировали при комнатной температуре 30 минут для диффундирования антибиотика в среду. Далее вносили 50 мкл бактериального инокулюма по стандарту мутности 0.5 McF, приготовленный из суточной культуры и перемешивали. Готовые пробирки инкубировали при 37° С в течение 18-20 ч. Результат учитывали визуально. За МПК принимали пробирку с разведением, где произошло подавление видимого бактериального роста.

В данном исследовании использовали концентрации колистина 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 4 мкг/мл. Одну пробирку с содержанием бульона Мюллера-Хинтона использовали для контроля бактериального роста.

В качестве контроля определения чувствительности использовали штаммы ATCC *E. coli* 25922 и ATCC *E. coli* 25900, а в качестве контроля определения устойчивости – штамм № 3819 *Proteus vulgaris* из рабочей коллекции культур ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России.

2.1.4. Подбор праймеров и ПЦР

Нуклеотидные последовательности для определения принадлежности каждого изолята к семейству CTX-M-групп с подтипами CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, также TEM, SHV и GES были получены из базы данных BLDB (Beta-Lactamase Data Base) (<http://www.bldb.eu/BLDB.php?prot=A>). Выравнивание кодирующих последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения Genious Prime v 2020.1.1 и Unipro UGENE.

Выделение тотальной бактериальной ДНК осуществляли с использованием набора «ДНК-сорб-Б», («AmpliSens», Россия), согласно инструкции производителя из суточной бактериальной культуры.

Подбор праймеров, оценку их специфичности осуществляли с помощью программных обеспечений Oligo v.7.0., Geneious Prime 2022.0.2 и NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры для детекции генов, кодирующих β – лактамазы, синтезировали в ЗАО «Евроген», Россия. Праймеры для детекции генов *mcr-1-5*, представленные в работе Yi-Yun Liu, также синтезировали в ЗАО «Евроген», Россия [16].

Для постановки ПЦР использовали готовые мастермиксы Thermo Fisher Scientific «DreamTaq HS MM» (готовая к использованию реакционная смесь 2X, которая включает ДНК-полимеразу DreamTaq TM Hot Start, буфер DreamTaq Green, магний и dNTP) в конечном объеме 12,5 мкл на реакцию. Прямой (F) и обратный (R) праймеры добавляли в конечном объеме 2,5 мкл, а объем вносимой ДНК составлял 10 мкл. Общий объем раствора для амплификации составил 25 мкл.

Для постановки ПЦР были выбраны оптимальные температурные режимы для амплификации генов СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8, СТХ-М-9, TEM, SHV и GES (таблица 3 и 4). Для генов *mcr-1-5* амплификацию проводили согласно температурным режимам в работе Yi-Yun Liu [16].

Таблица 3 - Режимы амплификации для детекции генов TEM, GES, SHV, СТХ-М-2

Температура	Время	Цикл
95 °С	5 минут	X 1
95 °С	25 секунд	X 25
55,6 °С	25 секунд	
72 °С	25 секунд	
72 °С	5 минут	X 1
10°С	∞	X 1

Таблица 4 - Режимы амплификации для детекции генов СТХ-М-1, СТХ-М-8, СТХ-М-9

Температура	Время	Цикл
95 °С	5 минут	X 1
95 °С	25 секунд	X 35
59,5°С	25 секунд	
72 °С	25 секунд	
72 °С	5 минут	X 1
10°С	∞	X 1

Амплификацию проводили в термоциклере T100 производства «Bio-Rad», Франция. Продукт амплификации разделяли в 2% агарозном геле «TopVision Agarose», производства Thermo Fisher Scientific (США) с добавлением «GelRed»

(Biotium, США) в 1X TAE буфере (ЗАО «Евроген», Россия) при напряжении 85 В (ватт) в течение 30 минут, внося в лунки геля исследуемые образцы с красителем. Краситель готовили из кристаллов кселена и бромфенолового синего с разбавлением нескольких кристаллов каждого красителя в 50 мкл ультрачистой воды. Далее 1 мкл каждого готового красителя добавляли к смеси: SDS 10% – 0,5 мл, EDTA pH 8,0, 0.5 М – 2 мл, ультрачистая вода 2,4 мл и глицерол 100% – 5 мл.

В качестве маркера использовали DNA Ladder 100 bp (100-3000 п.н.) (Thermo Fisher Scientific, США).

Электрофореграммы визуализировали с использованием системы Gel Doc XR+ с программным обеспечением Image Lab («Bio-Rad», Франция).

2.3. Секвенирование

2.3.1. Секвенирование гена 16S рибосомальной РНК

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя.

Для амплификации полноразмерного гена 16S рРНК в работе использовали универсальные праймеры (<https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>): прямой праймер – 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), обратный праймер – 1492R (3'-CGGTTACCTTGTACGACTT-5'). В состав реакционной смеси на 1 реакцию входили: 12,5 мкл «DreamTaq» HS MM (готовая к использованию реакционная смесь 2X, которая включает ДНК-полимеразу DreamTaq™ Hot Start, буфер DreamTaq Green, магний и dNTP); 5 мкл раствора праймеров (0,4 нМ); 7,5 мкл ДНК. Для приготовления раствора праймеров использовали по 4 мкл (100 мкМ) каждого праймера, а общий объем доводили до 200 мкл ультрачистой водой.

Режим амплификации представлен в таблице 5.

Таблица 5 - Режим амплификации

Температура	Время	Цикл
95 °С	1 минута	X 1
95 °С	20 секунд	X 25
56 °С	20 секунд	
72 °С	1 минута	
72 °С	5 минут	X 1
10 ⁰ С	∞	X 1

Визуализацию ампликонов проводили после разделения в агарозном геле с бромистым этидием с помощью электрофореза, с последующей очисткой на магнитных частичках AMPure XP (Beckman Coulter Life Science, США). Чтобы получить точную последовательность ДНК, были поставлены секвенсовые реакции со следующими праймерами (<https://help.ezbiocloud.net/16s-rrna-and-16s-rrna-gene/>) (таблице 6).

Таблица 6 - Праймеры для секвенсовой реакции.

Праймеры	Последовательность (5'-3')
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
533F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
1100R	GGGTTGCGCTCGTTG
1100F	YAACGAGCGCAACCC
1492R.	CGGTTACCTTGTTACGACTT

В состав секвенсовой реакции входили: 0,8 мкл BigDie Terminator V3, 1,6 мкл Bigdye Buffer, 1,6 мкл воды (nuclease free), 1 мкл праймеров 3,2 пмоль в соответствии с протоколом амплификации, представленным в таблице 7.

Таблица 7 - Протокол амплификации секвенсовой реакции

Температура	Время	Цикл
96 °С	1 минута	X 1
96 °С	10 секунд	X 26
50 °С	20 секунд	
60 °С	4 минута	
72 °С	5 минут	X 1
4 °С	∞	X 1

Для очистки ДНК от продуктов ПЦР использовали магнитные частицы AMPure XP (Beckman Coulter, США) с последующим секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ДНК 3730 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.3.2. Полногеномное секвенирование

Для выделенных изолятов под номерами Есо-103, Есо-151 было проведено полногеномное секвенирование с получением коротких прочтений на платформе Illumina MiSeq и изолята № 177 секвенирование на платформе Illumina MiSeq и длинных прочтений на платформе Oxford Nanopore.

Для проведения последующего секвенирования проводили высев чистой культуры изолятов Есо-103, Есо-151 из рабочей коллекции, на агар Мюллера-Хинтон с дальнейшим культивированием при температуре 37°С в течение 18-24 ч. Единичные колонии переносили в пробирки типа эппендорф с ультрачистой водой.

Выделение геномной ДНК осуществляли на спин-колонках с помощью набора для выделения ДНК – QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen», Германия).

Для подготовки библиотек использовали набор Nextera XT DNA Library Preparation Kit, для баркодирования - Nextera XT Index Kit (Illumina, США) согласно инструкции производителя. Для очистки использовали магнитные частицы для очистки ДНК - AMPure XP Beads (Beckman Coulter, США). Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 с набором Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для секвенирования использовали набор MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов, Illumina, США) и проводили на платформе Illumina MiSeq.

Для одномолекулярного секвенирования выделение геномной ДНК также осуществляли на спин-колонках с мембраной – QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen», Германия). Для подготовки библиотек использовали образцы с концентрацией ДНК до 1 мкг с наборами NEBNext® (New England Biolabs, США) и Oxford Nanopore Kits (Flow Cell Priming kit; Ligation Sequencing kit; Oxford Nanopore Technologies (ONT), Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя. Концентрацию ДНК-библиотек измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 с набором Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Для уникального индексирования использовали набор Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104) (ONT, Великобритания). ДНК-библиотеки мультиплексировали до конечной концентрации пула 700 нг с последующим секвенированием на платформе MinION в проточных кюветах для нанопорового секвенирования R9.4.1 (ONT, Великобритания).

2.4. Биоинформатический анализ данных

Геномная сборка *de novo* как коротких, так и длинных прочтений была выполнена с использованием программного обеспечения Unicycler v 0.4.8 по

алгоритму SPAdes 3.13.0. Для оценки качества геномных сборок использовался инструмент QUAST (Algorithmic Biology Lab).

Аннотацию полученных геномных сборок проводили на онлайн платформе <https://www.bv-brc.org/>, а дальнейший анализ – в SnapGene Viewer.

Для определения вероятной принадлежности контигов к хромосомным или плазмидным последовательностям, для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали BLAST (The **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) сервера NCBI (**N**ational **C**entre for **B**io**t**echnology **I**nformation).

Поиск репликонов плазмид, определение групп несовместимости плазмид, поиск генов устойчивости к АМП, генов вирулентности, также определение сиквенс-типа (ST) осуществляли на базе центра геномной эпидемиологии (CGE) (Centre of Genomic Epidemiology <http://www.genomicepidemiology.org/>) с помощью программ PlasmidFinder, ResFinder, VirulenceFinder, MLST соответственно.

Анализ последовательностей, полученных после секвенирования по Сэнгеру, проводили с помощью VectorNTI-9. Последовательности анализировали с помощью BLAST и международной базы данных сервера NCBI.

Множественное выравнивание последовательности генов *T. alkaliphila* было проведено с помощью Parsnp v.1.2 и R-package Micropan v.2.1. Выравнивания было экстрагировано в программу iTOL для построения филогенетического дерева. Множественное выравнивание для генов группы CTX-M, TEM, GES, SHV было проведено в Geneious Prime Support 2022.0.2.

2.5. Определение вирулентных свойств на септической модели

Вирулентные свойства *T. alkaliphila* изучали *in vivo* на септической модели на мышах.

Для проведения биопробы были отобраны мыши линии «Balb c» в количестве 10 животных (18-22-х дневные самки). Диапазон веса животных варьировался от 0,5 г до 600 г. Подробные данные по массе тела на каждого животного представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Данные по массе тела лабораторных животных

№ животного/метка	Масса тела, г
1.1 / 1 синий	20,9
1.2 / 2 синий	19,8
1.3 / 3 синий	19,5
1.4 / 4 синий	19,1
1.5 / + синий	18,6
1.6 / 1 красный	19,1
1.7 / 2 красный	18,6
1.8 / 3 красный	18,5
1.9 / 4 красный	19,3
1.10 / + красный	18,6

Все манипуляции проводили в боксах «БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5» (микробиологической безопасности) (ЗАО "Ламинарные системы" г. Миас, Россия) класс - II. Содержание лабораторных животных осуществляли в индивидуально вентилируемых системах "IVC" («SHANGHAI PRETTY INDUSTRIES CO., LTD», Китай) с кукурузным подстилом, снабженной автоматической ниппельной

системой поения, искусственным освещением, со световым режимом 12 ч темноты/12 ч света, влажностью – 45-65%, температурой содержания 18-26⁰С. В качестве корма для животных использовали «Комбикорм ЛБК-120 для лабораторных животных», изготовленный ЗАО «Тосненский комбикормовый завод». Подачу воды осуществляли *ad libitum*.

Для заражения использовали 18-24-часовую культуру *T. alkaliphila* выращенную в чашке Петри с агаром Мюллера-Хинтон. Суспензию с мутностью равной 0,5 единиц McFarland разводили в 4,3 раза для получения взвеси с концентрацией 2×10^7 КОЕ/мл (суспензия для заражения).

Контроль концентрации КОЕ/мл в суспензии для заражения проводили путем приготовления ряда десятикратных разведений. Из суспензии для заражения дозатором отбирали 1 мл и переносили в пробирку с 9 мл 0,9 % физиологического раствора. Данную процедуру проводили до разведения 10^{-4} . Из пробирок с разведениями делали пересевы на чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтон по 100 мкл поверхностно, после чего инкубировали в термостатах при температуре +37⁰С в течение 24 часов. После инкубации проводили подсчет выросших колоний на чашках Петри из разведений суспензии (10^{-2} , 10^{-4}) для заражения (Рисунок 5).

Количество выросших колоний на чашках Петри составило 200 КОЕ/мл из раствора с разведением 10^{-4} суспензии для заражения. Таким образом, концентрация в суспензии для заражения составляла 2×10^7 КОЕ/мл, что в пересчете на 500 мкл соответствовало концентрации клеток 10^7 .



Рисунок 5 - Результат посева *Thiopseudomonas alkaliphila* №177 на чашках Петри из разведений суспензии для заражения

Примечание - Название *Oblitimonas* sp. №177 на чашках Петри указан согласно «старой» номенклатуре [132].

После приготовления суспензии животных заражали внутрибрюшинно суспензией по 500 мкл на животного без учета массы тела и наблюдали в течение 14 сут. (Рисунок 6). Количество КОЕ в 500 мкл составляло 10^7 .



Рисунок 6 - Внутрибрюшинное введение суспензии для заражения

2.6. Обработка результатов исследования

Для анализа полученных данных использовали следующее программное обеспечение: Unipro Ugene, SnapGene, VectorNTI-9, GraphPad Prism 9.1.1. (GraphPad Software). Применены следующие статистические методы анализа биологических данных: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и хи-квадрат Пирсона. Также использовали WEB- ресурсы: AMR.cloud и CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Рабочая коллекция изолятов и характеристика

В ходе выполнения работы исследовано шесть (5,7%) различных животноводческих комплексов на территории Ленинградской области: скотоводческие комплексы (КРС) ($n=3$), птицеводческие комплексы ($n=2$), свиноводческий комплекс ($n=1$) и рыбоводческие комплексы ($n=2$) (Рисунок 7).

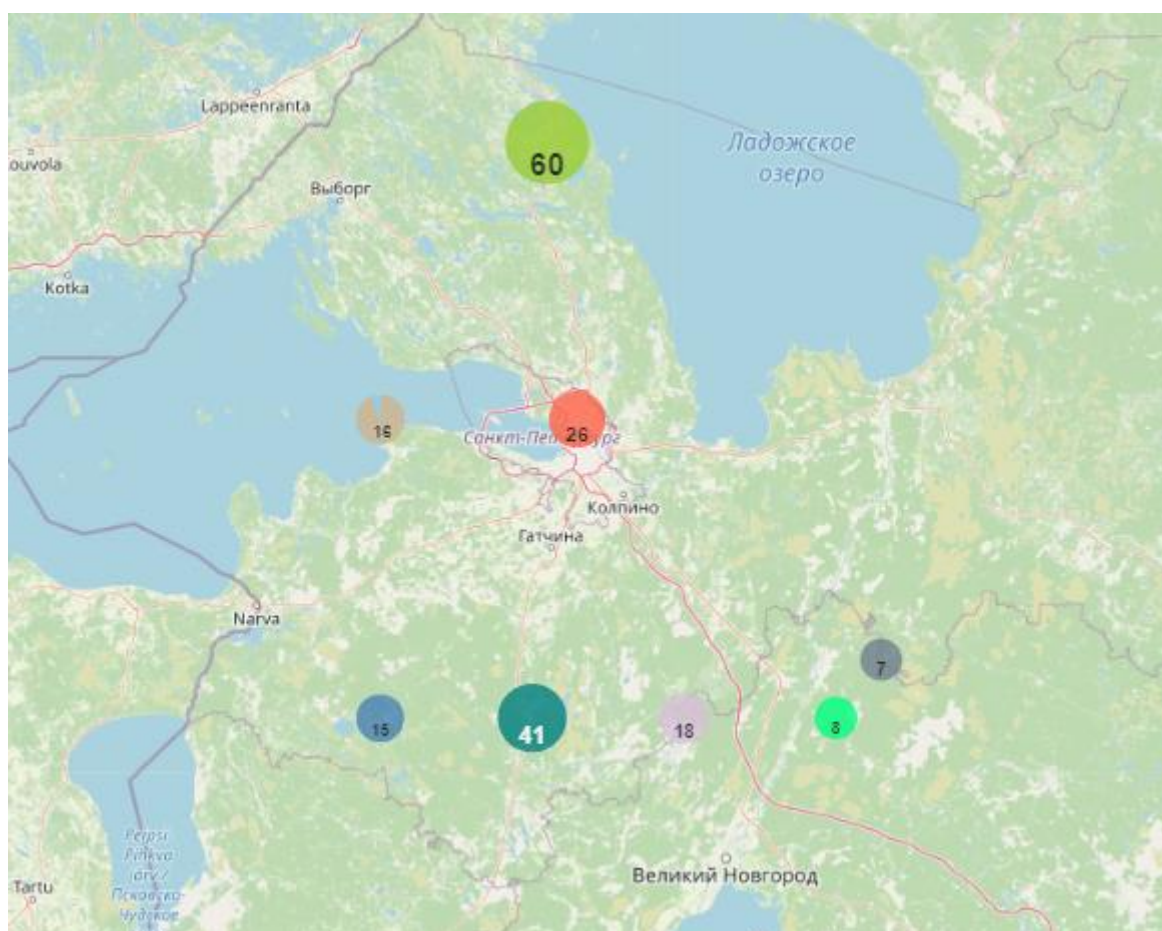


Рисунок 7 - Территориальное расположение сельскохозяйственных предприятий

Примечание - Цифры на кругах обозначают количество выделенных изолятов в данных комплексах.

Для формирования коллекции изолятов с каждого животноводческого комплекса были отобраны 10-15 образцов. Каждый образец обогащали на среде с комбинацией антибиотиков – в двух вариантах. Первый - культивирование на

среде с цефтриаксоном и ванкомицином для выделения устойчивых к цефалоспорином и карбапенемам грамотрицательных бактерий. Второй - культивирование с полимиксином и ванкомицином – для выделения устойчивых к полимиксину бактерий. С каждого посева были отобраны в коллекцию от одного до пяти изолятов на основе морфологии колоний.

В итоге, в исследовательскую работу вошел 191 изолят принадлежащий к семействам: *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Pseudomonadaceae* (Рисунок 8).

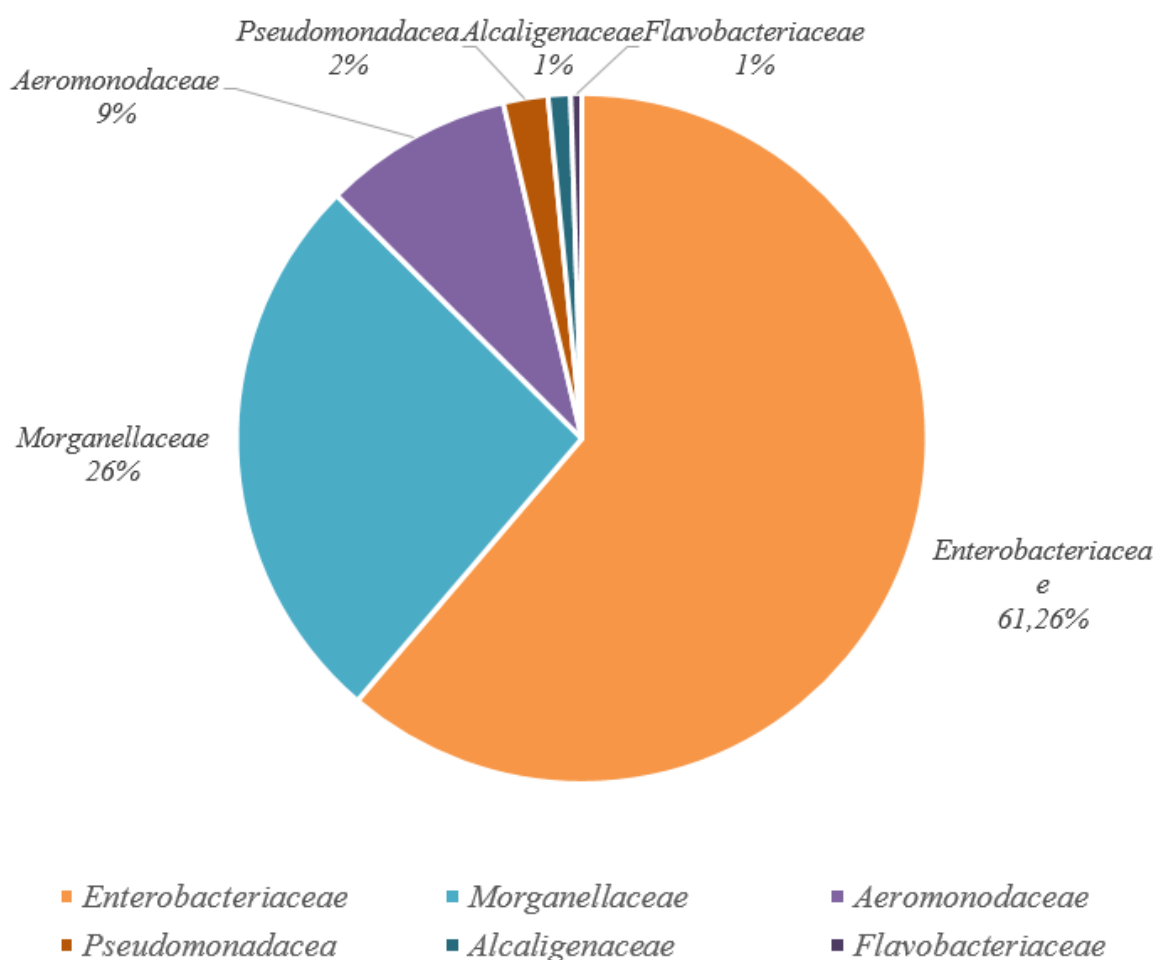


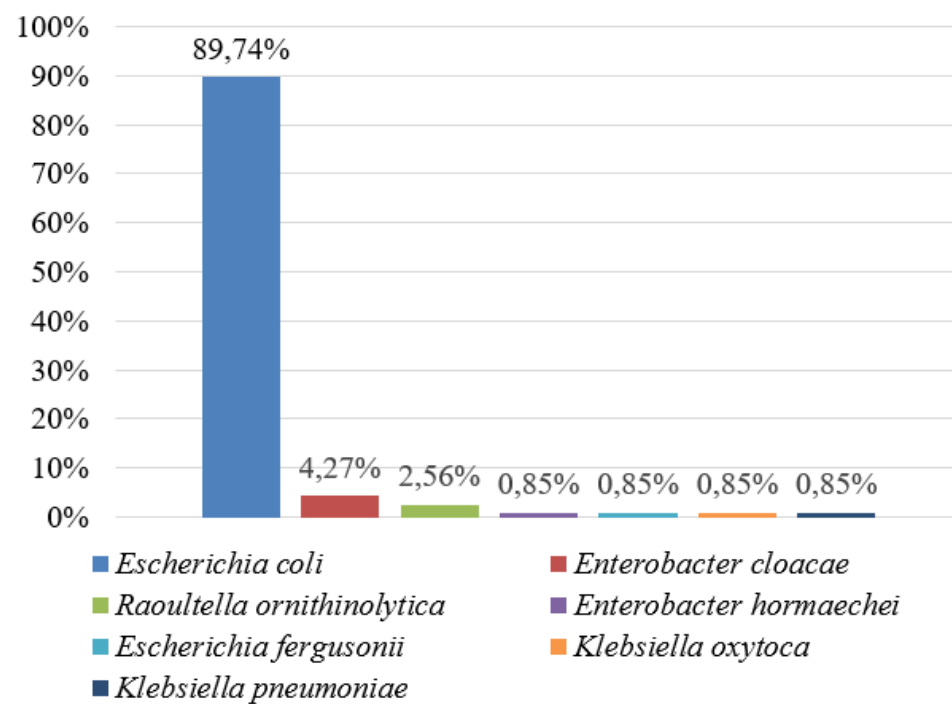
Рисунок 8 – Разнообразие изолятов, выделенных на территории животноводческих комплексов

Доминирующие семейства по количеству выделенных изолятов: *Enterobacteriaceae* и *Morganellaceae* (рисунок 9). Из общего числа изолятов

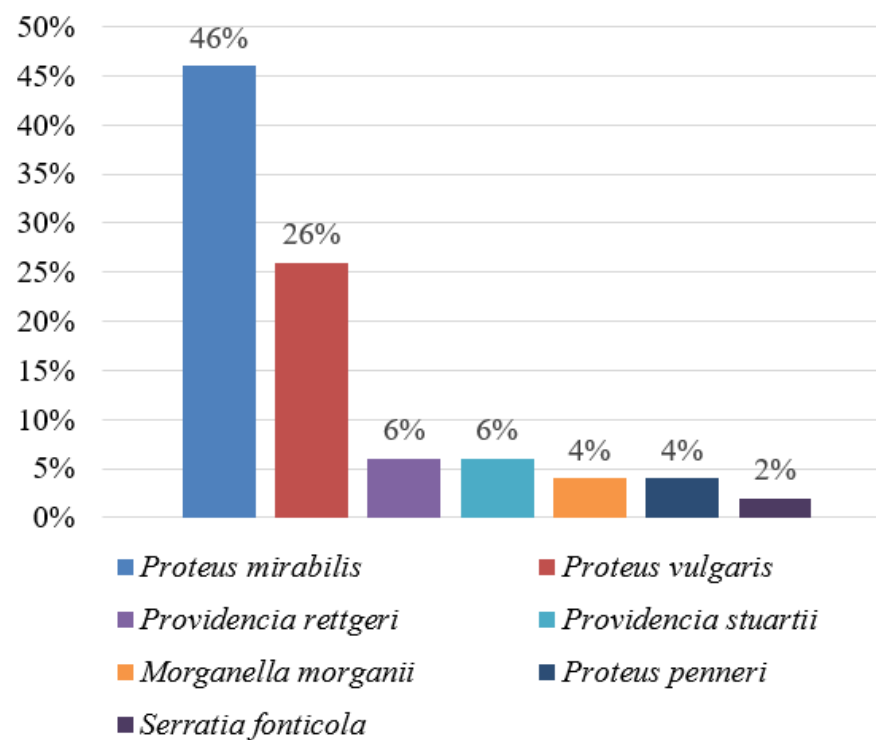
семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) эшерихии составили 89,74% (n=105). Этот показатель подчеркивает их преобладающую роль среди изученных изолятов. Из всех изолятов семейства *Morganellaceae* (n=48), бактерии *Proteus mirabilis* составили 47,9% (n=23). Семейства *Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* представлены небольшим числом бактерий, количество которых колеблется от одного до четырех изолятов. В то же время, бактерии *Aeromonas veronii* составили 52,94% (n=9) от всех изолятов семейства *Aeromonadaceae* (n=17).

Профиль микроорганизмов, выделенных от КРС, имеет выраженное разнообразие биообразцов по сравнению с остальными комплексами (таблица 9). Выделены микроорганизмы из пяти различных семейств, где доминирующими этиопатогенами остаются бактерии видов *E. coli*, *P. mirabilis* и *Proteus vulgaris*. В птицеводческих, свиноводческих и рыбоводческих комплексах профиль выделенных микроорганизмов отличается. Если в птицеводческих комплексах доминирующим этиопатогеном остается *E. coli*, то в свиноводческом комплексе – *P. mirabilis* и *P. vulgaris*. Поскольку микроорганизмы семейства *Morganellaceae* представляют группу микроорганизмов, обладающих природной устойчивостью к большинству антибиотиков, содержание их в высокой концентрации может свидетельствовать о плохом санитарном состоянии и быть причиной инфекционных вспышек у животных.

В рыбоводческих комплексах присутствуют характерные для водного биоценоза микроорганизмы из семейства *Aeromonadaceae* с основным представителем рода *Aeromonas*, включающим виды *A. veronii*, *A. caviae* и *A. hydrophilia*. Преобладание этих микроорганизмов может вызывать септические заболевания у рыб из-за их токсигенных свойств.



Разнообразие представителей
семейства *Enterobacteriaceae*



Разнообразие представителей
семейства *Morganellaceae*

Рисунок 9 – Разнообразие представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Morganellaceae*

Таблица 9 – Количество выделенных изолятов из животноводческих комплексов

		Крупный рогатый скот						Птицы				Свиньи		Рыбы			
Семейство		А (n=41)		В (n=60)		С (n=26)		D (n=15)		Е (n=17)		F (n=17)		G (n=8)		H (n=7)	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Вид	н	%	н	%	н	%	н	%	н	%	н	%	н	%	н	%
	<i>Escherichia coli</i>	25	60,9	36	60	16	61,5	13	86,6	13	76,4	1	5,5	-	-	1	20
	<i>Escherichia fergusonii</i>	-	-	-	-	-	-	1	6,67	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	7,3	-	-	-	-			2	11,7	-	-	-	-	-	-
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,8	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,5	-	-	-	-
<i>Morganellaceae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	1	2,4	9	15	5	19,2	-	-	-	-	8	44,4	-	-	-	-
	<i>Proteus vulgaris</i>	2	4,8	6	10	1	3,8	-	-	-	-	4	22,2	-	-	-	-

Pseudomonadaceae

<i>Alcaligenaceae</i>	<i>Achromobacter spanius</i>	1	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Castellaniella defragrans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,5	-	-	-	-
<i>Flavobacteriaceae</i>	<i>Myroides odoratimimus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5,5	-	-	-	-
<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	-	-	1	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Aeromonas veronii</i>	1	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	100	-	-
	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	-	-	1	1,6	-	-	-	-	1	5,8	-	-	-	-	5	71,4

Из рабочей коллекции грамотрицательных изолятов устойчивость к одному антимикробному препарату проявили – 83,2% (n=159) изолятов. Мультирезистентный профиль имели: к трем антибиотикам – 28,9% (n=46) изолятов, к четырем – 17,6% (n=28) и к пяти антибиотикам – 5,6% (n=9) изолятов. Чувствительность ко всем протестированным АМП сохранилась у 16,7% (n=32) изолятов, среди которых 46,8% (n=15) представлены *Proteus* spp., а 37,5% (n=12) изолятами *E. coli*.

При анализе чувствительности к антимикробным препаратам представителей семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) выявлена высокая степень устойчивости к β -лактамам: ампициллину - 76% (n=89), цефтазидиму - 65% (n=77). В то же время изоляты сохраняли чувствительность к карбапенемам – меропенему, что подтверждается 100% (n=117) чувствительностью. Доля изолятов, резистентных к фторхинолонам, таким как ципрофлоксацин, составляет 64% (n=75). Значительное количество изолятов сохраняли чувствительность к аминогликозидам, в частности, гентамицину - 89% (n=105), а также к колистину - 90% (n=106), фосфомицину - 95% (n=100). Практически все исследованные изоляты оставались чувствительными к тетрациклинам (тигациклину) - 99% (n= 116) (таблица 10).

Эшерихии (n=105), являющиеся преобладающей частью представленных в данном семействе изолятов, характеризуются устойчивостью к ампициллину — 74% (n=78) и цефтазидиму — 38% (n=40). В категории «I» к цефтазидиму доля резистентных изолятов составляет 25% (n=27).

В соответствии с критериями EUCAST, оценка чувствительности изолятов семейства *Morganellaceae* (n=48) к колистину, тигациклину и фосфомицину не была определена ввиду отсутствия пограничных значений. В отношении остальных антибиотиков исследуемые изоляты продемонстрировали высокий

уровень чувствительности: к меропенему — 97,9% (n=47), цефтазидиму — 93,7% (n=45), гентамицину — 91,6 % (n=44), и ципрофлоксацину — 89,5% (n=43). Доля чувствительных к ампициллину изолятов составила 70% (n=34), в то время как устойчивых — 29% (n=14) (таблица 10).

Все испытуемые изоляты (n=191) оказались чувствительны к β -лактамному ингибиторзащищенному препарату (цефтазидим/авибактам) с показателем 100%. Чувствительность к карбапенемным антибиотикам сохранилась практически у всех изолятов 99% (n=190). Один изолят был отнесен к категории «I» с зоной задержки роста диаметром 15 мм (подробнее в главе 3.3).

Таблица 10 - Профиль чувствительности к антибактериальным препаратам у изолятов семейства *Enterobacteriaceae* и *Morganellaceae*

Антибиотик	<i>Enterobacteriaceae</i> (n=117)			<i>Morganellaceae</i> (n=48)		
	S (%)	R (%)	I (%)	S (%)	R (%)	I (%)
Ампициллин	23,93	76,07	-	70	29	-
Гентамицин	89,74	10,26	-	91,6	4,16	-
Колистин	90,6	9,4	-	-	-	-
Меропенем	100	-	-	97,9	-	2,08
Тигециклин	99,05	0,95	-	-	-	-
Фосфомицин	95,24	4,76	-	-	-	-
Цефтазидим	34,19	65,81	-	93,7	6	-
Ципрофлоксацин	35,9	64,1	-	89,5	10	-
Цефтазидим-авибактам	100	-	-	100	-	-

Настороженность вызывает не только высокая устойчивость изолятов к β -лактамным антибиотикам, но и устойчивость к фторхинолонам, которые применяются в ветеринарии без строго контроля. В ветеринарной практике из группы фторхинолонов применяют такие препараты, как энрофлоксацин и марбофлоксацин, а в медицине – ципрофлоксацин, также левофлоксацин и моксифлоксацин.

3.2. Оценка распространения генов БЛРС

Для скрининга на наличие генов СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8, СТХ-М-9, а также TEM, SHV и GES - типов были проведены следующие этапы:

1. Отбор изолятов с фенотипом устойчивости к цефтазидиму;
2. Создание ПЦР-системы на основе биоинформатического анализа актуальных баз данных, содержащих референсные последовательности ферментов исследуемых генов; выявления консервативных участков; подбор праймеров и оптимизация ПЦР-системы;
3. ПЦР-тпирование изолятов.

1. Отбор изолятов

Согласно критериям EUCAST, чувствительными к цефтазидиму считаются штаммы с значениями диаметра зоны задержки роста антибиотика ≥ 22 мм, а устойчивыми < 19 мм. Из рабочей коллекции изолятов в анализ были включены изоляты с фенотипом устойчивости – 29,3% (n=56), из которых *E. coli* составили 73% (n=41), *Proteus* spp. – 7% (n =4), остальные виды – 19% (n=11). Также были включены изоляты категории «I» - с повышенной экспозицией антибиотика (значение диаметра зоны задержки роста от 19 до 22 мм) - 18% (n=36) изолятов, из которых доля *E. coli* составила 88% (n=32).

2. Биоинформатический анализ

Выявление *bla*- генов, ответственных за продукцию БЛРС генетического семейства СТХ-М (молекулярного класса А), генетических групп СТХ-М-1, СТХ-М-2, СТХ-М-8, СТХ-М-9, а также генетических семейств TEM, GES и SHV проводилось с помощью самостоятельно разработанных праймеров для проведения ПЦР с электрофоретическим методом детекции.

Для каждого генетического семейства были получены нуклеотидные последовательности по всем ферментам из базы данных BLDB (год обращения 2019). Так, в группу СТХ-М-1 входили 99 ферментов, СТХ-М-2 – 19 ферментов, СТХ-М-8 – 13 ферментов, СТХ-М-9 – 63 фермента, в группы GES – 40, SHV – 194 и TEM – 237 ферментов соответственно. Множественное выравнивание всех описанных вариантов нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программного обеспечения Geneious prime 2019.0.2. Консервативные участки каждой группы использовали для подбора праймеров. Выявленные консервативные участки проверяли на специфичность с помощью BLAST-анализа (Basic Local Alignment Search Tool) на сайте NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Если специфичность подтверждалась, то использовали для подбора праймеров. Длина консервативных участков варьировалась от 152 п.н. до 672 п.н. (Таблица 11).

Праймеры подбирали помощью программы Oligo v.7. Были подобраны по два праймера для каждой генетической группы (прямой и обратный) от 16 до 22 п.н. Температура отжига варьировалась от 55,1°C до 61,2°C с GC-составом от 47,3% до 66,4% (таблица 12).

Таблица 11 – Консервативные участки генетических семейств

Тип фермента	Количество ферментов	Консервативный участок 5' - 3'	Длина п.н.
CTX-M-1	99	GACGTACAGCAAAAACTTGCCGAATTAGAGCGGCAGTCGGGAGGCAGACTGGGTGTGGCATTGATTAAACACAGCAGATAATTCGCAAATACTTTATCGTGCTGATGAGCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGTGAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTGTTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGATAAGCTGATTGCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTTCGCCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGGGGCGATCCGCGTGATACCACTTCACCTCGGGCAATGGCGCAAACCTCTGCGGAATCTGACGCTGGGTAAAGCATTGGGCGACAGCCAACGGGCGCAGCTGGTGACATGGATGAAAGGCAATACCACCGGTGCAGCGAGCATTCAAGCTGGACTGCCTGCTTCCTGGGTTGTGGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGGCTATGGCACCAACACGATATCGCGGTGATCTGGCCAAAA	672
CTX-M-2	19	GAACCGAGCCACGCTCAATACCGCCATTCCAGGCGACCCGCGTGATACCACCACGCCGCTCGCGATGGCGCAGACCCTGAAAAATCTGACGCTGGGTAAAGCGCTGGCGGAACTCAGCGGGCACAGTTGGTGACGTGGCTTAAGGGCAATACTACCGGTAGCGCGAGCATTCCGGGCGGGTCTGCCGAAATCATGGGTAGTGGGCGATAAAACCGGCAGCGGAGATTATGGCACCAACGATATCGCGGTTATCTGGCCGAAAAACCACGCACCGCTGGTTCTGGTGACCTACTTTACCCAACCGGAGCAGAAGGCGG	321
CTX-M-8	13	AATACTGCCATGAATAAGCTGATTGCCCATCTCGGGGGGCCGGATAAAGTGACGGCATTTGCCCGTACGATTGGCGATGACACGTTCCGGCTCGATCGTACCGAGCCGACGCTCAACACCGCGATCCCCGGCGACCCGCGCGATAACCACCACGCCGTTAGCGATGGCGCAGGCTCTGCGCAATCTGACGTTGGGCAATGCCCTGGGTGACACTCAGCGTGCGCAGCTGGTGATGTGGCTGAAAGGCAACACCACCGGCGCTGCCAGCATTACAGGCAGGGCTACCCACATCGTGGGTTGTCGGGGATAAAACCGGCAGCGGCGATTATGGGTACGACGAATGATATCGCGGTTATTTGGCCGGAAGGTCGCGCGCCGCTCGTTCTGGTGACTTACTTCACCCAGTCGGAGCCGAAGGCAGAGAGCCGTCGTGACGTGCTCGCTG	422

CTX-M-9	61	AACGCTTTCCAATGTGCAGTACCAGTAAAGTTATGGCGGCCGCGGCGGTGCTTAAGCAGAGTGA AACGCAAAAGC---AGCTGCTTAATCAGCCT-- GTCGAGATCAAGCCTGCCGATCTGGTTAACTACAATCCGATTGCCGAAAAACACGTC--- AACGGCACAATGACGCTGGCAGAACTGAGCGCGGCCGCGTTGCAGTACAGCGACAATACCGCCA TGAACAAATTGATT---GCCCAGCTCGGTGGCCCCGGGAGGCGTGACGGCTTTTGCCCCG	269
GES	40	CGACAATGGGGCTACTAACCTCTTACTGAGAGAAATTGGCGGACCTGCTGCAATGACGCAGTATT TTCGTAAAATTGGCGACTCTGTGAGTCGGCTAGACCGGAAAGAGCCGGAGATGAGCGACAACAC ACCTGGCGACCTCAGAGATACAACTACGCCTATTGCTATGGCACGTACTGTGGCTAAAGTCCTCT ATGGCGGCGCACTGACGTCCACCTCGACCCACACCATTGAGAGGTGGCTGATCGGAAACCAAAC GGGAGACGCGACACTACGAGCGGGTTTTCTAAAGATTGGGTTGTTGGAGAGAAAACCTGGTACC TGCGCCAACGGGGGCCGGAACGACATTGGTTTTTTTAAAGCCCAGGAGAGAGATTACGCTGTAG CGGTGTATACAACGGCCCCGAACTATCGGCCGTAGAACGTGACGAATTAGTTGCCT	443
SHV	194	CATTACCATGAGCGATAACAGCGCCGCCAATCTGCTGCTGGCCACCGTCGGCGGCCCGCAGGAT TGACTGCCTTTTTTGCGCCAGATCGGCGACAACGTCACCCGCCTT-GACC-GC-TG-GGAAAC----- GGA-----ACTGAATGAGGCGCTTCCCGGCGACGCCCGCGACACCACTACCCCGGCCAGCATGGC--- CGCGACCCTGCGCAAGCTGCTGACCAGCCAGCGTCTGAGCGCCCGTTTCGCAACGGCAGCTGCTGC AGTGGATGGTGGACGATCGGGTCGCCGACCGTTGATCCGCTCCGTGCTGC	299
TEM	237	ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTG CTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC- ACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAG AACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGTGCGGTATTATCCCGTGTTGACG CCGGGCAAGAGCAACTCGGTCCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCA GTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGC TTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAG CCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATA AAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGA GCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTAT CGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAG ATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAA	861

Таблица 12 – Данные олигонуклеотидных последовательностей для детекции БЛРС

Тип фермента	Название праймера	Олигонуклеотидная последовательность (5'-3')	t-отжига, °C	Длина праймера (п.н.)	Размер ампликона (п.н.)	GC-состав%
CTX-M-1	CTX-M-1_F	ATTAGAGCRGCAGTCGGGAGG	55,1	21	187	48,7
	CTX-M-1_R	TTTGATCTCAACTCGCTGATT		21		
CTX-M-2	CTX-M-2_F	GCGATGGCGCAGACCCTGAAA	59,5	21	157	58,6
	CTX-M-2_R	TGCCGGTTTTATCGCCCAC		19		
CTX-M-8	CTX-M-8_F	ATCCCCGGCGACCCGCGCGAT	61,2	21	185	63,8
	CTX-M-8_R	TTATCCCCGACAACCCACGAT		21		
CTX-M-9	CTX-M-9_F	AACGCTTTCCAATGTGCAGTACC	59,1	23	269	55,4
	CTX-M-9_R	GCGGGCAAAAGCCGTCACG		19		
GES	GES_F	CGACAATGGGGCTACTAACCTC	58,0	22	443	52,8
	GES_R	AGGCAACTAATTCGTCACGTT		21		
SHV	SHV_F	CATTACCRTGAGCGATAAC	59,3	19	298	66,4

	SHV_R	CAGCACGGAGCGGATCA		17		
TEM	TEM_F	AACAGCGGTAAGATC(C/T)TTGAGAG	55,1	23	186	47,3
	TEM_R	AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG		23		

Для улучшения условий постановки ПЦР с подобранными нами праймерами были выбраны оптимальные температурные режимы для амплификации выбранных генов. Протокол амплификации для выявления генов TEM, GES, SHV и CTX-M-2 включает в себе этапы: начальная денатурация при 95°С – 5 минут; денатурация при 95°С – 25 секунд; отжиг при 55,6°С - 25 секунд; элонгация - 72°С – 25 секунд; количество температурных циклов 25; пост ПЦР при 72°С – 5 минут; хранение при 10°С (таблица 13). Для детекции генов CTX-M-1, CTX-M-8 и CTX-M-9 в протоколе амплификации температура отжига составляет 59,5°С – 25 секунд, а количество температурных циклов соответствует 35 (таблица 14).

Таблица 13 - Режимы амплификации для детекции генов TEM, GES, SHV, CTX-M-2

Температура	Время	Цикл
95°С	5 минут	X 1
95°С	25 секунд	X 25
55,6°С	25 секунд	
72°С	25 секунд	
72°С	5 минут	X 1
10°С	∞	X 1

Таблица 14 - Режимы амплификации для детекции генов СТХ-М-1, СТХ-М-8, СТХ-М-9

Температура	Время	Цикл
95 °С	5 минут	X 1
95 °С	25 секунд	X 35
59,5 °С	25 секунд	
72 °С	25 секунд	
72 °С	5 минут	X 1
10 °С	∞	X 1

Полученные нами результаты амплификации продукта ПЦР были учтены и визуализированны в 2% агарозном геле с использованием трансиллюминатора Gel Doc XR+ («Bio-Rad Laboratories», USA) на наличие или отсутствие специфической полосы амплифицированной ДНК в соответствии с длиной исследуемого гена.

После проверки корректности работы ПЦР на контрольных штаммах рабочей коллекции ФГБУ ФНКЦИБ ФМБА России, система была использована для детекции соответствующих генов у собранных изолятов. Электрофореграммы отдельных положительных изолятов рабочей коллекции, несущих гены БЛРС, представлены на рисунке 10.

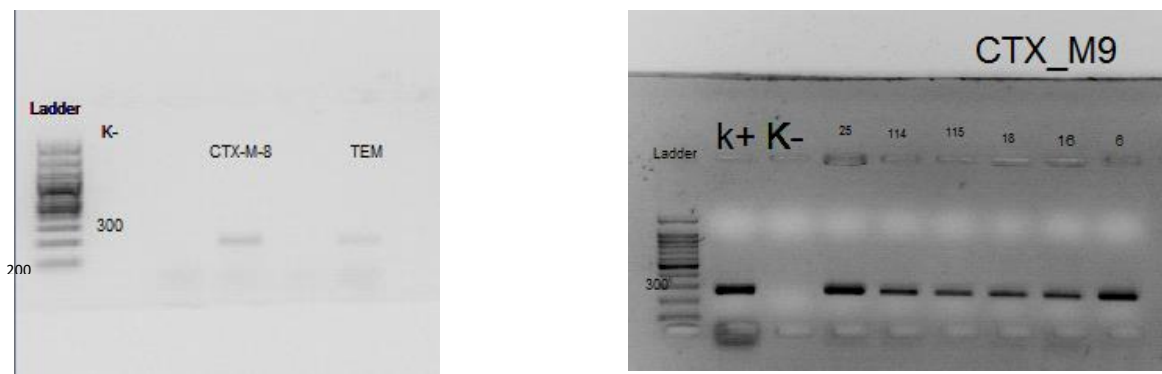


Рисунок 10 - Результаты электрофоретического разделения продуктов ПЦР ($bla_{\text{CTX-M-8}}$, bla_{TEM} , $bla_{\text{CTX-M-9}}$)

Примечание – положительный контроль обозначен K+, отрицательный контроль – K-

В нашем исследовании использовали контрольные образцы для каждой группы генов, обеспечивающие ожидаемый результат. Оптимизацию температурного режима отжига проводили с учетом характеристик метода ПЦР: учитывали температуру плавления праймеров и характеристики ампликона, что обеспечило максимальную специфичность и стабильную амплификацию.

Применение праймеров, специфичных к целевым участкам ДНК, а также визуализация амплифицированных продуктов с использованием гель-электрофореза, позволили исключить вероятность ложноположительных результатов и повысить надежность полученных данных.

3. Результаты типирования

В результате ПЦР-анализа установлено, что 34,78% (n=32) изолятов, из фенотипически устойчивых, содержат гены, отвечающие за продукцию β -лактамазы типа БЛРС (таблица 15). Энтеробактерии, продуцирующие БЛРС семейств CTX-M, составляют 33,6% (n=31) и представлены следующими видами: *E. coli* (n=26), *Raoultella ornithinolytica* (n=2), *Enterobacter cloacae*

(n=2), *Enterobacter hormaechei* (n=1). Еще один изолят, продуцирующий БЛРС – *Providencia rettgeri*.

Среди изолятов, несущих БЛРС, в генетическом семействе СТХ-М выявлены группы: СТХ-М-9 – 34 % (n=11), СТХ-М-1 – 25 % (n=8) и СТХ-М-8 – 6,2 % (n=2) случаев. Распространение данных генетических групп наблюдается только в скотоводческих комплексах (А, В, С).

БЛРС семейства TEM представлена в основном у изолятов семейства *Enterobacteriaceae* – 68,7 % (n=22), также у изолята *P. rettgeri*. Распространение наблюдается среди скотоводческих и птицеводческих комплексов.

У 31,2 % (n=10) изолятов выявлена циркуляция одновременно несколько генетических групп, среди которых гены: TEM + СТХ-М-1 – у шести изолятов, TEM + СТХ-М-9 – у пяти и TEM + СТХ-М-1 + СТХ-М-9 – у одного изолята.

Генетические семейства GES и SHV, а также генетическая группа СТХ-М-2 не были детектированы. Циркуляция генов БЛРС не обнаружена в свиноводческих и рыбоводческих комплексах.

Таблица 15 – Детекция БЛРС в животноводческих комплексах

	А (n=26)		В (n=23)		С (n=8)		Е (n=11)	
	Крупный рогатый скот						Птицы	
Тип БЛРС	n	%	n	%	n	%	n	%
ТЕМ	10	38,5	6	29	2	25	4	36,3
СТХ-М- 1	7	26,9	-	-	1	12,5	-	-
СТХ-М- 8			2	8,7	-	-	-	-
СТХ-М- 9	5	19	4	17,3	2	25	-	-

Примечание – буквой n обозначается число изолятов

Полученные данные показывают, что среди крупного рогатого скота наблюдается высокая частота распространения генов БЛРС и позволяют сделать вывод, что они являются возможными резервуарами генов устойчивости.

3.3. Оценка распространения генов карбапенемаз

Оценка чувствительности изолятов исследованной коллекции к меропенему, выявила один изолят № 177, с зоной задержки роста вокруг диска с меропенемом 15 мм (категория «I»), при этом видовая идентификация с помощью масс-спектрометрии не дала результата. Тем не менее, с помощью ПЦР был проведен скрининг на наличие основных генов карбапенемаз, который выявил накопление сигнала специфичного для карбапенемаз IMP-типа.

Для подтверждения таксономической принадлежности изучаемого изолята № 177 был применен генетический метод - определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Последующий анализ с помощью программы BLAST показал, что изолят № 177 имеет 100% сходство с последовательностью вида *Oblitimonas alkaliphila* (№ GenBank KP 986579, KP 986582, KP 986580, KP 986581, KP 986585, KP 986584). Данный микроорганизм клинического происхождения впервые описал Дробыш А.М. в 2016 году в Соединённых штатах Америки и был назван *O. alkaliphila* [133]. Однако в 2021 году группа ученых в ходе проведения полного филогенетического анализа установили, что данный вид микроорганизма не входит в новый род отряда *Pseudomonadales*, а относится к роду *Thiopseudomonas*. Таким образом, *O. alkaliphila* был переименован, как *T. alkaliphila*. На данный момент род *Thiopseudomonas* включает два вида микроорганизмов: *Thiopseudomonas denitrificans* и *T. alkaliphila* [132].

Установлено, что изолят № 177 *T. alkaliphila* впервые выделен на территории России. Далее нами было проведено подробное изучение данного изолята.

При окрашивании по Граму изолят № 177 *T. alkaliphila*, представляет собой грамотрицательные палочки, располагающиеся в мазке одиночно и попарно (рисунок 11).

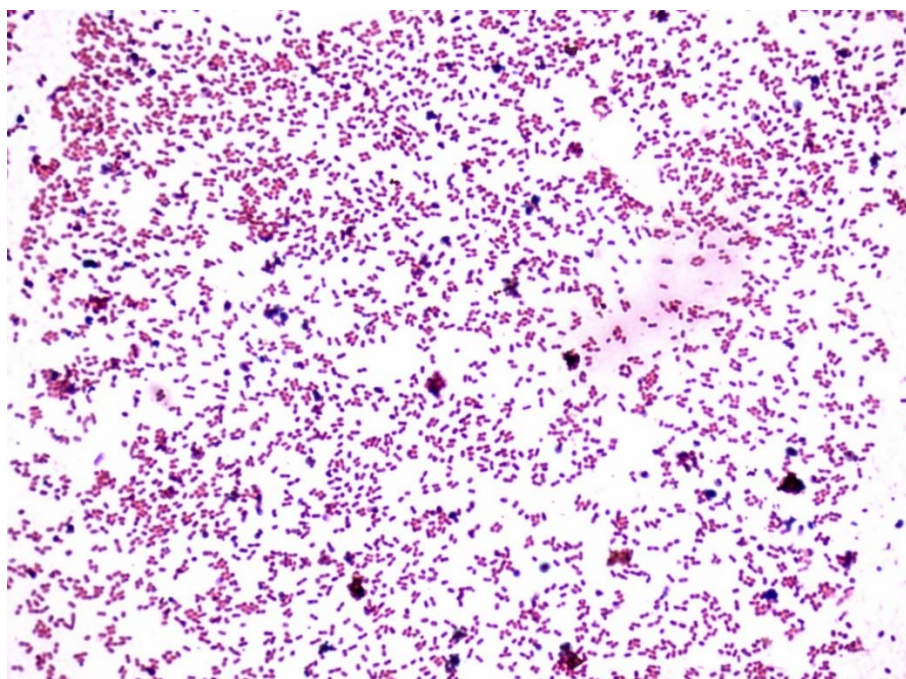


Рисунок 11 - Микрокартина *Thiopseudomonas alkaliphila* № 177
(увеличение x100)

Помимо оптической микроскопии была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Микрофотографии Микрофотографии получены при ускоряющем напряжении 15 кВ, увеличении X750 и X 3500. Область локального спектрального анализа составляла 5 и 20 мкм (рисунок 12).

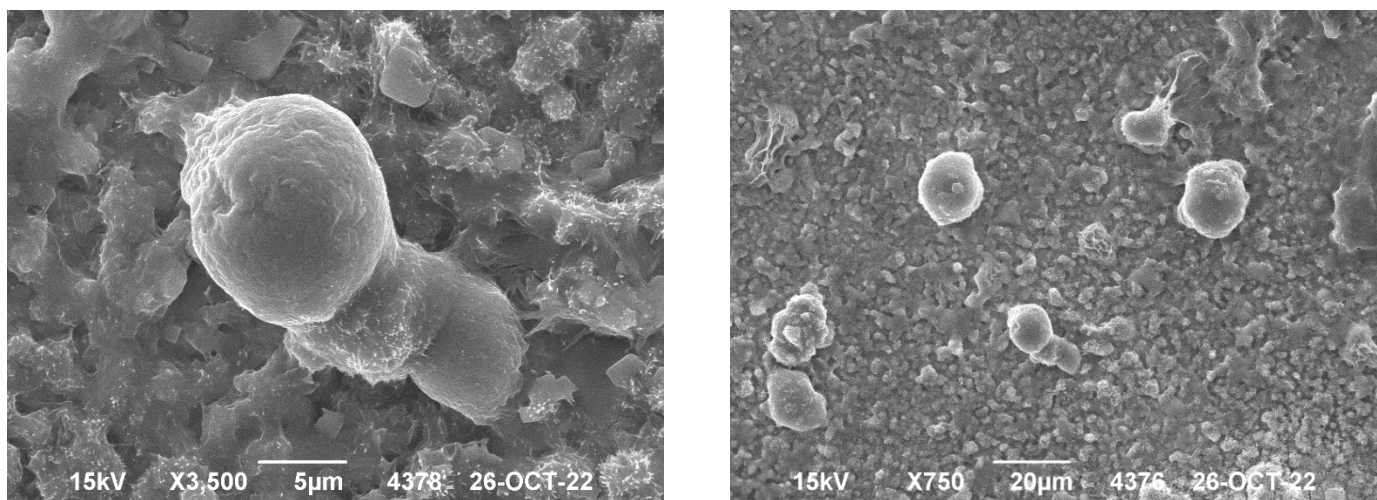


Рисунок 12 - Микрокартина *Thiopseudomonas alkaliphila* № 177 на СЭМ

При изучении культуральных свойств нами определено, что при аэробных условиях культивирования на кровяном агаре при 37°C в течение 18-24 ч образуются колонии молочного цвета в виде мелкой росы. При культивировании в микроаэрофильных условиях, видимый рост микроорганизма наблюдается через 72 ч. На среде Эндо слабый рост *T. alkaliphila* № 177 можно наблюдать только через 72 ч, при аэробных условиях культивирования. Хорошо культивируется на агаре Мюллера-Хинтон, при аэробных условиях культивирования с температурным режимом культивирования 37-42°C в течение 18-24 ч, образуя слизистые, мелкие, круглые колонии с желтоватым оттенком.

Для определения биохимических свойств микроорганизма были использованы тесты API 20 NE (BioMerieux SA, Франция) для определения неприхотливых, не кишечных грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* и API ZYM (Франция) для определения ферментативной активности.

T. alkaliphila № 177 уреаз-положительный, гидролизует эскулин, образует аргинин, не восстанавливает нитраты и нитриты, не образует индол, не разжижает желатин, не расщепляет сахара (глюкоза, манит, мальтоза, маннитол),

не образуют триптофан, арабинозу, N-ацетилглюкозамин, глюконат-калия, каприновая кислота, адипиновая кислота, уксусная кислота, цитрат натрия, фенилуксусная кислота, 4-нитрофенил- β D-галактопиранозид, фенилуксусная кислота, ферментирует эстераза липазу и лейцин ариламидазу (таблица 16, 17)

Таблица 16 - Биохимическая активность *T. alkaliphila* № 177 тестом API 20 NE

Тест	Продукт	Результат
NO ₃	нитраты	отрицательный
TRP	L-триптофан	отрицательный
GLU	D-глюкозу	отрицательный
ADH	L-аргинин	положительный
URE	уреаза	положительный
ESC	скулин	положительный
GEL	желатин	отрицательный
PNPG	4-нитрофенил- β D-галактопиранозид	отрицательный
ARA	L-арабиноза	отрицательный
MNE	D-мнноза	отрицательный
MAN	D-маннитол	отрицательный
NAG	N-ацетилглюкозамин	отрицательный
MAL	D-мальтоза	отрицательный
GNT	цитрат натрия	отрицательный
CAP	каприновая кислота	отрицательный

ADI	адипиновая кислота	отрицательный
MLT	уксусная кислота	отрицательный
CIT	цитрат натрия	отрицательный
PAC	фенилуксусная кислота	отрицательный

Таблица 17 - Биохимическая активность *T. alkaliphila* № 177 тестом API ZYM

Тест	Результат
Алкалин фосфатаза	отрицательный
Эстераза	отрицательный
Эстераза липаза	положительный
Липаза	отрицательный
Лейцин арамидаза	положительный
Валин арамидаза	отрицательный
Трипсин	отрицательный
α -химотрипсин	отрицательный
Кислая фосфатаза	отрицательный
α -галактозидаза	отрицательный
β -галактозидаза	отрицательный
β -глюкоронидаза	отрицательный
α -глюкозидиза	отрицательный

β - глюкозидиза	отрицательный
N-ацетил- β -глюкозаминидаза	отрицательный
α -маннозидаза	отрицательный
α -фукозидаза	отрицательный

Анализ профиля чувствительности к антибиотикам определяли с помощью метода серийных разведений для определения МПК к следующим АМП: ампициллин, цефепим, азтреонам, имипенем, дорипенем, меропенем, биापенем, гентамицин, амикацин, тигециклин, колистин, цiproфлоксацин, триметоприм-сульфаметоксазол, хлорамфеникол, цефепим/сульбактам, цефоперазон/сульбактам, азтреонам/авибактам пиперациллин/тазобактам. Антибиотикограмма данных результатов МПК представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Антибиотикограмма для изолята *T. alkaliphila* № 177

Антибиотик	МПК (мкг/мл)
ампициллин	0,5
цефепим	16
азтреонам	<0,125
имипенем	0,5
дорипенем	4
меропенем	4
биапенем	<0,25
гентамицин	<0,25

амикацин	0,5
тигециклин	0,5
колистин	1
ципрофлоксацин	<0,125
триметоприм-сульфаметоксазол	<0,25
хлорамфеникол	1
цефепим/сульбактам	>16
цефоперазон/сульбактам	32
азтреонам/авибактам	<0,06
пиперациллин/тазобактам	>32

Результаты определения вирулентных свойств *in vivo* на мышинной модели сепсиса. Статистический анализ данных выполняли с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 9.1.1. Данные массы тела соответствовали закону нормального распределения (критерий Шапиро-Уилка). Экспериментальные животные в 1-й день эксперимента были однородны, RSD составил 3,8. Анализ результатов регистрации массы тела животных однофакторным дисперсионным анализом (ANOVA) показал статистически значимые различия между днями эксперимента ($p < 0,05$). При последующем сравнении с применением критерия Тьюки наблюдали достоверное увеличение массы животных на 2-й день эксперимента относительно 1-го дня (Таблица 19). Со 2-го по 14-й дни эксперимента масса тела животных находилась на одном уровне ($p > 0,05$) (Рисунок 13). Увеличение массы

на 2-й день исследования, вероятно, связано с адаптацией животных к условиям эксперимента.

На протяжении 14-и дней за животными проводили клиническое наблюдение с регистрацией сроков развития интоксикации. Гибель животных отсутствовала. Животные были активны, не агрессивны, шерстный покров блестящий, при формировании кожной складки и отпуске ее – тургор кожи составил 2-3 секунды. При осмотре глаз нарушений целостности глазных яблок и конъюнктивы не было обнаружено. Слизистая оболочка ротовой полости имела бледно-розовый цвет. Кожа в месте внутрибрюшинного введения не отечна, без плотных образований, цвет кожи не отличался на симметричном участке тела.

Таблица 19 - Индивидуальные значения массы тела в граммах. n=10

№ животного	День эксперимента													
	1-й	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й	11-й	12-й	13-й	14-й
1.1	20,9	27,9	29,2	28,0	28,7	27,3	27,0	25,9	24,6	25,1	25,4	26,0	26,0	25,8
1.2	19,8	26,6	28,5	28,2	28,9	29,0	29,3	29,1	29,1	28,8	28,5	28,3	28,4	27,8
1.3	19,5	23,1	23,8	24,5	25,0	24,7	23,9	25,0	24,4	24,6	24,8	25,4	25,4	26,2
1.4	19,1	21,5	21,5	21,7	21,9	22,2	22,1	22,4	21,9	22,5	23,4	23,3	23,5	23,2
1.5	18,6	22,2	22,2	21,8	21,8	21,5	21,4	20,7	21,0	21,6	22,0	21,8	22,0	22,4
1.6	19,1	25,5	26,7	26,7	27,5	27,8	28,8	28,4	29,8	30,7	31,1	30,9	31,4	31,4
1.7	18,6	22,9	22,8	22,8	22,8	22,4	22,4	22,2	22,2	22,8	23,2	23,5	23,7	23,8
1.8	18,5	22,8	22,7	21,3	22,8	21,9	22,5	21,9	22,5	23,0	23,5	23,7	23,7	23,4
1.9	19,3	22,9	22,7	21,9	21,9	21,3	21,5	20,7	20,9	21,4	21,8	21,8	21,9	22,0
1.10	18,6	22,3	22,2	21,8	21,8	22,5	22,3	21,6	21,4	22,4	23,1	23,2	23,4	23,7
M	19,20	23,77	24,23	23,87	24,31	24,06	24,12	23,79	23,78	24,29	24,68	24,79	24,94	24,97
SD	0,741	2,128	2,821	2,771	2,977	2,921	3,061	3,114	3,248	3,135	2,973	2,924	2,990	2,898

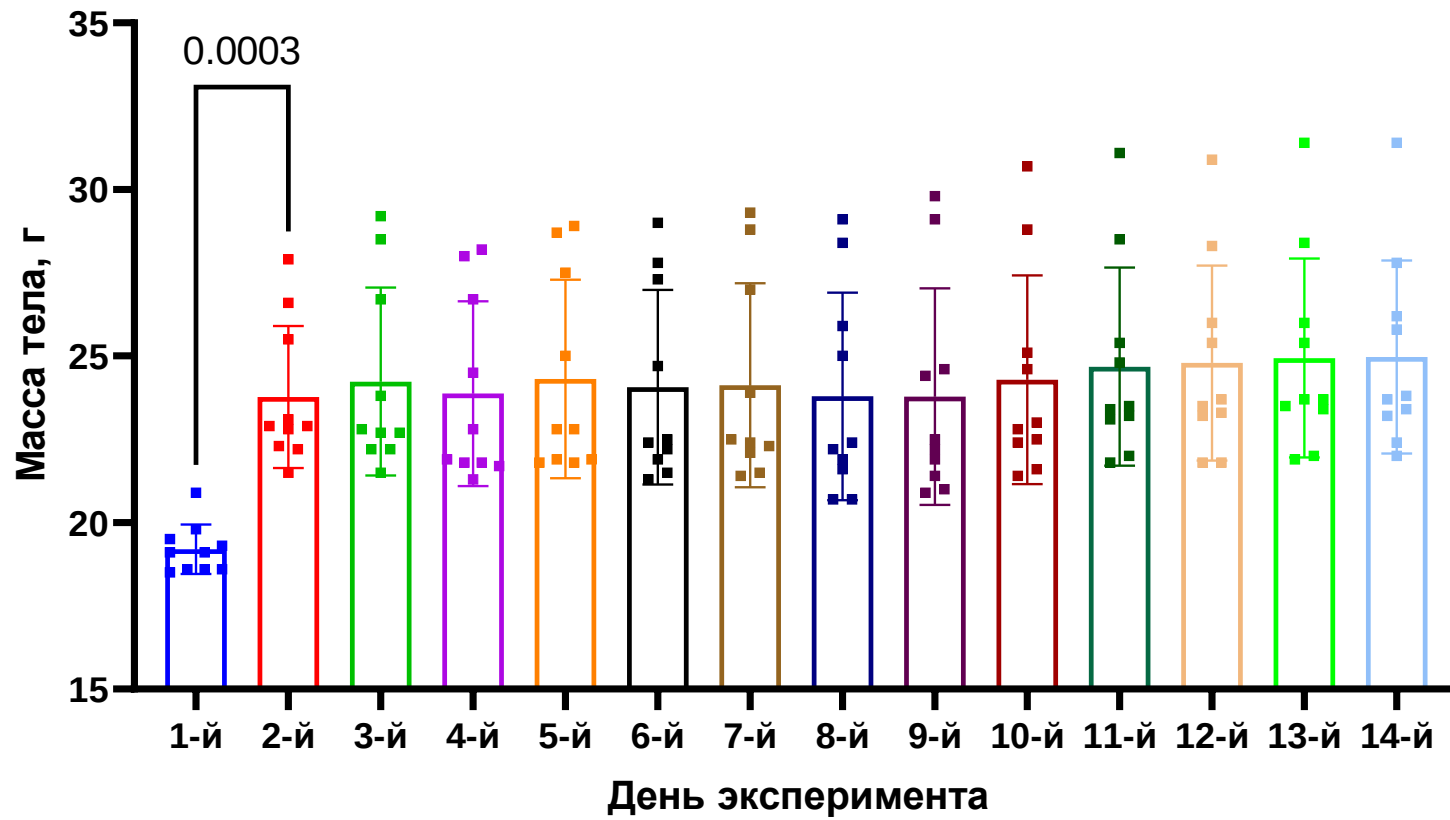


Рисунок 13 - График изменения массы тела животных. Статистически значимое отличие на 2-й день эксперимента, относительно исходной массы (1-й день), критерий Тьюки, $p < 0,05$

Плановая эвтаназии животных на 15-й день эксперимента показала, что макроскопических изменений внутренних органов не обнаружено (Рисунок 14).



Рисунок 14 - Вскрытие эвтаназированных животных

Во время эксперимента гибель животных отсутствовала. Отклонений в поведении и общем самочувствии в течение всего периода наблюдения не отмечалось. Во второй день эксперимента регистрировалось увеличение массы тела, связанное с адаптацией. В последующие дни вес был на одном уровне. Макроскопических изменений внутренних органов также не обнаружено.

Штамм № 177 *T. alkaliphila* при однократном внутрибрюшинном введении мышам не оказал негативного действия. Таким образом, можно сделать вывод, что штамм № 177 *T. alkaliphila* имеет низкую вирулентность.

3.3.1. Штамм *Thiopseudomonas alkaliphila*, несущий ген *bla*_{IMP-27}

Для создания полных хромосомных и плазмидных сборок для изолята №177 было проведено комплементарное секвенирование с длинными прочтениями с использованием платформы MinION Oxford Nanopore Technologies и парных прочтений полногеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq Sequencing system.

Для окончательного установления таксономического статуса изолята № 177 на основе данных полногеномного секвенирования была проведена цифровая ДНК-ДНК гибридизация (*in silico* DDH) с использованием веб-сервиса GGDC (Genome-to-Genome Distance Calculator) версии 4.0. При сравнении с типовым штаммом вида *T. alkaliphila* сходство генома исследуемого изолята составило 87,0% (расчетная вероятность принадлежности к одному виду Prob. DDH $\geq$ 70% составила 94,64% по рекомендованной Формуле 2). Полученное значение существенно превышает общепринятый видовой порог в 70%, что полностью доказывает принадлежность изолята № 177 к виду *T. alkaliphila*.

Геном *T. alkaliphila* представлен в виде одной кольцевой последовательности (бактериальная хромосома) с размером 2175000 п.н. Наличие плазмид не обнаружено. Полногеномная последовательность была депонирована в международную базу GenBank с присвоением номера CP168247.1.

По результатам анализа консервативных частей всех описанных *T. alkaliphila* и изолята № 177, выявлено, что данные геномы образуют пять клад. Наиболее родственным по отношению к изоляту № 177 относится *T. alkaliphila* E5571 (sequence 5) (GenBank №: NZ_CP0123365.1) (Рисунок 15).

Tree scale: 0.1

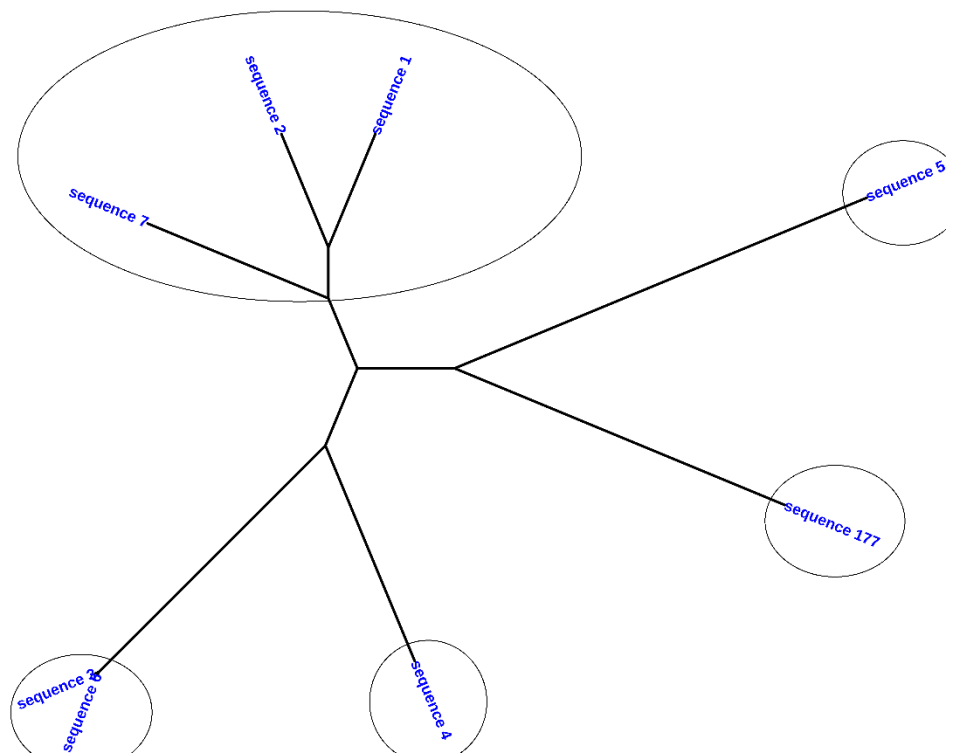


Рисунок 15 - Филогенетическое дерево *Thiopseudomonas alkaliphila* на основе полных последовательностей

(GenBank №: sequence 1- NZ_CP012360.1; sequence 2- NZ_CP012362.1; sequence 3- NZ_CP012364.1; sequence 4 - NZ_ CP 012363.1; sequence 5- NZ_CP0123365.1; sequence 6 - CP012361.1; sequence 7 - CP012358.1)

Однако при анализе пангенома, учитывающего не только наличие или отсутствие генов, но и имеющихся белков, видно, что изолят № 177 кардинально отличается от всех других (Рисунок 16), что обусловлено наличием 208 генов общим размером 369762 п.н.

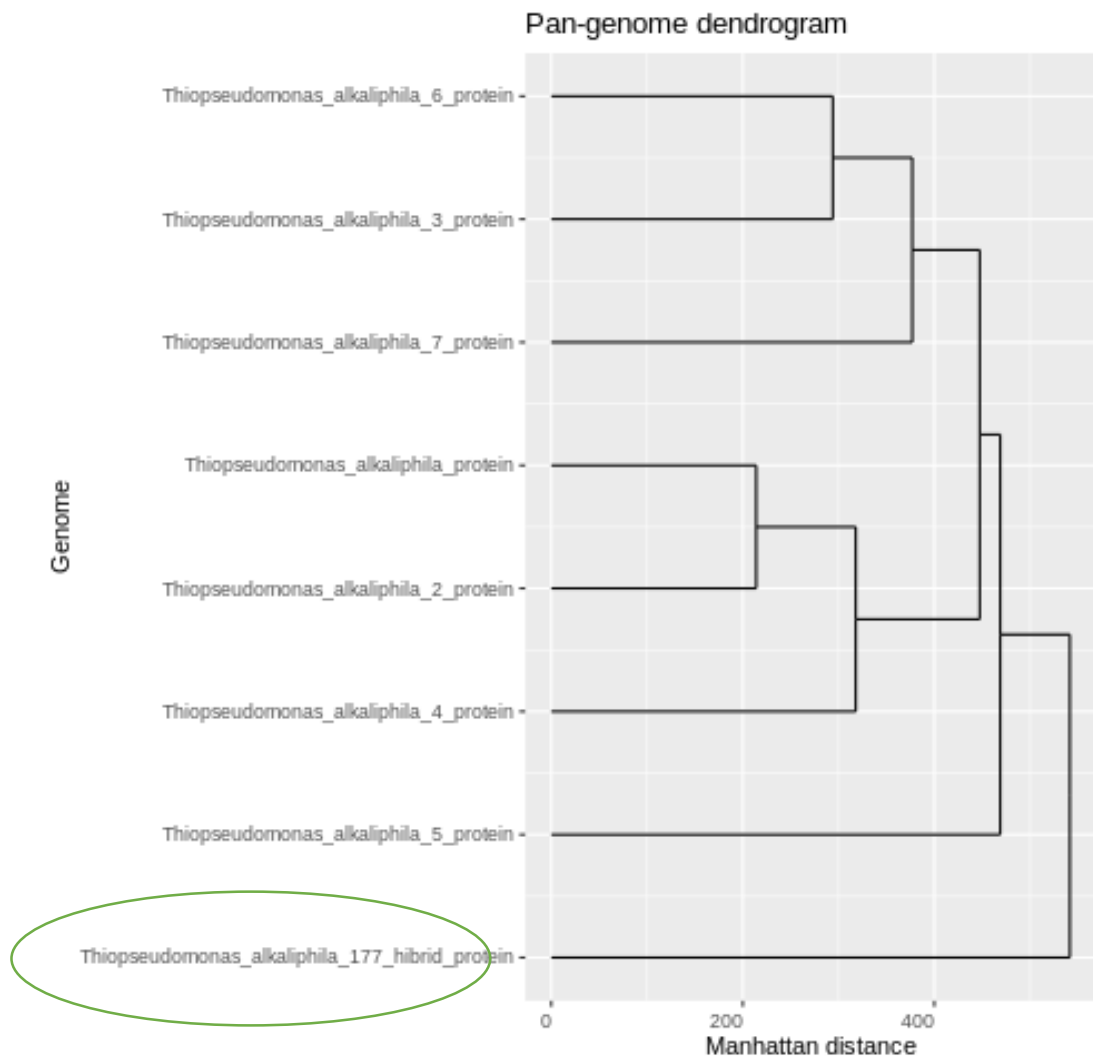


Рисунок 16 - Пангеном *Thiopseudomonas alkaliphila*

(GenBank №: protein - NZ_CP012360.1; protein 2- NZ_CP012362.1; protein 3- NZ_CP012364.1; protein 4 - NZ_CP 012363.1; protein 5- NZ_CP0123365.1; protein 6 - CP012361.1; protein 7 - CP012358.1)

Обнаруженные 208 генов расположены на разных участках генома № 177 и образуют четыре уникальные вставки.

1. Вставка последовательности размером 141017 п.н. несет гены системы рестрикции-модификации 1-го типа (Type I restriction-modification system), различные гены жгутиков (Flagellar hook protein FlgE; Flagellar hook-

associated protein FlgL; Flagellar biosynthesis protein FliR, FliQ, FliO, FliP; Flagellar motor switch protein FliN; Flagellar motor switch protein FliG; Flagellin FliC; Flagellar M-ring protein FliF; Flagellum-specific ATP synthase FliI и т.д.) и ряд гипотетических белков (hypothetical protein).

2. Вставка последовательности размером 38111 п.н. несет гены эффлюксных и различных регуляторных систем, белки предполагаемых факторов вирулентности, а также ряд гипотетических белков (RND efflux system; 3-oxoacyl-synthase, KASII; SrfB; PpkA; ABC-type antimicrobial peptide transport system; hypothetical protein).

3. Вставка последовательности размером 38243 п.н. несет различные регуляторные гены, участвующие в синтезе сахаров, в реакциях гликозилирования, в биосинтезе дезокси- и аминсахаров, синтезе АТФ, в поддержании клеточной физиологии, переносе электронов, передаче сигналов клетке и т.д. (Excinuclease ABC, C subunit-like; Lipid carrier: UDP-N-acetylgalactosaminyltrans; Nucleoside-diphosphate sugar epimerase/dehydratase; Coenzyme F390 synthetase; Polysaccharide pyruvyl transferase, Related to F420H2-dehydrogenase; Tyrosine-protein kinase), транспозазы (Transposase) и гипотетические белки (hypothetical protein).

4. Вставка последовательности размером 23571 п.н. несет ген устойчивости к металло- β -лактамам (*bla*_{IMP-27}), аминогликозидам (*aadA*), стрептомицину (*sat2*), фаговые структуры (Mycobacteriophage Barnyard и Phage exonuclease), систему интегрон - интегразы типа IntI2, также IS3 элемент и различные гипотетические белки (hypothetical protein). Гены *aadA*- *sat2*- *bla*_{IMP-27} - IntI2 образуют генную кассету размером 3541 п.н., которая имеет 100% гомологию лишь с 5 видами бактерий из семейства *Morganellaceae* (GenBank №:

MT226801.1; CP048404.1; CP048275.1; KY847874.1; KY847873.1), выделенных на территории США.

Нами было проведено сравнение изолята № 177 с наиболее гомологичной последовательностью описанного *T. alkaliphila* E1086 (NZ_CP0123365.1) и *Morganella morganii* N18-00103 (CP048275.1), для понимания локализации вставки с генной кассетой *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2* (рисунок 17). Заштрихованная область темно-серым и серым цветом на рисунке 16 обозначает идентичность между последовательностями от 80% до 100%. Цветным обозначена генная кассета у изолята № 177 (вставка 23571 п.н.), имеющая 100% гомологию с *M. morganii* N18-00103 (CP048275.1) (3541 п.н.) расположенную на хромосоме.

Наличие интегрона и IS-элемента свидетельствует о многокомпонентной системе мобильности, которая способствует распространению и установке генных кассет. В данном случае встраивание генной кассеты возможно произошло за счет сложного механизма фаговой трансдукции, при котором фаги переносят генетический материал между бактериями, а не через механизмы транспозиции. Это объясняется наличием фланкирования генной кассеты фагом эндонуклеазы, который участвует в обработке ДНК, обеспечивая разрезание, вставку и интеграцию генетического материала внутри бактериальной клетки и фагом Бернарди, который является переносчиком кассеты между бактериями и участвует в фаговой трансдукции [134].

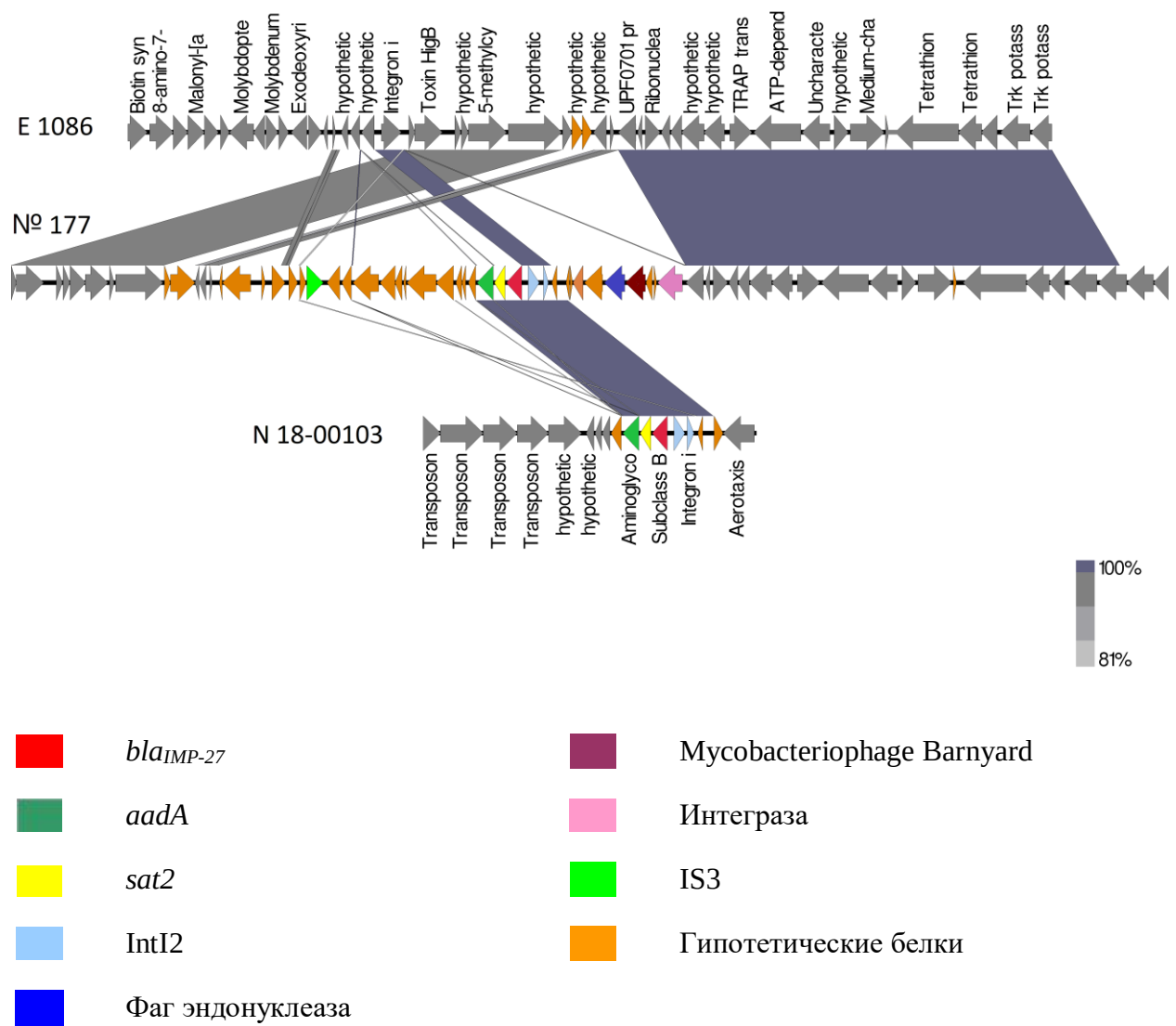


Рисунок 17 - Сравнительный анализ вставки генной кассеты изолята № 177 с вариантами *Thiopseudomonas alkaliphila* E1086 (NZ_CP0123365.1) и *Morganella morganii* N18-00103 (CP048275.1)

3.4. Устойчивость к колистину

3.4.1. Гены *mcr*-типа у изолятов, выделенных из животноводческих комплексов

Для выявления вариантов генов *mcr*-1-5 использовали праймеры, указанные в работе Rebelo [135]. В ходе ПЦР-типирования вариантов генов *mcr*-1-5 обнаружены три изолята (2%) (Есо-103, Есо-151 и Есо-151.1), несущих ген *mcr*-1 (рисунок 18). Данные изоляты выделены от поголовья здоровых животных из комплексов, содержащих КРС. Варианты генов *mcr*-2-5 не были обнаружены [97]. В дальнейшую работу для подробного анализа генома вошли два изолята (Есо-103, Есо-151), так как по всем морфологическим признакам изолят Есо-151.1 был клоном Есо-151.

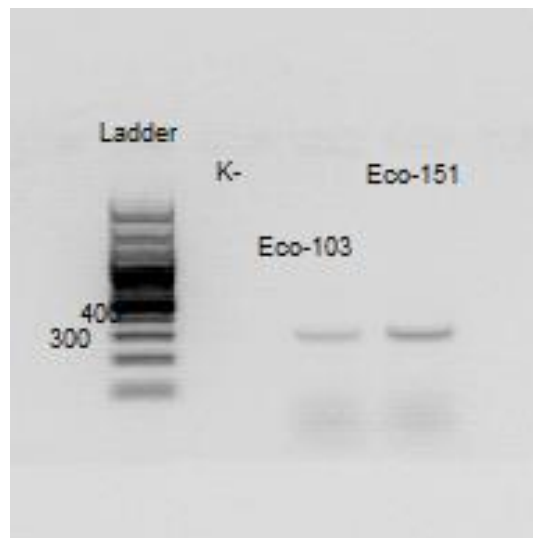


Рисунок 18 - Результаты электрофореграммы гена *mcr*-1 положительных изолятов Есо-103, Есо-151

Результаты проведенной фенотипической оценки антибактериальных препаратов, генотипической характеристики резистоста и определения репликонов плазмид представлены в таблице 18.

Выявлено, что бактерии вида *E. coli* (Есо-103, Есо-151), несущие ген *mcr-1*, проявляли невысокий уровень устойчивости к колистину (диапазон МПК от 4 до 8 мкг/мл) и отличались меньшей ассоциированной устойчивостью к антибиотикам разных классов (таблица 20). Оба штамма (Есо-103, Есо-151) сохраняли полную чувствительность к бета-лактамам, что согласуется у них отсутствием бета-лактамаз.

По уровню устойчивости к аминогликозидам, изолят Есо-151 проявлял устойчивость к гентамицину и амикацину, у него обнаружен ген аминогликозид-нуклеотидилтрансферазы (*aadA5*). Изолят Есо-103 был устойчив к гентамицину, но сохранял чувствительность к амикацину, генов аминогликозид модифицирующих ферментов у него обнаружено не было.

Из исследованных изолятов, Есо-103 сохранял чувствительность к ципрофлоксацину (МПК>0,06 мкг/мл) несмотря на то, что у него присутствовали детерминанты устойчивости к фторхинолонам. Есо-151 проявил высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину (МПК> 8,0 мкг/мл), что связано с мутацией гена *mdfA*.

Не было выявлено полного соответствия между наличием генов устойчивости к сульфаниламидам (*sul1* - кодирующий дигидроптеорат синтазы) и триметоприму (*dfrA17* - кодирующий дигидрофолат редуктазы) и уровнем устойчивости к триметроприм/сульфаметоксазол у изолята Есо-151.

Таблица 20 - Характеристика *mcr-1* положительных изолятов

		Антибиотики										Плазмиды								
		Критерии EUCAST																		
№ Изолята		гентамицин		амикацин		меропенем		цефотаксим		цефтазидим		ципрофлоксацин		тигексиклин		ко-тримоксазол		колистин		
		Ч ≤2	У>2	Ч ≤8	У>8	Ч ≤2	У>2	Ч ≤1	У>2	Ч ≤1	У>4	Ч ≤0,25	У>0,5	Ч ≤0,5	У>0,5	Ч ≤2	У>4	Ч ≤2	У>2	
Еco-103	МПК	64		2		<0,25		<0,12		<0,25		<0,06		<0,12		>32		4		IncI1 IncI2 IncFII IncFIB Col156
	Гены	-				-				<i>mdf(A), gyrA p.S83, p. D87N</i>		-		-		<i>mcr-1</i>				
Еco-151	МПК	32		16		<0,25		<0,12		<0,25		>8		<0,12		<0,25		8		IncHI2 IncHI2A IncN IncFII IncFIB IncFIA
	Гены	<i>aadA5</i>				-				<i>mdf(A) mph(A)</i>		-		<i>sul1, dfrA17</i>		<i>mcr-1</i>				

Примечание - в соответствии с EUCAST: Ч-чувствительные; У-устойчивые.

У изолятов Есо-103 и Есо-151 плазмидный состав отличается друг от друга. Изоляты содержат плазмиды с репликонами типов IncI2 и IncHI2 являющимися потенциальными хозяевами гена *mcr-1* и характеризуются наибольшей распространенностью в Азии и Европе [136]. Для данных плазмид характерна высокая частота переноса между разными видами бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, что свидетельствует об их высокой эпидемиологической значимости.

Изоляты, несущие ген *mcr-1* (Есо-103, Есо-151), принадлежат к разным сиквенс-типам (ST), определенным по схеме Pasteur и Achtman (таблица 21). Выявлено, что при определении ST по схеме Pasteur, изолят Есо – 103 относится к ST 529, а по схеме Achtman к ST 2016, входящий в клональный комплекс ST 205. Изолят Есо – 151 по схеме Pasteur принадлежит новому сиквенс-типу и отличается от наиболее близкородственного ST 341 по двум локусам. При определении ST по схеме Achtman данный изолят относится к ST 1080.

Таблица 21 - Сиквенс типы изолятов Есо – 103 и Есо – 151

№	Pasteur	Achtman	
	ST	ST	клональный комплекс
Есо-103	529	2016	ST205
Есо-151	ближайший 341	1080	-

Нами было установлено, что выделенные *mcr-1* положительные бактерии вида *E. coli* не относятся к патогенной группе кишечных палочек, вызывающие острые кишечные инфекции. Изолят Есо – 103 относится к серотипу – O100: H25, а Есо – 151 – O105: H25.

Анализ генов вирулентности, представленный в таблице 22 показывает, что изоляты Есо – 103 и Есо – 151 несут сывороточный ген устойчивости *iss*, который является фактором вирулентности для энтеропатогенной бактерии вида *E. coli* [137]. Хотя роль отдельных белков в клеточной токсичности не установлена, генетические и биохимические данные свидетельствуют о том, что *cdtB* (цитолетальный токсин В, вызывающий растяжение клеток) коррелирует с клеточной токсичностью и предполагают, что нуклеазная активность может иметь важное значение для клеточной токсичности [138, 139].

Таблица 22 - Факторы вирулентности изолятов Есо – 103 и Есо – 151

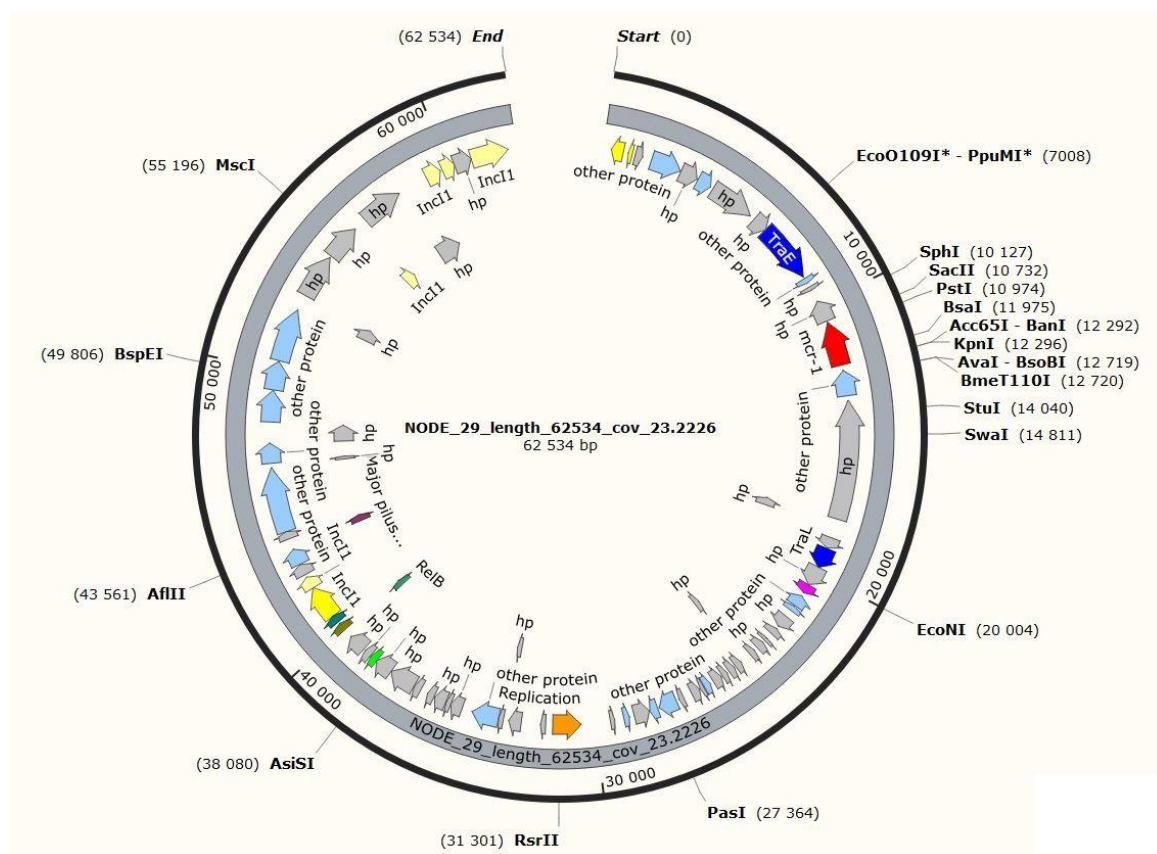
Гены вирулентности	Есо – 103	Есо – 151
<i>Celb</i> (Эндонуклеаза колицин)	<i>celb</i>	-
<i>Cma</i> (Колицин М)	<i>cma</i>	-
<i>Gad</i> (Глутамат декарбоксилаза)	<i>gad</i>	<i>gad</i>
<i>iroN</i> (Белок рецептора сидерофоров энтеробактина)	<i>iroN</i>	-
<i>Iss</i> (сывороточный ген устойчивости)	<i>iss</i>	<i>iss</i>
<i>lpfA</i> (Длинные полярные фимбрии)	<i>lpfA</i>	<i>lpfA</i>

<i>cdtB</i> (Цитолетальный токсин В, вызывающий растяжение клеток)	-	<i>cdtB</i>
--	---	-------------

Проведенный нами анализ аннотированного генома изолята Есо-103 показал, что ген *mcr-1*, обуславливающий устойчивость к колистину, локализован на контиге 29, размером 62 534 п.н. (рисунок 19).

Этот контиг является мультирепликонной структурой, где присутствует несколько репликонов, что способствует его мобильности и устойчивости. В частности, в состав контига включены репликоны следующих типов: IncI, IncQ и IncN. Размеры этих элементов составляют: IncI - 5034 п.н., IncQ - 300 п.н. и IncN - 255 п.н. Это свидетельствует о том, что внутри одного контига сосуществуют несколько независимых систем репликации, каждая из которых обладает собственной способностью к автономной репликации. Присутствие нескольких типов репликонов в одном контиге указывает на то, что данный участок генома представлен мобильной генетической структурой, способной к активному горизонтальному переносу и широкому распространению среди бактериальных популяций.

Помимо генов, связанных с репликацией, в составе контига обнаружены гены, кодирующие белки, ассоциированные с транскрипцией, что обеспечивает регуляцию экспрессии всех элементов. Также выявлены различные белки, выполняющие функции, связанные с поддержанием клеточной структуры, транспортом веществ и обменом веществ, что способствует стабильной репликации и поддержанию структурной целостности плазмиды.



	<i>mcr-1</i>		Белок, отвечающий за репликацию
	IncI1		Фаг
	IncQ		Антитоксиновая система RelB
	IncN		Различные белки
	Белки, ассоциированные с транскрипцией		Гипотетические белки

Рисунок 19 - Генетический состав контига 29 изолята Есо -103

Кроме того, в контиге присутствуют гипотетические белки, функции которых требуют дальнейшего изучения, однако их наличие указывает на сложную и многофункциональную структуру, характерную для мобильных элементов.

В ходе анализа аннотированного генома изолята Есо-151 было выявлено, что ген *mcr-1* локализован на контиге 29 размером 48 893 п.н. (рисунок 20). Этот контиг не содержит дополнительных детерминант резистентности или типов репликонов плазмид, что указывает на его относительно простую структуру и ограниченную мобильность.

На контиге 29 обнаружены гены, кодирующие белки, ассоциированные с регуляцией транскрипции, а также компоненты системы токсин-антитоксин, что свидетельствует о потенциальных механизмах защиты и выживания бактериальной клетки в условиях стрессовых факторов. Также присутствуют гены, отвечающие за систему рестрикции-модификации I типа, которая играет важную роль в защите клетки от внедрения чужеродных ДНК, что может способствовать стабильности существования плазмиды внутри бактериальной клетки.

Кроме того, на данном контиге локализованы гены, связанные с устойчивостью к полуметаллу - теллуру, что говорит о наличии механизмов защиты от токсичных веществ окружающей среды, что может быть важным для выживания бактерий в различных условиях. Обнаружены также различные гипотетические белки, функции которых требуют дальнейшего изучения, а также функциональные элементы, связанные с регуляцией экспрессии генов и структурной организацией плазмиды.

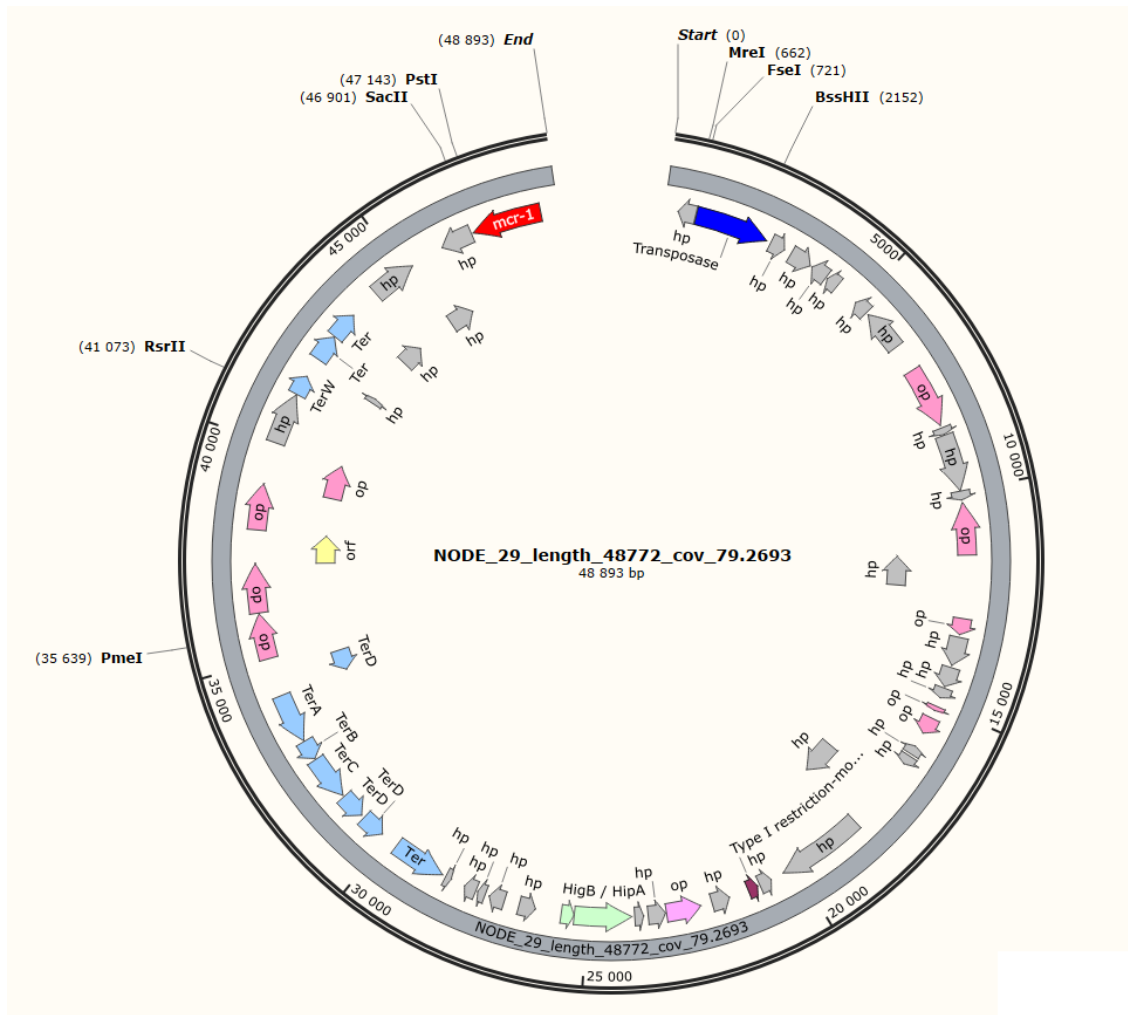


Рисунок 20 - Характеристика контига 29 изолята Есо – 151

3.4.2. Ген *mcr*-типа у изолятов клинического происхождения

Для детекции генов *mcr*-типа среди изолятов клинического происхождения методом ПЦР-типирования нами были исследованы 928 изолятов *E. coli*, выделенные в период с 2018 по 2019 гг от пациентов с различными внебольничными (n=453) и внутрибольничными (n=475) инфекциями в стационарах Москвы и Санкт-Петербурга. В ходе работы ген *mcr-1* обнаружен у семи изолятов *E. coli* (0,8%) (Есо-49, Есо-84, Есо-5571, Есо-529, Есо-636, Есо-1607, Есо-1870), три из них выделены от детей до двух лет (2 месяца; 1 год 7 месяцев; 1 год 9 месяцев), а один изолят не имеет прикрепленной истории болезни и описания. Таким образом, впервые показано бессимптомное носительство *mcr*-положительных бактерий у детей дошкольного возраста. Проведена фенотипическая характеристика обнаруженных изолятов и полногеномное секвенирование (n=7). Значения МПК антибиотиков, выявленные гены резистентности и репликоны плазмид приведены в таблице 23.

Проведенные исследования по анализу фенотипического профиля к АМП показали, что выделенные изоляты существенно различались по уровню чувствительности к β -лактамам и наличию β -лактамаз. β -лактамазы отсутствовали лишь у одного из этих штаммов (Есо-1870), который демонстрировал полную чувствительность к цефалоспорином и карбапенемам. Такой же фенотип демонстрировал изолят Есо-49, содержащий ген β -лактамазы (пенициллиназа) *bla*_{TEM-1B}. Четыре изолята проявляли устойчивость к цефалоспорином при чувствительности к карбапенемам, три из них несли гены бета-лактамаз расширенного спектра класса А (*bla*_{CTX-M-15} или *bla*_{CTX-M-1}), а один – ген бета-лактамазы класса С (*bla*_{CMY-2}). Изолят Есо-5571 демонстрировал высокий уровень устойчивости к цефалоспорином, невысокий уровень устойчивости к меропенему, изолят неёс гены четырёх β -лактамаз: *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1B} и *bla*_{CMY-6}.

По уровню устойчивости к аминогликозидам, высокие значения МПК (>256,0 мкг/мл) гентамицина и амикацина были выявлены в отношении одного штамма (Есо-5571), содержавшего гены четырёх ферментов (*aadA5*, *aadA2*, *aac(6')-Ib3* и *aac(3)-IIId*), а также ген метилтрансферазы (*rmtC*). Остальные изоляты, несли по одному-два гена различных ферментов, проявляли различный уровень устойчивости к гентамицину, но сохраняли чувствительность к амикацину. Изолят Есо-1607 не содержал генов аминогликозид-модифицирующих ферментов, и был полностью чувствителен к гентамицину и амикацину.

Устойчивость к тигециклину (МПК=2,0 мкг/мл) проявлял один штамм (Есо-1607), однако генов устойчивости к этому антибиотику обнаружено не было. При этом у пяти из семи изолятов, были обнаружены гены устойчивости к тетрациклинам (*tet(A)* или *tet(B)*), кодирующие системы эффлюкса. Тигециклин способен преодолевать указанный механизм резистентности.

Не было выявлено полного соответствия между наличием генов устойчивости к сульфаниламидам (*sul1* и *sul2*, кодирующие дигидроптеорат синтазы) и триметоприму (*dfrA12*, *dfrA17*, *dfrA36*, кодирующие дигидрофолат редуктазы) и уровнем устойчивости к триметоприм/сульфаметоксазолу.

Нами определено, что все изученные изоляты (n=7) существенно различались по типам репликонов плазмид, количество которых у отдельных изолятов варьировало от двух до пяти. У пяти из девяти изолятов были обнаружены плазмиды с репликонами типа IncX4, являющиеся одними из наиболее частых хозяев генов *mcr-1*.

Таблица 23 – Характеристика *mcr-1* положительных изолятов

№ Изолята (ST)		Антибиотики																Плазмиды		
		Критерии EUCAST																		
		гентамицин		амикацин		меропенем		цефотаксим		цефтазидим		ципрофлоксацин		тигециклин		ко-тримоксазол			колистин	
		Ч ≤2	У>2	Ч ≤8	У>8	Ч ≤2	У>2	Ч ≤1	У>2	Ч ≤1	У>4	Ч ≤0,25	У>0,5	Ч ≤0,5	У>0,5	Ч ≤2	У>4	Ч ≤2	У>2	
Еco-49 (ST156)	МПК	4		8		<0,25		<1		<1		>64		<0,12		<0,25		4		IncFIA, IncFIB IncFII, IncI1, IncX4
	Гены	aac(3)-IIa				blaTEM-1B						mdf(A), p.S83L, p.D87N		tet(B)		sul1		mcr-1		
Еco-84 (ST369)	МПК	4		8		<0,25		>64		2		32		0.5		>128		4		IncFIB, IncFIC(FII) IncI1, IncX4
	Гены	aac(3) -IId				blaCTX-M-1, blaTEM-1B						mdf(A), p.S83L, p.D87N		tet(A)		sul2, dfrA17		mcr-1		
Еco-5571 (ST31)	МПК	>256		>256		16		>256		256		8		<0,12		>128		4		IncC, IncFIB, IncFII, IncI1, IncI2
	Гены	aadA5, aadA2, aac(6')- Ib3, aac(3)-IId, rmtC				blaNDM-1, blaCTX-M-15, blaTEM-1B, blaCMY-6						mdf(A), p.S83L, p.D87N		-		sul1, dfrA12, dfrA17		mcr-1		

Есо-529	МПК	64	4	<0,25	128	8	16	0,25	НД	8	IncFII, IncX4
(ST205)	Гены	<i>aac(3)-IId</i>		<i>bla_{CMY-2}</i>			<i>mdf(A)</i> , p.S83L	<i>tet(A)</i>	-	<i>mcr-1</i>	
Есо-636 (ST2)	МПК	64	4	0,25	128	8	8	0,12	НД	4	IncX4, IncQ1
	Гены	<i>aph(3')- Ia</i> , <i>aph(3'')- Ib</i>		<i>bla_{CTX-M-1}</i>			<i>mdf(A)</i>	<i>tet(A)</i> , <i>tet(B)</i>	<i>sul2</i>	<i>mcr-1</i>	
Есо- 1607 (ST367)	МПК	<2	2	0,25	256	128	4	2	НД	4	IncI2, p0111
	Гены	-		<i>bla_{CTX-M-15}</i> , <i>bla_{TEM-1B}</i>			<i>mdf(A)</i>	-	-	<i>mcr-1</i>	
Есо- 1870 (ST3)	МПК	4	8	<0,25	<1	<1	8	0,12	НД	8	IncX4, p0111
	Гены	<i>aadA1</i> , <i>ant(2'')- Ia</i>		-			<i>mdf(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA36</i>	<i>mcr-1</i>	

Примечание - в соответствии с EUCAST: Ч-чувствительные; У-устойчивые.

Среди проанализированных нами изолятов - один изолят - Eco-5571 является этиологически значимым. Он выделен у новорожденного ребенка с врожденным пороком сердца. Первые 16 дней он провел в отделении интенсивной терапии новорожденных в городе Грозный, далее переведен в Москву для проведения операции. После, диагностировали вентилятор-ассоциированную пневмонию, а из трахеального аспирата выделили культуру *E. coli*, демонстрирующую множественную резистентность и одновременное наличие генов NDM-1 и *mcr-1*, что является относительно редким событием на сегодняшний день.

Последовательности с генами *mcr-1* и NDM депонированы в базу данных GenBank: *Escherichia coli* strain 5571 plasmid pMCR-1_Msc_2 с номером доступа NZ_MT119279.1; последовательность с геном NDM: *Escherichia coli* strain 5571 plasmid pNDM-1_Msc_Eco-5571 с номером доступа MT119280.1.

Плазмида, несущая ген *mcr-1*, состояла из одного контига без дополнительных генов резистентности, была успешно замкнута в кольцо с помощью секвенирования по Сэнгеру. Размер плазмиды составил 59 т.п.н. с типом репликона IncI2.

Проведенный анализ полногеномного секвенирования показал, что ген *bla*_{NDM-1} локализован с геном *bla*_{CMY-6} на плазмиде из двух контигов размером 128 т.п.н. и типом репликона IncC. Плазмида, несущая ген *bla*_{NDM-1}, была собрана из нескольких контигов, но не замкнута в кольцо, так как, судя по ближайшим плазмидам этой группы, несет область, где накапливаются мобильные элементы, повторы которых препятствуют окончательной сборке. Повторы, которые ассоциированы с включением в последовательность плазмиды сразу нескольких мобильных элементов, сильно усложняют сборку, тем не менее, полученный скаффолд был использован для кластерного анализа.

В кластерный анализ были включены последовательности >90% гомологичностью с базы данных GenBank, проанализированные с использованием программного обеспечения Prokka и визуализацией Fast Tree. Для анализа были включены 68 плазмид близких к скаффолду с геном *bla*_{NDM-1}, а также 75 плазмид, близких к плазмиде с *mcr-1* (Рисунок 21).

Кластерный анализ показал, что ближайшие плазмиды с геном *bla*_{NDM-1} относятся к плазмидам, распространенным среди внутрибольничных штаммов и имеющим глобальное распространение и малую вариабельность, так как максимально близкие варианты описаны в Китае и США. Ближайшими плазмидами для pNDM-1_Msc_Eco-5571 являлись: плазида pQD1501-Ct1 (132 т.п.н.), выделенная от нозокомиальной *K. pneumoniae* в Китае (Номер GenBank MN310375); плазида unitig_1 (140 т.п.н.) от *K. pneumoniae* в США (Номер GenBank CP018817.1); плазида pK71-77-1-NDM (145 т.п.н.), выделенная от *E. coli* из крови пациента в Норвегии (Номер GenBank CP040884.1).

Последовательность плазмиды с геном *mcr-1* оказалась максимально близкой с плазмидой, выделенной также в России. Источник выделения изолята, несущего данную плазмиду - pDR164 (59 т.п.н.) (Номер GenBank MK542639.1) – черный коршун (*Milvus migrans*), который был пойман на Алтае, относительно недалеко от границы с Китаем.

Подобные изоляты, как Eco-5571, не были обнаружены в Московской больнице до поступления младенца на операцию. Младенцу не был назначен в качестве терапии – колистин, также не контактировал с животными или окружающей средой. Данных о сосуществовании *mcr-1* и NDM у эшерихии в городе Грозном и других регионах России отсутствуют.



Рисунок 21 – Кластерный анализ последовательностей с >90% гомологичностью с базы данных GenBank (подчеркнуты черной линией) с рMCR-1 Msc_2 (слева) и последовательность изолята 5571(справа) (подчеркнуты красной линией)

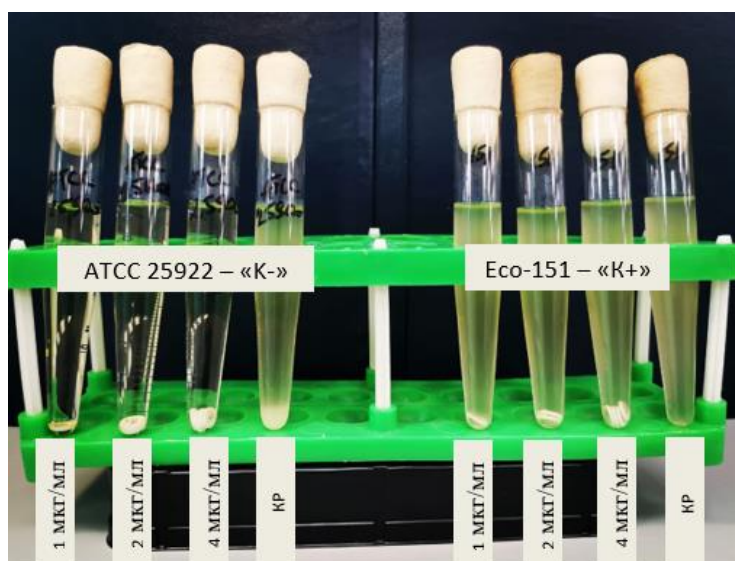
3.4.3. Сравнительный анализ методов определения МПК к колистину

Проведен метод дисковой элюции для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) к колистину. Нами было проведено сравнение трех лабораторных методов определения чувствительности к колистину на выборке из двадцати восьми изолятов *E. coli*: метод серийных разведений, использование анализатора VITEK 2 compact и дисковой элюции.

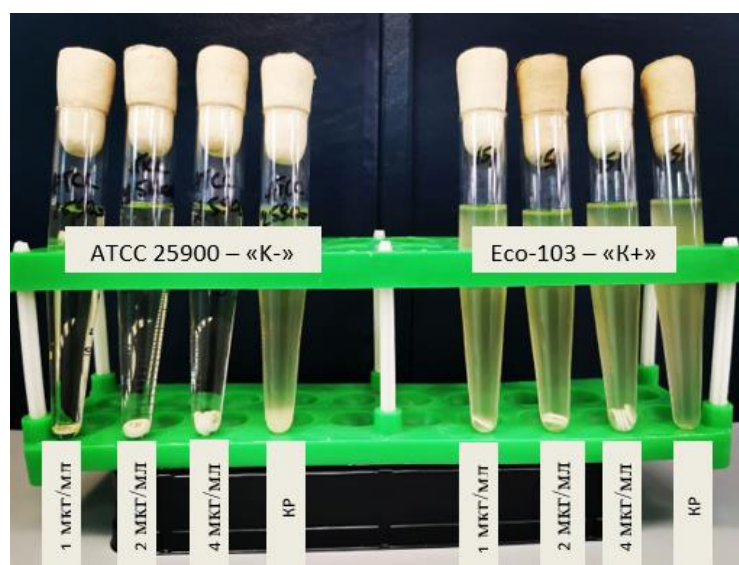
В качестве отрицательного контроля (К-) для определения чувствительности всеми тремя методами, были выбраны штаммы Американской коллекции типовых культур ATCC *E. coli* 29522 и ATCC *E. coli* 29500, а в качестве положительного (К+) – культуры *E. coli* из рабочей коллекции (Есо -103 и Есо-151), с наличием приобретенной фосфоэтаноламинтрансферазы, обуславливающей устойчивость к колистину.

Определение МПК методом серийных разведений было проведено согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST v.13). Определение МПК с помощью анализатора VITEK 2 compact – согласно инструкции производителя. Полученные данные МПК отражены в таблице 24.

Для сравнения был выбран метод дисковой элюции, где использовались диски разных производителей (нагрузка на диск 10 мкг/мл) ((НИЦФ (Россия), «Bio-Rad» (Франция), Oxoid (Англия)). На рисунке 22 представлен результат постановки метода дисковой элюции на примере двух изолятов. Концентрация колистина в пробирках с дисками соответствует 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 4 мкг/мл (слева направо в каждой группе). Четвертая пробирка без диска в группе отрицательного контроля, является «контролем роста (КР)» микроорганизма.



А



В

Рисунок 22 - Определение МПК методом дисковой элюции. Пробирки на рисунке представлены концентрациями 1,2,4 мкг/мл и контроль роста (КР) на примере двух изолятов. На рисунке А представлены культуры: ATCC 25922 – «K-» и Eco-151 - «K+», на рисунке Б - ATCC 25900 – «K-» и Eco-103 - «K+»

После инкубации из пробирки «контроль роста» осуществляли бактериологический посев на кровяной агар для исключения загрязнений. На

обоих рисунках слева показаны чувствительные штаммы АТСС *E. coli* 25922 и АТСС *E. coli* 25900, а справа – колистин устойчивые изоляты с определением МПК ≥ 4 мкг/мл.

Таким образом, установлено, что значения МПК к колистину при определении методом серийных разведений колебались от 0,25 до >8 мкг/мл, методом VITEK 2 compact – от $\leq 0,5$ до ≥ 16 мкг/мл, а методом дисковой элюции от ≤ 1 до ≥ 4 мкг/мл (таблица 24).

Таблица 24 - Данные МПК к колистину тремя методами

№ п/п	МПК (серийными разведениями) мкг/мл / интерпритация у,ч	МПК (VITEK 2 compact) мкг/мл/ интерпритация у,ч	Диск Элюции мкг/мл/ интерпритация у,ч
1	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
2	>8 /У	≥ 16 /У	≥ 4 /У
3	>8 /У	≥ 16 /У	≥ 4 /У
4	4/У	8/У	≥ 4 /У
5	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
6	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
7	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
8	>8 /У	≥ 16 /У	≥ 4 /У
9	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
10	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч
11	0,25/Ч	$\leq 0,5$ /Ч	≤ 1 /Ч

12	0,25/Ч	$\leq 0,5/\text{Ч}$	$\leq 1/\text{Ч}$
13	8/У	4/У	$\geq 4/\text{У}$
14	0,5/Ч	0,5/Ч	$\leq 1/\text{Ч}$
15	0,25/Ч	$\leq 0,5/\text{Ч}$	$\leq 1/\text{Ч}$
16	4/У	4/У	$\geq 4/\text{У}$
17	0,25/Ч	$\leq 0,5/\text{Ч}$	$\leq 1/\text{Ч}$
18	0,25/Ч	$\leq 0,5/\text{Ч}$	$\leq 1/\text{Ч}$
19	$>8/\text{У}$	$\geq 16/\text{У}$	$\geq 4/\text{У}$
20	1/Ч	1/Ч	$\leq 1/\text{Ч}$
21	8/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
22	4/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
23	4/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
24	8/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
25	8/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
26	4/У	4/У	$\geq 4/\text{У}$
27	4/У	8/У	$\geq 4/\text{У}$
28	4/У	4/У	$\geq 4/\text{У}$

Примечание - в соответствии с EUCAST: Ч-чувствительные; У-устойчивые.

Полученное статистическое значение хи-квадрата — 1,528 — при сравнении двух категориальных переменных МПК (с категориями «серийные разведения» и «диск Элюции») — при уровне значимости 0,05 и для 1 степени свободы — составляет примерно 3,841. Такое же значение получилось при

сравнении двух категориальных переменных МПК (с категориями «VITEK 2 compact» и «диск Элюции»). Поскольку $1,528 < 3,841$, мы не отвергаем нулевую гипотезу, что свидетельствует об отсутствии статистически значимой связи между двумя переменными.

При постановке метода дисковой элюции, МПК к колистину можно определить в диапазоне от 1 до 4 мкг/мл, в отличие от предыдущих двух методов. Однако, полученных данных достаточно, чтобы выявить устойчивый фенотип у тестируемых изолятов, с определением МПК >2 мг/л.

Предложенными выше методами невозможно дифференцировать устойчивость к колистину не хромосомно-опосредованную, не связанную с горизонтальным переносом. Однако, в отличие от предыдущих, метод дисковой элюции, позволяет использовать коммерческие диски разных производителей для определения МПК к колистину методом элюции в бульоне, что является легко воспроизводимым методом и обеспечивает надежность получаемых результатов для выявления устойчивого фенотипа [140]. Таким образом, метод дисковой элюции дает отличную возможность использовать его в лабораториях различных ведомств для быстрой диагностики и выявления колистин-резистентных изолятов.

3.5. Оценка резистома изолятов и генетических линий *Escherichia coli*

Из коллекции культур были отобраны шесть изолятов *E. coli* (Есо-5, Есо-20, Есо-74, Есо-76, Есо-124, Есо-154) для полногеномного секвенирования на платформе Illumina MiSeq. Из скотоводческих комплексов отобраны четыре изолята (Есо-5, Есо-20, Есо-154 и Есо-124), из птицеводческих – два (Есо-74, Есо-76).

В таблице 25 приведены данные анализа фенотипического профиля устойчивости к антибиотикам разных классов; генотипического – с определением детерминант резистентности, генов вирулентности, и типов репликонов плазмид.

Выявлено, что у отдельных изолятов количество детерминант резистентности к разным классам антибактериальных препаратов варьирует от двух до шести, что согласуется у них с уровнем МПК. Согласно международным критериям по оценке чувствительности у трех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-124) выявлен фенотип множественной лекарственной резистентности (MDR – Multiple Drug Resistance), характеризующий устойчивость к трем и более классам антимикробных препаратов.

Устойчивость к β -лактамам антибиотикам у всех шести изолятов кодируется генами β -лактамаз: *bla*_{ОХА-1}, *bla*_{СТХ-М-15}, *bla*_{ТЕМ-116}, *bla*_{ТЕМ-229}, *bla*_{ТЕМ-1В}, *bla*_{СМУ-2}. У четырех изолятов (Есо-5, Есо-20, Есо-74, Есо-124) резистентность проявляется в сочетании нескольких генов β -лактамаз: *bla*_{ОХА-1} + *bla*_{СТХ-М-15}; *bla*_{ТЕМ-116} + *bla*_{СТХ-М-15} + *bla*_{ТЕМ-229}; *bla*_{СМУ-2} + *bla*_{ТЕМ-116} и *bla*_{СТХ-М-15} + *bla*_{ТЕМ-116}.

Устойчивость к аминогликозидам у трех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-124) обусловлена синтезом бифункционального фермента ААС

(аминогликозидацетилтрансферазы), кодируемого генами *aac(3)-IIa* и *aac(6')-Ib-cr* и хромосомными генами аминогликозид модифицирующих ферментов: фосфотрансферазами *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id* и нуклеотидилтрансферазами *aadA1* и *aadA2*. У изолята Есо-124 соответствия уровня устойчивости с наличием генов резистентности не выявлено.

Фенотипическая устойчивость к хинолонам выявлена у четырех изолятов, но соответствие между уровнем устойчивости и наличием генов резистентности выявлено только у двух изолятов (Есо-5 и Есо-20), что связано с плазмидопосредованными генами резистентности *qnrB1* и *qnrS1*.

Гены устойчивости к тетрациклинам (*tet(A)* и *tet(B)*), кодирующие системы эффлюкса, были обнаружены у четырех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-76, Есо-124), несмотря на чувствительный фенотипический профиль к антибиотикам у данных изолятов.

Обнаружены гены устойчивости к триметоприм/сульфаметоксазолу у трех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-124), где у двух согласуется с наличием генов устойчивости, кодирующих дигидроптеорат синтазы (*sul2*, *sul3*) и дигидрофолат редуктазы (*dfrA12*, *dfrA14*) соответственно.

Устойчивость к дезинфектантам выявлена у трех изолятов (Есо-74, Есо-76, Есо-124), имеющих резистентность к четвертичным аммониевым соединениям, кодируемым геном *qacL* и кислородактивным соединением с кодируемым геном *sitABCD*.

Таблица 25 – Характеристика изолятов из коллекции

		Антибиотики Критерии EUCAST												Дезинфектанты	Плазмиды	Вирулентность										
№	Из ол ята	Амикацин		Гентамицин		Меропенем		Дорипенем		Цефотаксим		Цефтазидим		Азтреонам		Ципрофлоксац ин		Тигециклин		Ко- тримоксазол		Колистин				
		Ч ≤8 У>8		Ч ≤2 У>2		Ч ≤2 У>2		Ч ≤1 У>2		Ч ≤1 У>2		Ч ≤1 У>4		Ч ≤1 У>4		Ч У>0,5		Ч ≤0,5 У>0,5		Ч ≤2 У>4		Ч ≤2 У>2				
Еco-5	М П К	4		>16		<0,12		<0,12		>32		>32		>32		0,5		<0,25		16		<0,25		-	IncF IB	fim H (F1)
		aac(3)-IIa			bla _{OXA-1}								qnrB1		tet(B)		sul2		-							

	Ге н ы	<i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>aph(3')-Ia</i>		<i>bla</i> _{CTX-M-15}							<i>dfrA14</i>				
Eco-74	М П К	1	2	<0,12	<0,12	16	8	8	0,25	<0,25	16	<0,25	-	IncI1	<i>fim</i> <i>H</i> (F1) , <i>neu</i> <i>C</i>
	Ге н ы	-		<i>bla</i> _{TEM-116} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{TEM-229}					<i>qnrS1</i>	-	-	-			
Eco-74	М П К	4	1	<0,12	<0,12	0,5	0,5	0,5	4	<0,25	0,5	<0,25	<i>sit</i> <i>AB</i> <i>CD</i>	IncF IB, IncF IC, IncH I2,In cI2	<i>fim</i> <i>H</i> (F1, <i>hlyF</i> , <i>iro</i> , <i>N</i> , <i>iss</i> , <i>iut</i> , <i>omp</i>
	Ге н ы	<i>aph(3'')-Ib</i> <i>aph(6)-Id</i>		<i>bla</i> _{TEM-1B}					-	<i>tet(A)</i>	<i>sul2</i>	-			

															<i>T,</i> <i>sitA,</i> <i>tsh</i>
Eco-76	М П К	1	1	<0,12	<0,12	16	>32	>32	<0,06	<0,25	<0,25	<0,25	<i>sit</i> <i>AB</i> <i>CD</i>	IncF IB	<i>fim</i> <i>H</i> (F1, <i>hlyF</i> , <i>omp</i> <i>T,</i> <i>iroN</i> , <i>iss,</i> <i>sitA</i>
	Ге н ы	-		<i>bla</i> _{CMY-2} <i>bla</i> _{TEM-116}					-	<i>tet(A)</i>	-	-			
Eco-124	М П К	1	1	<0,12	<0,12	16	>32	>32	>8	<0,25	16	<0,25	<i>qac</i> <i>L</i>	Col	<i>fim</i> <i>H</i> (F1)
	Ге н ы	<i>aadA, aadA2</i>		<i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{TEM-116}					-	<i>tet(A)</i>	<i>sul3</i> <i>dfrA12</i>	-			

Eco-154	М П К	1	1	<0,12	<0,12	0,5	0,5	0,5	<0,06	<0,25	<0,25	<0,25	-	-	<i>fim</i> <i>H</i> <i>(F1)</i> <i>,om</i> <i>pT,</i> <i>iss</i>
	Г е н ы	-		<i>bla</i> _{TEM-116}					-	-	-	-			

Примечание - в соответствии с EUCAST: Ч-чувствительные; У-устойчивые; П-чувствительный при повышенной экспозиции

Все шесть изолятов имеют похожий набор репликонов плазмид, количество которых у отдельных видов варьирует от одного до четырех. Среди плазмид наиболее распространены мультирепликонные варианты типа IncF, которые кодируют сразу несколько репликонов (в частности, IncFIB, IncFII и IncFIC). Второе место по частоте встречаемости занимают плазмиды группы IncI. Данные типы плазмид являются носителями наиболее разнообразных генов устойчивости, что согласуется с данными резистома.

Для отнесения эшерихий к группе патогенных для птиц (АРЕС – Avian Pathogenic Escherichia Coli), был анализирован вирулом. Выделены два изолята (Есо-74 и Есо-76), несущие шесть и восемь генов патогенности: *fimH* – кодирующий фимбриальный адгезин, *hlyF* – кодирующий специфический птичий гемолизин, *iroN* – кодирующий белок рецептора сидерофоров энтеробактерина, *iss* – сывороточный ген устойчивости, *ompT* – кодирующий белок наружной мембраны с протеазной активностью, *sitA* – ген, кодирующий белок, участвующий в усвоении железа. Изолят Есо-74 дополнительно несет гены: *iutA* – рецептор аэробактерина и *tsh* – ген, кодирующий термостабильный гемолизин. Согласно данным Джонсон Т., чтобы соотнести штамм к группе АРЕС необходимо присутствие не менее двух маркерных генов [141]. Данные изоляты несут от двух до восьми генов вирулентности, характерных для АРЕС.

Наличие генов, таких как *fimH*, *ompT*, *neuC* и *iss* у штаммов *E. coli*, выделенных от коров и свиней, само по себе не позволяет напрямую отнести штаммы к патогенным. Эти гены могут быть связаны с вирулентностью, однако их присутствие считается потенциальным фактором вирулентности только в том случае, если соответствующие штаммы способны вызывать клинические заболевания.

Кроме того, серотипы *E. coli*, обычно, делятся на патогенные и непатогенные по наличию определённых факторов вирулентности и патогенности. Так, изоляты по

серотиповому составу О- и Н- антигена относятся: Есо-5 – О28:Н21, Есо-20 – О61:Н34, Есо-74 – О83:Н42, Есо-76 – О185:Н2, Есо-124 – О23:Н8 и Есо-154 – О103:Н2. Если штамм относится к серотипу, считающимся непатогенным, то даже наличие вышеуказанных генов не обязательно свидетельствует о его патогенной природе. Важной является функциональная активность этих генов и их роль в патогенезе, а также клинические проявления, связанные с этим штаммом. Изолят *E. coli* (Есо-154) с серотипом О103:Н2 относится к энтеропатогенным кишечным палочкам, а в связи с отсутствием веротоксина, относится к атипичным энтеропатогенным кишечным палочкам, не представляющие угрозу для здоровья животных и людей [142, 143].

Заключение

Антибиотики остаются основным средством для борьбы с инфекционными заболеваниями, а появление и распространение устойчивости к критически важным антибиотикам и приобретение резистентности комменсальными бактериями отрицательно сказывается на эффективности антибактериальной терапии и вызывает тревожность в сфере ветеринарии и здравоохранения.

В концепции Единого Здоровья (One Health) отслеживание устойчивости к антимикробным препаратам у людей, животных и в окружающей среде (водная среда, почва, растения) имеет решающее значение и призывает различные страны работать сообща, чтобы предотвратить риски распространения устойчивости.

Интенсивное применение антибактериальных препаратов у животных способствует росту частоты обнаружения устойчивых штаммов комменсальных бактерий, в том числе *E. coli*, выделенных от здоровых животных. Это свидетельствует о том, что использование антибиотиков создает селективное давление, способствующее распространению устойчивых мутантов и генов устойчивости в микробных сообществах, что приводит к дальнейшему распространению «суперустойчивых» бактерий [9,10,144,145].

Результаты проведенных фенотипических исследований показали, что выделенные микроорганизмы, особенно от крупного рогатого скота, проявляют устойчивость к тем классам антибактериальных препаратов, которые в основном применяются в медицинской практике для лечения тяжелых инфекций. Часто, эти инфекции вызываются теми же микроорганизмами или штаммами, циркулирующими как среди животных, так и человека [146, 147].

Установлено, что большинство микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) обладают устойчивостью как минимум к трем группам АМП: пенициллинам

– 76,3% (n=87), фторхинолонам – 56,14% (n=64) и цефалоспорином – 42,11% (n=48), что свидетельствует о формировании профиля множественной лекарственной устойчивости. Проведенные исследования по полногеномному секвенированию изолятов из рабочей коллекции, подтверждают наличие генов ассоциированной устойчивости к АМП разных групп. Анализ генома позволил выявить линии эшерихий, патогенных для птиц (АРЕС) с высоким вирулентным потенциалом. Набор генов, ответственный за вирулентный профиль АРЕС, совпадает с таковым у уропатогенных эшерихий, вызывающих инфекции мочевых путей у человека. Это подчеркивает потенциальную возможность передачи генетических факторов вирулентности у АРЕС – уропатогенным эшерихиям, что подчеркивают важность разработки мер профилактики и лечения эшерихиозов как в птицеводческих хозяйствах, так и в клинической практике.

Грамотрицательные бактерии, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), появляются во всем мире как источник устойчивости к антибиотикам. Например, β -лактамаза группы СТХ-М вызывает устойчивость к цефалоспорином, к которым относится цефотаксим – применяемый в медицине и цефтиофур – в ветеринарной практике. Значительное количество бактерий, продуцирующих БЛРС выделяется из образцов животноводческой продукции, особенно от свиней и птиц [148-150].

Разработанные актуальные праймеры для детекции генов, кодирующих БЛРС включающие все ферменты, входящие в классы СТХ-М-1 (n=99), СТХ-М-2 (n=19), СТХ-М-8 (n=13), СТХ-М-9 (n=63), ТЕМ (n=189), SHV (n=194) и GES (n=40), позволяют выявлять ферменты нераспространенных типов БЛРС.

Обнаружено значительное число изолятов, продуцирующих БЛРС с преобладанием генотипов ТЕМ (68,7%), СТХ-М-1 (25%), СТХ-М-9 (34%), СТХ-М-8 (6,2%), включая варианты их одновременного наличия. Полученные

результаты свидетельствуют о широкой распространенности БЛРС в животноводческих комплексах Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Результаты наших исследований подтверждают и дополняют мировые данные о циркуляции БЛРС типов СТХ-М-9 и СТХ-М-1 в животноводстве, что объясняется широким применением цефалоспоринов третьего поколения, оказывающий селективный прессинг, способствующих распространению определенных генов устойчивости [151]. В отличие от животных, в человеческой популяции основным типом БЛРС является СТХ-М-15. Его широкое распространение объясняется отличной приспособленностью к микробиому человека и высокой способностью передаваться среди комменсальных бактерий [152].

Карбапенемы относятся к металло-бета-лактамазам и отличаются от остальных бета-лактамов – широким спектром антимикробной активностью. Такие, как, меропенем, имепенем, являются антимикробными препаратами последней линии защиты и имеют решающее значение при лечении тяжелых инфекций, вызванных полирезистентными бактериями у людей. Распространение резистентности к карбапенемам ведет к увеличению числа трудноизлечимых инфекций, особенно в ОРИТ и хирургии. Одним из механизмов резистентность обусловлена распространением мобильных генетических элементов, кодирующих ферменты: NDM, KPC, OXA-48, являющиеся наиболее распространенными, а также IMP, VIM.

Нами впервые в России обнаружен вид бактерий *T. alkaliphila*, выделенный из животноводческих комплексов. Данный вид микроорганизма описан всего один раз в США. В ходе ретроспективного анализа исторической коллекции нетипированных изолятов (1969 – 1979 гг.), были идентифицированы и описаны восемь бактерий, изолированных от восьми пациентов. Впервые проведена биопроба в септической модели на мышах для определения вирулентного профиля. Установлено, что данный штамм имеет низкую вирулентность

Впервые обнаружен ген *bla*_{IMP-27} в России у представителя ранее не описанного в России штамма *T. alkaliphila* с мультирезистентным профилем. Устойчивость обусловлена наличием гена IMP-27 в составе генной кассеты *aadA- sat2- bla*_{IMP-27} - *IntI2*, которая локализована на бактериальной хромосоме и обуславливает устойчивость к аминогликозидам, стрептомицину и металло-β-лактамам. Полученные данные подчеркивают необходимость мониторинга неидентифицируемых бактерий, устойчивых к критически важным антимикробным препаратам.

Для борьбы с грамотрицательными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью применяются препараты последней линии защиты, такие как полимиксины. Колистину стали уделять отдельное внимание после того, как он был рассмотрен ВОЗ в качестве антибиотика последнего резерва. Глобальная обеспокоенность была вызвана относительно недавним сообщением о появлении и распространении плазмид-опосредованной устойчивости, обусловленной передачей генов *mcr*-типа. Анализ литературных данных показывает, что гены *mcr*-типов появились и распространились по всему миру задолго до того, как впервые были описаны в 2015 году [153]. Однако использование колистина в животноводстве как стимуляторов роста животных продолжалось на протяжении 50 лет и до сих пор, что ясно объясняет возникновение колистин устойчивых штаммов из-за селективного давления ветеринарного применения [154].

В нашем исследовании, распространённость гена *mcr-1* среди изолятов, выделенных от здоровых животных, находится на невысоком уровне и составляет ~2%, что относительно ниже, чем в других странах.

Комплексный контиг у изолята Eco-103, на котором локализован ген *mcr-1* и три типа репликонов плазмид (*IncI*, *IncN*, *IncQ*) представляет значительную опасность с точки зрения распространения антибиотикорезистентности. Его мультирепликонная

структура способствует эффективной передаче и стабильной экспрессии гена устойчивости, что подчеркивает важность мониторинга и дальнейшие исследования подобных структур.

Контиг у изолята Есо-151 представляет собой относительно мобильную генетическую единицу, содержащую ключевой ген *mcr-1* и набор элементов, обеспечивающих его стабильное существование и потенциальную мобильность. Отсутствие дополнительных детерминант резистентности и типов репликонов говорит о ограниченной, но все же значимой роли данного контига в распространении колистин-устойчивости среди бактериальных популяций.

С точки зрения «Единого здоровья» необходимо продолжить дальнейшие исследования с еще большим количеством выделенных изолятов от различных сельскохозяйственных комплексов, окружающей среды и даже от работников ферм для дальнейшего изучения динамики распространения гена *mcr-1* и других генов устойчивости в Ленинградской области.

В настоящее время глобальная распространённость генов *mcr*-типа среди бактерий семейства *Enterobacterales*, циркулирующих у людей, значительно ниже, чем среди штаммов от животных. Так, например, частота выделения *mcr* – положительных изолятов среди возбудителей интраабдоминальных инфекций составляет 0,34%, среди возбудителей инфекций мочевыводящих путей — 0,23%, среди возбудителей инфекций дыхательных путей таких штаммов обнаружено не было. Особо актуальна проблема ассоциированной устойчивости к полимиксинам и бета-лактамам, прежде всего, к карбапенемам. В настоящее время обнаружение изолятов, несущих гены бета-лактамаз и гены *mcr*-типа, не является редкостью.

В нашем исследовании у изолятов, выделенных от пациентов, частота гена *mcr-1* также на невысоком уровне и составляет 0,8%. Для *mcr-1* положительных

изолятов был характерен высокий уровень ассоциированной резистентности к антибиотикам разных групп.

Особый интерес представляет изолят Есо-5571, выделенный у новорождённого ребенка с пороком сердца, у которого были одновременно выявлены гены *mcr-1* и *bla_{NDM-1}*. При этом ген *mcr-1* был локализован на плазмиде практически идентичной плазмиде, выделенной в 2018 г. на Алтае от дикой птицы Чёрный коршун (*Milvus migrans*) [94].

Однако каких-либо эпидемиологических данных, объясняющих формирование и появление данного изолятов, выявить не удалось. Трудно также объяснить происхождение изолятов Есо-1870 и Есо-1607, выделенных от детей 2-месячного и годовалого возраста, соответственно. В обоих случаях не удалось выявить каких-либо эпидемиологических данных о контактах детей, находившихся на грудном вскармливании, или их родителей с сельскохозяйственными животными.

Прогнозировать динамику появления и распространения генов *mcr*-типа в России в условиях ограниченности методов детекции колистин-резистентных изолятов затруднено. На сегодняшний день для фенотипической оценки чувствительности к колистину применяется только два метода: метод серийных разведений и определение МПК на автоматическом анализаторе, что представляют собой трудоемкие и финансово затратные процессы. Дisko-диффузионный метод и метод Методы Etest-ов согласно международным рекомендация не применяются в связи с высоким уровнем существенных ошибок [155-159].

Апробированный метод дисковой элюции для определения чувствительности к колистину, является наименее трудозатратным методом для внедрения в лаборатории различных ведомств и является достоверной альтернативой для определения МПК методом диффузии в бульоне, как быстрого и нетрудоёмкого способа [160].

Наши исследования еще раз показывают тенденцию развития антибиотикорезистентности, которые дополняются данными относительно устойчивости к колистину.

Чтобы эффективно противодействовать распространению антибиотикорезистентности, нужно устанавливать принципы рационального использования антимикробных препаратов в ветеринарной практике, учитывая современные реалии. Необходимо также создать интегрированные системы надзора за устойчивостью к антибиотикам, а также государственный контроль над использованием антибиотиков в сельском хозяйстве.

Выводы

1. Из животноводческих комплексов выделены и идентифицированы изоляты представителей шести семейств бактерий (*Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Pseudomonadaceae*,). Наиболее многочисленными среди выделенных микроорганизмов оказались представители семейства *Enterobacteriaceae* 61,26% (n=117), из которых преобладающим видом является *E. coli* - 89,74% (n=105). В семействе *Morganellaceae* 25% (n=48) разнообразие видов микроорганизмов более выражено и достигает восьми различных видов, среди которых преобладают бактерии рода *Proteus* spp. 80% (n=40), представленные тремя видами (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*).

2. Фенотипический анализ устойчивости к антибактериальным препаратам позволил выявить мультирезистентный профиль к трем антибиотикам – у 28,9% (n=46) изолятов, к четырем – у 17,6% (n=28) и к пяти антибиотикам – у 5,6% (n=9) изолятов. У представителей семейства *Enterobacteriaceae* выявлена высокая степень устойчивости к β -лактамным антибиотикам, при этом устойчивость к ампициллину составила 76%, а к цефтазидиму - 65%. В отличие от них у микроорганизмов семейства *Morganellaceae* чувствительность к цефтазидиму сохранялась в 93% случаев, а устойчивость к ампициллину достигла 29%.

3. Разработанные праймеры с учетом описанных актуальных вариантов позволили эффективно оценить распространение генов БЛРС, циркулирующих на территории Санкт-Петербурга и Ленинградской области. Среди изолятов, несущих БЛРС, обнаружены гены устойчивости *bla*_{CTX-M-9} - 34% (n=11), *bla*_{CTX-M-1} - 25% (n=8), *bla*_{CTX-M-8} – 6,2% (n=2), *bla*_{TEM} 68,7 % (n=22) случаев. Также наблюдается одновременное наличие генов БЛРС: *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M-1} 18% (n=6), *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M-9} 15% (n=5), также *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M-1} + *bla*_{CTX-M-9} - 3% (n=1).

4. Впервые обнаружена металло- β -лактамаза *bla*_{IMP-27} в составе хромосомы у представителя ранее не описанного в России вида *Thiopseudomonas alkaliphila*. Геном

данного изолята представлен в виде одной кольцевой последовательности и имеет четыре уникальных вставки, в одной из которых представлена генная кассета *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2*, с устойчивостью к аминогликозидам, стрептомицину и металло- β -лактамам.

5. Распространение гена *mcr-1* у изолятов *E. coli*, выделенных из животноводческих комплексов, находится на относительно низком уровне (2%), тем не менее, ген *mcr-1* локализован на контигах, содержащих типы репликонов плазмид, которые способствуют эффективной передаче и потенциальной мобильности генетического материала.

6. Распространенность гена *mcr-1* среди изолятов, выделенных от пациентов, составляет 0,8%, при высокой коррелирующей резистентности к антибиотикам различных групп. Обнаружен этиологически значимый изолят *E. coli*, выделенный у новорожденного ребенка при вентилятор-ассоциированной пневмонии, проявляющий множественную резистентность и одновременное наличие генов NDM-1 и *mcr-1*. Эпидемиологические данные, объясняющие формирование и возникновение данного изолята, установить не удалось. Возможной причиной является межрегиональное и межвидовое распространение резистентных генов.

Список сокращений

МЛУ – Множественная Лекарственная Устойчивость

АМП – Антимикробный препарат

БЛРС (ESBL) – Бета – Лактамаза Расширенного Спектра (Extended-spectrum beta-lactamase)

ЛПС – Липополисахарид

MCR – Mobile Colistine Resistance

ПЦР – Полимеразно-Цепная Реакция

БЛА – Бета-лактамы антибиотики

ПСБ – пенициллинсвязывающие белки

ST – Сиквенс тип

МПК – Минимальная подавляющая концентрация

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing –
Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности

ATCC – American Type Culture Collection – Американская коллекция типовых культур

с/х – сельское хозяйство

п.о. – пар оснований

КРС – крупный рогатый скот

СЭМ – световой электронный микроскоп

АРЕС – патогенная птичья *E.coli*

Благодарности

Автор выражает благодарность за руководство и поддержку на всех этапах выполнения работы научному руководителю, профессору, доктору биологических наук Сухинину Александру Александровичу (ФГБУ ВО «СПбГУВМ», Санкт-Петербург), а также за всестороннюю поддержку и бесценные советы в ходе написания работы кандидату биологических наук, Агеевцу Владимиру Андреевичу (ФГБУ НМИЦИБ ФМБА России).

Автор выражает благодарность члену-корреспонденту РАН, профессору, доктору медицинских наук, Сидоренко Сергею Владимировичу (ФГБУ НМИЦИБ ФМБА России) и всему коллективу научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ НМИЦИБ ФМБА России за консультации и поддержку в проведении этапов диссертационной работы.

Автор выражает благодарность всем сотрудникам животноводческих комплексов за разрешение сбора биологического материала для написания диссертационной работы.

Список литературы

1. Иванова О.Е. Ветеринарный мониторинг антимикробной резистентности бактерий в Российской Федерации/ О.Е. Иванова, А.Н. Панин, С.Ю. Карабанов, [и др.] // Аграрная наука. – 2021. – Т. 347. – № 4. – С. 7-11.
2. Van T. T. H. Antibiotic use in food animals worldwide, with a focus on Africa: Pluses and minuses /T. T. H. Van, Z. Yidana, P. M. Smooker, P. J. Coloe // J Glob Antimicrob Resist. – 2020. – Vol. 20. – P. 170-177.
3. Шульга Н. Н. Антибиотики в животноводстве - пути решения проблемы / Н. Н. Шульга, И. С. Шульга, Л. П. Плавшак // Тенденции развития науки и образования. – 2018. – Т. 35. – № 4. – С. 52-55.
4. WHO. Highest Priority Critically Important Antimicrobials //Book Highest Priority Critically Important Antimicrobials/ Editor, May 2019.
5. Землянко О.М. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам /О.М. Землянко, Т.М. Рогоза, Г.А. Журавлева// Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16 (3). – С. 4-17.
6. Страчунский Л. С. Современная антимикробная химиотерапия: руководство для врачей /Л. С. Страчунский. – М.: МИА, 2009. – 448 с.
7. Горковенко Н.Е. Мониторинг антибиотикорезистентности энтеробактерий /Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров// Научный журнал КубГАУ. – 2018. – Т.137. – № 03. – С. 1-10.
8. Сухорукова М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014 // Клиническая

микробиология и антимикробная химиотерапия/Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю и т.д.//. – 2017. – Т. 19, № №1. – С. 49-56.

9. Burow E. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli*-a systematic review /E. Burow, C. Simoneit, [et al.]// *Prev Vet Med.* – 2014. – Vol. 113. – № 4. – P. 364-75.

10. Hanon J. B. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011-2014) /J. B. Hanon, S. Jaspers, [et al.]// *Prev Vet Med.* – 2015. – Vol. 122. – № 4. – P. 443-52.

11. Минаева Л. П. Проблемы безопасности мяса и продуктов из него при их загрязнении антибиотиками /Л.П. Минаева// *Вопросы диетологии.* – 2017. – Т. 7. – № 4. – С. 1-4.

12. Панин А.Н. П. Проблема резистентности к антибиотикам возбудителей болезней, общих для человека и животных // /А. Н. Панин, А. А. Комаров, А. В. Куликовский, Д. А. Макаров // *Ветеринария, зоотехния и биотехнология.* – 2017. – Т. № 5. – С. 18-24.

13. Sun P. Occurrence of blaKPC-2, blaCTX-M, and mcr-1 in Enterobacteriaceae from Well Water in Rural China /P. Sun, Z. Bi, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – № 4. – P. e02569-16.

14. Bialvaei A. Z. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance /A. Z. Bialvaei, Kafil H. Samadi// *Curr Med Res Opin.* – 2015. – Vol. 31. – № 4. – P. 707-21.

15. Kempf I. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals /I. Kempf, E. Jouy, C. Chauvin// *Int J Antimicrob Agents.* – 2016. – Vol.48. – № 6. – P. 598-606.

16. Liu Y. Y. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study /Y. Y. Liu, Y. Wang [et al.]// *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16. – № 2. – P. 161-8.
17. Hu Y. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene /Y. Hu, F. Liu, I. Y. Lin, G. F. Gao, B. Zhu// *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16. – № 2. – P. 146-7.
18. Ahmed M. Global initiatives to phase-out colistin use in food-producing animals /M. Ahmed O., Y. M. Abouzeed, M. A. Daw// *Open Vet J.* – 2025. – Vol. 15. – № 2. – P. 533-540.
19. Walsh T. R., China bans colistin as a feed additive for animals /T. R. Walsh, Y. Wu // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16. – № 10. – P. 1102-1103.
20. Зубов П.В. Разработка новых антибактериальных препаратов – проблемы и перспективы /П.В. Зубов, В.В. Новикова// *Современные проблемы науки и образования.* – 2015. – Т. 5. – С. 1-11.
21. Новикова Е.Н. Развитие резистентности к антибактериальным препаратам при лечении акушерско-гинекологической патологий у коров/Е.Н. Новикова, И.С. Коба, Н.Ю. Басова// *Сборник научных трудов КНЦЗВ.* – 2019. – Т. 8. – № 3. – С. 190-194.
22. Мендыбаева А.М. Оценка риска появления резистентности к антибиотикам условно-патогенной и патогенной микрофлоры, выделяемой из продуктов животного происхождения /А.М. Мендыбаева, М. Рузаускас, Ю.В. Алешина и др.// *Вестник КрасГАУ.* – 2022. – Т. №2. – С.147-156.
23. Забровская А.Н. Чувствительность к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства /А.Н. Забровская // *Farm animals.* – 2013. – Т. 1. – С. 78-83.

24. Макаров Ю. А. Кишечные инфекции новорожденных телят бактериальной этиологии /Ю. А. Макаров// Доклады РАСХН. – 2009. – Т. 2. – С. 46–49.
25. Бобылева Г.А. Перспективы развития птицеводства России /Г.А. Бобылева// АПК: Экономика, управление. – 2007. – Т. 8. – С. 8-11.
26. Андреева Н.Л. и др. Изучение бактериальных инфекций на птицефабриках /Н.Л. Андреева, М.Е. Дмитриева, А.А. Климов, Л.С. Фогель// Ветеринария. – 2004. – Т. 5. – С. 14-16.
27. Куликов Н.В. Успешный Европейский опыт отказа от кормовых антибиотиков в птицеводстве [Электронный ресурс] // Московский ветеринарный веб-центр: - сайт: // Режим доступа: <http://webmvc.com/vet-articles/birds/aviculture/opyt-otkaza-ot-kormovykh-antibiotikov.php>.
28. Public health and animal welfare // Book antibiotics in animal farming / Editor, November 2011.
29. Горковенко Ю.А. Острые кишечные расстройства новорожденных телят бактериальной этиологии /Ю.А. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко, В.А. Серебрякова// Труды ВИЭВ. – 2009. – № 75. – С. 179–181.
30. Хайтович А.Б. Подходы к решению проблемы лекарственной устойчивости в мире и Российской Федерации. Лекция. /А.Б. Хайтович// Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2018. – Т. 8(2). – С. 81-95.
31. Кулмагамбетов И.Р. Современные подходы к контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности в мире /И.Р. Кулмагамбетов, С.С. Сарсенбаева, Ш.Х. Рамазанова, Н.К. Есимова// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – Т. 9. – С. 54-59.

33. European commission // Opinion of the scientific steering committiee on antimicrobial resistance. – 1999.

34. Hammerum A.M. Danish integrated antimicrobial resistance monitoring and research program / A.M. Hammerum, O. E. Heuer, [et al.] // Emerg Infect Dis. – 2007. – Vol. 13. – № 11. – P. 1632-9.

35. Klare I. Decreased incidence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci isolated from poultry meat and from fecal samples of humans in the community after discontinuation of avoparcin usage in animal husbandry /I. Klare, D. Badstubner, [et al.] // Microb Drug Resist. – 1999. – Vol. 5. – № 1. – P. 45-52.

36. Van den Bogaard A.E. The effect of banning avoparcin on VRE carriage in The Netherlands /A.E. Van den Bogaard, N. Bruinsma, E. E. Stobberingh [et al.]// J Antimicrob Chemother. – 2000. – Vol. 46. – № 1. – P. 146-8.

37. Зубарева В.Д. Молекулярные механизмы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам у микроорганизмов /В.Д. Зубарева// Сельскохозяйственная биология. – 2022. – Т. 57. – № 2. – С. 237-256.

38. Updatedadvice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health // Book Updatedadvice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health / Editor. – London E14 5EU, 26 May 2016.

39. Забровская А.В. Генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам у микроорганизмов, выделенных от сельскохозяйственных животных и из продукции животноводства // Молекулярная диагностика. – 2017. – Т. 2. – С. 240-241.

40. Muyembe T. Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda* /T. Muyembe, J. Vandepitte, J. Desmyter// *Antimicrob Agents Chemother.* – 1973. – Vol. 4. – № 5. – P. 521-4.
41. Falagas M. E. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections /M. E. Falagas, S. K. Kasiakou// *Clin Infect Dis.* – 2005. – Vol. 40. – № 9. – P. 1333-41.
42. Storm D. R. Polymyxin and related peptide antibiotics /D. R. Storm, K. S. Rosenthal, P. E. Swanson// *Annu Rev Biochem.* – 1977. – Vol. 46. – P. 723-63.
43. *Antimicrobial Drug Resistance: Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1.* / K. S. Kaye, D. Marchaim, D. L. Mayers, M. Ouellette, J. D. Sobel – 2nd ed. – 1 online resource (XXI, 773 pages 164 illustrations, 61 illustrations in color.)
44. Beceiro A. Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii* /A. Beceiro, A. Moreno, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – № 1. – P. 518-26.
45. Gunn J. S. The *Salmonella* PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more /J. S. Gunn // *Trends Microbiol.* – 2008. – Vol. 16. – № 6. – P. 284-90.
46. Poirel L. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes /L. Poirel, A. Jayol, P. Nordmann// *Clin Microbiol Rev.* – 2017. – Vol. 30. – № 2. – P. 557-596.
47. Groisman E. A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ /E. A. Groisman// *J Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183. – № 6. – P. 1835-42.
48. Cannatelli A. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP

mgrB regulator /A. Cannatelli, M. M. D'Andrea, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – № 11. – P. 5521-6.

49. Sun J. Deciphering MCR-2 Colistin Resistance /J. Sun, Y. Xu, [et al.]// *mBio.* – 2017. – Vol. 8. – № 3. – P. e00625-17.

50. Gao R. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance /R.Gao, Y. Hu, [et al.]// *PLoS Pathog.* – 2016. – Vol. 12. – № 11. – P. e1005957.

51. Yang Y. Q. Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China / Y. Q. Yang, Y. X. Li, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – Vol.61. – № 5. – P. e01204-16.

52. Shen Z. Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals / Z. Shen, Y. Wang, [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16. – № 3. – P. 293.

53. Poirel L. Emerging plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? /L. Poirel, P. Nordmann// *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – № 8. – P. 2326-7.

54. Kieffer N. *Moraxella* Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants /N. Kieffer, P. Nordmann, L. Poirel// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. –№ 6. – P. e00129-17.

55. Poirel L. MCR-2-mediated plasmid-borne polymyxin resistance most likely originates from *Moraxella pluranimalium* /L. Poirel, N. Kieffer, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – Vol. 72. – № 10. – P. 2947-2949.

56. Eichhorn I. Identification of novel variants of the colistin resistance gene mcr-3 in *Aeromonas* spp. from the national resistance monitoring programme GERM-Vet and from diagnostic submissions /I. Eichhorn, C. Feudi, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – Vol. 73. – № 5. – P. 1217-1221.

57. Carattoli A. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016 /A. Carattoli, L. Villa, [et al.]// *Euro Surveill.* – 2017. – Vol. 22. – № 31. – P. 30589.

58. Kieffer N. *mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin /N. Kieffer, G. Royer, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – Vol. 63. – № 9. – P.

59. Wang C. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10* /C. Wang, Y. Feng, [et al.]// *Emerg Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 508-516.

60. Xiaomin S. Global impact of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae bacteria on "one health" /S. Xiaomin, L. Yiming, [et al.]// *Crit Rev Microbiol.* – 2020. – Vol. 46. – № 5. – P. 565-577.

61. Chiou C. S. Dissemination of *mcr-1*-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant *Salmonella* Strains from Humans and Food-Producing Animals in Taiwan /C. S. Chiou, Y. T. Chen, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – № 7. – P. e00338-17.

62. Xavier B. B. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms /B. B. Xavier, C. Lammens, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2016. – Vol. 71. – № 8. – P. 2342-4.

63. Perreten V. Colistin Resistance Gene *mcr-1* in Avian-Pathogenic *Escherichia coli* in South Africa /V. Perreten, C. Strauss, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – № 7. – P. 4414-5.

64. Meinersmann R. J. Prevalence of *mcr-1* in the Cecal Contents of Food Animals in the United States /R. J. Meinersmann, S. R. Ladely, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – № 2. – P. e02244-16.

65. Rhouma M. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives /M. Rhouma, F. Beaudry, [et al.]// Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 1789.
66. Sato T. Isolation of a mcr-1-harboursing *Escherichia coli* isolate from a human clinical setting in Sapporo, Japan /T. Sato, A. Fukuda, [et al.]// J Glob Antimicrob Resist. – 2018. – Vol. 13. – P. 20-21.
67. Huang H. Colistin-resistance gene mcr in clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae strains in China, 2014-2019 /H. Huang, N. Dong, [et al.]// Emerg Microbes Infect. – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 237-245.
68. Singh S. Emergence of Chromosome-Borne Colistin Resistance Gene mcr-1 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from India /S. Singh, A. Pathak, [et al.]// Antimicrob Agents Chemother. – 2018. – Vol. 62. – № 2. – P. e01885-17.
69. Eiamphungporn W. Prevalence of the colistin resistance gene mcr-1 in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand /W. Eiamphungporn, S. Yainoy, [et al.]// J Glob Antimicrob Resist. – 2018. – Vol. 15. – P. 32-35.
70. Liakopoulos A. The colistin resistance mcr-1 gene is going wild /A. Liakopoulos, D. J. Mevius, [et al.]// J Antimicrob Chemother. – 2016. – Vol. 71. – № 8. – P. 2335-6.
71. Ruzauskas M., Vaskeviciute L. Detection of the mcr-1 gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus* /M. Ruzauskas, L. Vaskeviciute// J Antimicrob Chemother. – 2016. – Vol. 71. – № 8. – P. 2333-4.
72. Xiaomin S. Global impact of mcr-1-positive Enterobacteriaceae bacteria on "one health" /S. Xiaomin, L. Yiming, [et al.]// Crit Rev Microbiol. – 2020. – Vol. 46. – № 5. – P. 565-577.

73. Ageevets V. IncX4 plasmids harbouring mcr-1 genes: Further dissemination /V. Ageevets, I. Lazareva, [et al.]// J Glob Antimicrob Resist. – 2019. – Vol. 18. – P. 166-167.
74. Sulian O. Co-production of MCR-1 and NDM-1 by Escherichia coli sequence type 31 isolated from a newborn in Moscow, Russia / O. Sulian, V. Ageevets, [et al.]// Int J Infect Dis. – 2020. – Vol. 101. – P. 4-5.
75. Xavier B. B. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in Escherichia coli, Belgium, June 2016 /B. B. Xavier, C. Lammens, [et al.]// Euro Surveill. – 2016. – Vol. 21. – № 27.
76. Ling Z. Epidemiology of mobile colistin resistance genes mcr-1 to mcr-9 / Z. Ling, W. Yin, [et al.]// J Antimicrob Chemother. – 2020. – Vol. 75. – № 11. – P. 3087-3095.
77. AbuOun M. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in Moraxella species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015 /M. AbuOun, E. J. Stubberfield, [et al.]// J Antimicrob Chemother. – 2018. – Vol. 73. – № 10. – P. 2904.
78. Al-Kadmy I. M. S. Prevalence of Genes Involved in Colistin Resistance in Acinetobacter baumannii: First Report from Iraq /I. M. S. Al-Kadmy, S. A. Ibrahim, [et al.]// Microb Drug Resist. – 2020. – Vol. 26. – № 6. – P. 616-622.
79. Zhang X. Colistin resistance prevalence in Escherichia coli from domestic animals in intensive breeding farms of Jiangsu Province /X. Zhang, B. Zhang, [et al.]// Int J Food Microbiol. – 2019. – Vol. 291. – P. 87-90.
80. Carretto E. Detection of mcr-4 positive Salmonella enterica serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016 /E. Carretto, F. Brovarone, [et al.]// Euro Surveill. – 2018. – Vol. 23. – № 2. – P. 17-00821.

81. Ma F. Identification of a Novel Plasmid Carrying mcr-4.3 in an *Acinetobacter baumannii* Strain in China /F. Ma, C. Shen, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – Vol. 63. – № 6. – P. e00133-19.

82. Borowiak M. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B /M. Borowiak, J. Fischer, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – Vol. 72. – № 12. – P. 3317-3324.

83. Liakopoulos A. High Prevalence of Intra-Familial Co-colonization by Extended-Spectrum Cephalosporin Resistant Enterobacteriaceae in Preschool Children and Their Parents in Dutch Households /A. Liakopoulos, G. van den Bunt, [et al.]// *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 293.

84. Snesrud E. Chromosomally Encoded mcr-5 in Colistin-Nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* /E. Snesrud, R. Maybank, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62. – № 8. – P. e00679-18.

85. Partridge S. R., Di Pilato V., Doi Y., Feldgarden M., Haft D. H., Klimke W., Kumar-Singh S., Liu J. H., Malhotra-Kumar S., Prasad A., Rossolini G. M., Schwarz S., Shen J., Walsh T., Wang Y., Xavier B. B. Proposal for assignment of allele numbers for mobile colistin resistance (mcr) genes /S. R. Partridge, V. Di Pilato, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – Vol. 73. – № 10. – P. 2625-2630.

86. Yang Y. Q. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae* /Y. Q. Yang, Y. X. Li, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2018. – Vol. 73. – № 7. – P. 1791-1795.

87. Kneis D., Berendonk T. U., Hess S. High prevalence of colistin resistance genes in German municipal wastewater /D. Kneis, T. U. Berendonk, S. Hess// *Sci Total Environ.* – 2019. – Vol. 694. – P. 133454.

88. Wang X. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* /X. Wang, Y. Wang, [et al.]// *Emerg Microbes Infect.* – 2018. – Vol. – № 1. – P. 122.

89. Kyany'a C., Musila L. Colistin Resistance Gene mcr-8 in a High-Risk Sequence Type 15 *Klebsiella pneumoniae* Isolate from Kenya /C. Kyany'a, L. Musila// *Microbiol Resour Announc.* – 2020. – Vol. 9. – № 39. – P. e00783-20.

90. Salloum T. First report of plasmid-mediated colistin resistance mcr-8.1 gene from a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate from Lebanon /T. Salloum, B. Panossian, [et al.]// *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2020. – Vol. 9. – № 1. – P. 94.

91. Carroll L. M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate /L. M. Carroll, A. Gaballa, [et al.]// *MBio.* – 2019. – Vol. 10. – № 3. – P. e00853-19.

92. Li Y. Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene mcr-9 /Y. Li, X. Dai, [et al.]// *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 8113.

93. Wise M. G. Prevalence of mcr-type genes among colistin-resistant *Enterobacteriaceae* collected in 2014-2016 as part of the INFORM global surveillance program /M. G. Wise, M. A. Estabrook, D. F. Sahm, [et al.]// *PLoS One.* – 2018. – Vol.13. – № 4. – P. e0195281.

94. Tarabai H. Plasmid-Mediated mcr-1 Colistin Resistance in *Escherichia coli* from a Black Kite in Russia / H. Tarabai, A. Valcek, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2019. – Vol. 63. – № 9. – P. e01266-19.

95. Шедько Е.Д. Молекулярная эпидемиология генов группы mcr /Е.Д. Шедько, О.Ю. Тимошина, И.С. Азизов// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2020. – Т. 22. – № 4. – С. 287-300.

96. Kuleshov K. V. Mobile Colistin Resistance Genetic Determinants of Non-Typhoid *Salmonella enterica* Isolates from Russia / K. V. Kuleshov, A. S. Pavlova, [et al.]// *Microorganisms*. – 2021. – Vol.9. – № 12. – P. 2515-2528.
97. Сулян О. С. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных /О.С. Сулян, В.А. Агеевец, А.А. Сухинин и др. // *Антибиотики и химиотерапия*. –2021. – Т. 66. – № 11-12. – С. 9-17.
98. Страчунский Л.С. β -лактамазы расширенного спектра - быстро растущая или плохо осознаваемая угроза /Л.С. Страчунский// *Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия*. – 2005. – Т. 7. – № 5. – С. 92-96.
99. Страчунский Л.С. β -лактамазы расширенного спектра /Л.С. Страчунский// *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2005. – Т. 7. – №1. – С. 92-96.
100. Blair J. M. Molecular mechanisms of antibiotic resistance /J. M. Blair, M. A. Webber, [et al.]// *Nat Rev Microbiol*. – 2015. – Vol. 13. – № 1. – P. 42-51.
101. Coque T. M. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe / T. M. Coque, F. Baquero, R. Canton // *Euro Surveill*. – 2008. – Vol.13 Vol. № 47.
102. WHO. World health statistics // Director-General. — Geneva/ WHO, 2014.
103. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014 [Electronic resource] // Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)/ Stockholm, 2014.
104. Sidorenko S. V. The results of a multicenter study of the comparative activity of cefepime and other antibiotics against the causative agents of severe hospital infections (the Micromax program) / S. V. Sidorenko, L. S. Strachunskii, L. I. Akhmedova, [et al.]// *Antibiot Khimioter*. – 1999. – Vol. 44. – № 11. – P. 7-16.

105. Сухорукова М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011–2012 гг. /М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик и др.// Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2014. – Т. 16. – №4. – С. 254 – 265.

106. Gazouli M., A plasmid-mediated beta-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a Salmonella typhimurium clone found in St Petersburg, Russia / M., A Gazouli, S. V. Sidorenko, E. Tzelepi, [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 1998. – Vol. 41. – № 1. – P. 119-21.

107. Carmo L. P., Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing Escherichia coli in meat in Denmark / L. P. Carmo, L. R. Nielsen, P. M. da Costa, L. Alban // Infect Ecol Epidemiol. – 2014. – Vol. 4

108. Geser N., Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk / N. Geser, R. Stephan, H. Hachler // BMC Vet Res. – 2012. – Vol. 8. – P. 21.

109. Smet A., In situ ESBL conjugation from avian to human Escherichia coli during cefotaxime administration / A. Smet, G. Rasschaert, A. Martel, D. Persoons, [et al.]// J Appl Microbiol. – 2011. – Vol. 110. – № 2. – P. 541-9.

110. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance: The National Veterinary Institute (SVA) //Sweden, 2011. – ISSN 1650-6332.

111. Забровская А.В., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., Селиванова Л.В., Малышева, Л.Ю., Антипова Н.А., Борисенкова А.Н., Новикова О.Б. Мониторинг чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов животного происхождения в 2004 – 2010 гг. Материалы XXXXIV

научной конференции Хлопинские чтения «Эколого-гигиенические и клинические проблемы управления здоровьем населения». – СПб. – 2011. – С.115–117.

112. Макавчик С.А. Выявление генов бета-лактамаз в изолятах *klebsiella pneumoniae*, выделенных в рамках ветеринарного мониторинга антибиотикорезистентности /Макавчик С.А., Кротова А.Л., Бочарова Д.В.// Молекулярная диагностика и биобезопасность. – 2023. – С. 107-108.

113. Saliu E. M., Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry/ E. M. Saliu, W. Vahjen, J. Zentek// Anim Health Res Rev. – 2017. – Vol. 18. – № 1. – P. 46-57.

114. Ambler R. P. The structure of beta-lactamases /R. P. Ambler// Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. – 1980. – Vol. 289. – № 1036. – P. 321-31.

115. Bush K., Jacoby G. A. Updated functional classification of beta-lactamases // Antimicrob Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54. – № 3. – P. 969-76.

116. Bush K. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure /K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros // Antimicrob Agents Chemother. – 1995. – Vol. 39. – № 6. – P. 1211-33.

117. Bush K. Characterization of beta-lactamases /K. Bush// Antimicrob Agents Chemother. – 1989. – Vol. 33. – № 3. – P. 259-63.

118. Bush K. The ABCD's of beta-lactamase nomenclature /K. Bush// J Infect Chemother. – 2013. – Vol. 19. – № 4. – P. 549-59.

119. Queenan A. M. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology /A. M. Queenan, B. Foleno, [et al.]// J Clin Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – № 1. – P. 269-75.

120. Эйдельштейн М.В. Э. Бета-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования /М.В. Эйдельштейн// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 3. – С. 223-242.

121. Jean S. S. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: current epidemics, antimicrobial susceptibility and treatment options /S. S. Jean, W. S. Lee, [et al.]// Future Microbiol. – 2015. – Vol. 10. – № 3. – С. 407-25.

122. Страчунский Л.С. β -лактамазы расширенного спектра - быстро растущая или плохо осознаваемая угроза /Л.С. Страчунский// Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2005. – Т. 7. – № 5. – С. 92-96.

123. Агеевец В.А. Первое обнаружение металло-бета-лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре в России / В. А. Агеевец, И. В. Партина, Е. С. Лисицына // Медицинский академический журнал: Официальное издание Северо-Западного отделения РАМН. - 2012. - т. 12, № 4. - С. 43-45

124. Barantsevich E. P. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia /E. P. Barantsevich, I. V. Churkina, N. E. Barantsevich, J. Pelkonen, E. V. Schlyakhto, N. Woodford // J Antimicrob Chemother. – 2013. – Vol. 68. – № 5. – P. 1204-6.

125. Ageevets V. A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V. A. Ageevets, I. V. Partina, E. S. Lisitsyna, [et al.] // Int J Antimicrob Agents. – 2014. – Vol. 44. – № 2. – P. 152-5.

126. Fursova N. K. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia / N. K. Fursova, E. I. Astashkin, A. I. Knyazeva, [et al.] // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2015. – Vol. 14. – P. 46.

127. Ben Yahia H., First Report of KPC-2 and KPC-3-Producing Enterobacteriaceae in Wild Birds in Africa / H. Ben Yahia, S. Chairat, H. Gharsa, C. A. Alonso, [et al.] // *Microb Ecol.* – 2020. – Vol. 79. – № 1. – P. 30-37.

128. Dominguez J. E. Characterization of *Escherichia coli* Carrying *mcr-1*-Plasmids Recovered from Food Animals from Argentina /J. E. Dominguez, D. Faccone, [et al.]// *Front Cell Infect Microbiol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 41.

129. Quan J. Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study /J. Quan, X. Li, [et al.]// *Lancet Infect Dis.* – 2017. – Vol. 17. – № 4. – P. 400-410.

130. Liu Y. Y., Greater Invasion and Persistence of *mcr-1*-Bearing Plasmids in *Escherichia coli* than in *Klebsiella pneumoniae* /Y. Y. Liu, X. Q. Zhu, [et al.]// *Microbiol Spectr.* – 2023. – Vol. 11. – № 2. – P. e0322322.

131. Методические указания МУК 4.12.1890-04 «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»// *Клиническая антимикробная химиотерапия.* – 2004. – Т.6. – №4 –С. 306-359.

132. Rudra B. Phylogenomic and comparative genomic analyses of species of the family Pseudomonadaceae: Proposals for the genera *Halopseudomonas* gen. nov. and *Atopomonas* gen. nov., merger of the genus *Oblitimonas* with the genus *Thiopseudomonas*, and transfer of some misclassified species of the genus *Pseudomonas* into other genera /B. Rudra, R. S. Gupta// *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2021. – Vol. 71. – № 9.

133. Drobish A. M. *Oblitimonas alkaliphila* gen. nov., sp. nov., in the family Pseudomonadaceae, recovered from a historical collection of previously unidentified clinical strains /A. M. Drobish, B. D. Emery, [et al.]// *Int J Syst Evol Microbiol.* – 2016. – Vol. 66. – № 8. – P. 3063-3070.

134. Sano E. Movement of viruses between biomes /E. Sano, S. Carlson, [et al.]// Appl Environ Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – № 10. – P. 5842-6.
135. Rebelo A. R. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes / A. R. Rebelo, V. Bortolaia, J. S. Kjeldgaard, S. K. Pedersen, [et al.] // Euro Surveill. – 2018. – Vol. 23. – № 6.
136. Matamoros S. Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction / Matamoros S., J. M. van Hattem [et al.]// Sci Rep. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 15364.
137. Johnson T. J. Evolution of the iss gene in Escherichia coli /T. J. Johnson, Y. M. Wannemuehler, L. K. Nolan// Appl Environ Microbiol. – 2008. – Vol. 74. – № 8. – P. 2360-9.
138. Elwell C. Escherichia coli CdtB mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest /C. Elwell, K. Chao, [et al.]// Infect Immun. – 2001. – Vol. 69. – № 5. – P. 3418-22.
139. Scott D. A. Cloning and sequencing of the genes encoding Escherichia coli cytolethal distending toxin /D. A. Scott, J. B. Kaper// Infect Immun. – 1994. – Vol. 62. – № 1. – P. 244-51.
140. Nikitin G. Comparative evaluation of methods for determining sensitivity to colistin in E. coli isolates /G. Nikitin, O. Sulyan, A. Sukhinin// Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB). – 2022. – Vol. 36. – № S1. – C. R3112.
141. Johnson T. J. Identification of minimal predictors of avian pathogenic Escherichia coli virulence for use as a rapid diagnostic tool /T. J. Johnson, Y. Wannemuehler, [et al.]// J Clin Microbiol. – 2008. – Vol. 46. – № 12. – P. 3987-96.

142. Soderlund R. Genomic comparison of *Escherichia coli* serotype O103:H2 isolates with and without verotoxin genes: implications for risk assessment of strains commonly found in ruminant reservoirs /R. Soderlund, J. Hurel, [et al.]// *Infect Ecol Epidemiol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 30246.

143. Park J. A waterborne outbreak of multiple diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections associated with drinking water at a school camp /J. Park, J. S. Kim, [et al.]// *Int J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 66. – P. 45-50.

144. Chantziaras I. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries /I. Chantziaras, F. Boyen, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2014. – Vol. 69. – № 3. – P. 827-34.

145. Gibbons J. F. Patterns of antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* isolates from cases of calf enteritis during the spring-calving season /J. F. Gibbons, F. Boland, [et al.]// *Vet Microbiol.* – 2014. – Vol. 170. – № 1-2. – P. 73-80.

146. Мурленков Н.В. Проблемы и факторы развития антибиотикорезистентности в сельском хозяйстве /М.В. Мурленко// *Биология в сельском хозяйстве.* – 2019. – Т. 4. – № 25. – С. 11-14.

147. Sun Y. High prevalence of bla (CTX-M) extended-spectrum beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China /Y. Sun, Z. Zeng, [et al.]// *Clin Microbiol Infect.* – 2010. – Vol. 16. – № 9. – P. 1475-81.

148. Mikhayel M. Occurrence of the Colistin Resistance Gene mcr-1 and Additional Antibiotic Resistance Genes in ESBL/AmpC-Producing *Escherichia coli* from Poultry in Lebanon: A Nationwide Survey /M. Mikhayel, S. O. Leclercq, [et al.]// *Microbiol Spectr.* – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. e0002521.

149. Dame-Korevaar A. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review /A. Dame-Korevaar, E. A. J. Fischer, [et al.]// *Prev Vet Med.* – 2019. – Vol. 162. – p. 136-150.

150. Dandachi I. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli and Emergence of mcr-1 Colistin Resistance Gene in Lebanese Swine Farms /I. Dandachi, E. Fayad, [et al.]// *Microb Drug Resist.* – 2019. – Vol. 25. – № 2. – P. 233-240.

151. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance / A. Carattoli // *Int J Med Microbiol.* – 2013. – Vol. 303. – № 6-7. – P. 298-304.

152. Blanco M. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in Lugo (Spain): dissemination of clone O25b:H4-ST131 producing CTX-M-15 / M. Blanco, M. P. Alonso, M. H. Nicolas-Chanoine, G. Dahbi, [et al.]// *J Antimicrob Chemother.* – 2009. – Vol. 63. – № 6. – P. 1135-41.

153. Агеевец В.А. Распространение генов mcr-типа, кодирующих устойчивость к полимиксинам, в России и мире /В.А. Агеевец, О.С. Сулян, И.В. Лазарева, А.А. Сухинин // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2021. – Т. Т. 66. – № 1-2. – С. 57-64.

154. Skov R. L., Monnet D. L. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds /R. L. Skov, D. L. Monnet// *Euro Surveill.* – 2016. – Vol. 21. – № 9. – C. 30155.

155. Dafopoulou K., Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates /K. Dafopoulou, O. Zarkotou, [et al.]// *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – № 8. – P. 4625-30.

156. Lee S. Y. Comparison of the Vitek 2, MicroScan, and Etest methods with the agar dilution method in assessing colistin susceptibility of bloodstream isolates of

Acinetobacter species from a Korean university hospital / S. Y. Lee, J. H. Shin, [et al.]// J Clin Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – № 6. – P. 1924-6.

157. Moskowitz S. M. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* /S. M. Moskowitz, E. Garber, [et al.]// J Antimicrob Chemother. – 2010. – Vol. 65. – № 7. – P. 1416-23.

158. Lo-Ten-Foe J. R. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains /J. R. Lo-Ten-Foe, A. M. de Smet, [et al.]// Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – Vol. 51. – № 10. – P. 3726-30.

159. Maalej S. M. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against Enterobacteriaceae /S. M. Maalej, M. R. Meziou, [et al.]// Lett Appl Microbiol. – 2011. – Vol. 53. – № 5. – P. 546-51.

160. Сулян О. С. Лабораторные методы детекции колистин-резистентных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae: методические рекомендации / О. С. Сулян, А. А. Сухинин, В. А. Агеевец. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины, 2026. – 14 с.