

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

на правах рукописи

Кузина Екатерина Сергеевна

ИНТЕГРОНЫ КЛАССОВ 1 И 2 В ШТАММАХ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Специальность:

1.5.11. Микробиология

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

Оболенск – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Антибиотикорезистентность грамотрицательных бактерий: клиническая и эпидемиологическая значимость проблемы.....	12
1.2. Вклад интегронов в формирование фенотипов антибиотикорезистентности.....	19
1.3. Происхождение, структура и эволюция интегронов.....	23
1.4. Вклад интегронов в эволюцию антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий.....	33
1.5. Методы выявления интегронов в геномах бактерий.....	46
1.6. Заключение по обзору литературы.....	47
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	49
2.1. Биоэтические требования.....	49
2.2. Микробиологические методы.....	50
2.3. Молекулярно-генетические методы.....	53
2.4. Биоинформатические методы.....	57
2.5. Статистические методы.....	58
ГЛАВА 3 ДЕТЕКЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНТЕГРОНОВ КЛАССОВ 1 И 2 В КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2003-2015 ГГ.....	60
3.1. Фенотипическая и генетическая характеристики изолятов возбудителей госпитальных инфекций.....	60
3.2. Распространенность генных кассет интегронов классов 1 и 2 в изолятах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг.	64
3.3. Новые интегронные структуры, выявленные в ходе исследования.....	68
3.4. Филогенетический анализ генных кассет интегронов классов 1 и 2.....	73
3.5. Разработка лабораторного образца мультиплексной ПЦР тест-системы в режиме реального времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2.....	74
3.6. Заключение по Главе 3.....	80
ГЛАВА 4 ИНТЕГРОНЫ КЛАССОВ 1 И 2 В РЕЗИСТОМАХ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ В 2015 - 2019 ГГ.	81
4.1. Интегроны классов 1 и 2, идентифицированные в штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2015 – 2019 гг.	81
4.2. Носительство генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2019 г.	85
4.3. Носительство множественно лекарственно устойчивых грамотрицательных бактериальных изолятов у пациентов нейрореанимации в 2019 г.	90

4.4. Изучение резистомов клинических изолятов грамотрицательных бактерий группы ESKAPE.....	93
4.5. Изучение геномов <i>K. pneumoniae</i> , несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз <i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{KPC}</i> и <i>bla_{NDM}</i>	97
4.6. Заключение по главе 4.....	112
ГЛАВА 5 РЕЗИСТОМЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ.....	115
5.1. Формирование группы участников исследования.....	115
5.2. Анализ видового разнообразия клинических изолятов бактерий.....	116
5.3. Фенотипы и генотипы изолятов грамотрицательных бактерий.....	120
5.4. Структура интегронов классов 1 и 2, идентифицированных в геномах ГОБ, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории.....	126
5.5. Носительство гипервирулентных <i>K. pneumoniae</i> сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1 у сотрудников микробиологической лаборатории.....	126
5.6. Заключение по главе 5.....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
ВЫВОДЫ.....	135
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ.....	136
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	138
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	139
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	168
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	173
А. Свидетельство о государственной регистрации базы данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий».....	173
Б. Перечень депонированных в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» референс-штаммов грамотрицательных бактерий для детекции генов антибиотикоустойчивости.....	174
В. Номера доступа нуклеотидных последовательностей генов и полных геномных последовательностей, размещенных в базе данных GenBank.....	177
Г. Перечень генных кассет, идентифицированных в интегронах клинических штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2019 гг.	180

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Основным средством борьбы с серьезными инфекциями в настоящее время являются антимикробные препараты. В середине XX в. они сыграли революционную роль, существенно снизив смертность от бактериальных инфекций. Согласно данным, опубликованным в 2019 г. в Отчете об опасности антибиотикорезистентности Центром по контролю и профилактике заболеваний США (англ. Centers for Disease Control – CDC), в США с 2013 г. смертность от инфекций, вызванных бактериальными патогенами, устойчивыми к антимикробным препаратам, снизилась на 18 % в целом и на 30 % в госпитальной среде [49]. Однако, на сегодняшний день, арсенал доступных для лечения инфекций лекарств повсеместно стремительно уменьшается в результате увеличения резистентности возбудителей инфекций к применяемым лекарствам, а также из-за недостаточно быстрой разработки новых антимикробных препаратов [107]. Например, согласно данным, опубликованным Всемирной организацией здравоохранения о клинических и доклинических исследованиях антимикробных препаратов за 2021 г., недавно одобренные препараты имеют ограниченные клинические преимущества по сравнению с уже применяемыми в лечении, поскольку более 80 % из них относятся к существующим функциональным группам, к которым у микроорганизмов выработаны и быстро распространяются механизмы резистентности [44].

Формирование устойчивости к антимикробным препаратам является эволюционным свойством микроорганизмов и неизбежным следствием широкого клинического применения антибиотиков. В разные периоды времени, в зависимости от перечня антибиотиков разных функциональных групп, интенсивно используемых в лечебных учреждениях, в популяциях микроорганизмов возникают и распространяются специфические механизмы резистентности, в том числе механизмы множественной лекарственной устойчивости [217]. Фенотип МЛУ у бактерий формируется в результате аккумуляции генов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам разных функциональных групп [125, 157]. Причиной наблюдаемого повсеместно быстрого распространения таких механизмов является горизонтальный перенос генов, опосредованный мобильными генетическими элементами – плазмидами, транспозонами, IS-элементами, ISCR-элементами и интегронами [150, 187, 190]. Особое место среди них

занимают интегроны, которые представляют собой универсальные «депо», аккумулирующие детерминанты антибиотикорезистентности. Именно интегроны обеспечивают один из важнейших механизмов формирования новых полирезистентных вариантов возбудителей инфекций [154].

Исследования, задачей которых является расширение списка генетических детерминант антибиотикорезистентности, доступных тестированию, проводятся регулярно и основываются на изучении генотипов бактерий, циркулирующих в настоящее время в конкретном регионе [71]. При этом большое значение приобретают не только детекция генов резистентности как таковых, но также выявление и характеристика молекулярных механизмов их эволюции и распространения [158].

Учитывая важную роль интегронов в процессах распространения антибиотикорезистентности, изучение их структуры и анализ представленности в штаммах бактерий, возбудителей инфекций человека, позволяет оценить современную эпидемиологическую ситуацию по распространению антибиотикорезистентности в популяциях бактериальных патогенов, определить молекулярные механизмы природы этой резистентности, прогнозировать дальнейшие эволюционные предпосылки развития антибиотикорезистентности и оптимизировать схемы лечения инфекционных заболеваний [162].

Наиболее распространены интегроны в геномах грамотрицательных бактерий класса Gammaproteobacteria, среди которых у 96 % видов выявлены интегроны класса 1, в том числе у клинически значимых патогенов группы ESKAPE *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. [240]. Поэтому изучение интегронов именно в штаммах грамотрицательных бактерий, вызывающих госпитальные и внегоспитальные инфекции у человека, представляется актуальной проблемой современной медицины и микробиологии [28, 51, 115, 151, 152, 178, 179]. Идентификация широко распространенных в составе интегронов генетических кассет антибиотикорезистентности, а также обнаружение и характеристика новых, не описанных ранее генных кассет, описание молекулярных механизмов эволюции интегронов, их взаимосвязи с другими мобильными генетическими элементами, открывают дополнительные возможности для оценки современной эпидемиологической ситуации по антибиотикорезистентности популяций бактериальных патогенов,

прогнозирования ее развитие в ближайшем и отдаленном будущем, а также оптимизации клинических рекомендаций по антибиотикотерапии инфекционных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Множество опубликованных научных работ посвящены классификации интегронов, их структуре и экспрессии, эпидемиологии и клиническому значению. Поисковый запрос «integron» в базе данных PubMed National Center for Biotechnology Information на дату 03.01.2022 г. дал результат 4186 ссылок, а поисковый запрос «class 1 integron» – 2537 ссылок. Общеизвестно, что именно интегроны класса 1 являются наиболее часто изучаемым механизмом множественной лекарственной устойчивости у клинических изолятов [186]. Изучена структура интегронов, которая включает в себя два консервативных участка (5'-CS и 3'-CS) и вариабельный участок (генные кассеты). Консервативный участок 5'-CS состоит из гена интегразы *intI* с промотором *P_{int}* и первичного сайта рекомбинации *attI*, в который происходит встраивание генных кассет [90, 183]. Генные кассеты представляют собой открытую рамку считывания (ORF) с сайтом рекомбинации кассеты *attC*, способны существовать в виде кольцевых молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и встраиваться в интегрон путем сайт-специфической рекомбинации, катализируемой интегразой [58, 154]. Интегроны локализованы как в хромосомах бактерий, так и на конъюгативных и мобилизуемых плазмидах, которые способны к внутри- и межвидовому распространению между бактериями путем горизонтального переноса [41, 149, 185]. К настоящему времени идентифицировано более 130 видов генных кассет в составе интегронов, кодирующих устойчивость к антимикробным препаратам разных функциональных групп (к бета-лактамам, сульфаниламидам и триметоприму, аминогликозидам, тетрациклинам, фениколам, макролидам, хинолонам и линкозамидам) в геномах бактерий, выделенных в разных регионах мира, как в госпитальной, так и во внегоспитальной среде [15, 84, 90, 182, 230]. Имеются данные о большом вкладе интегронов в резистомы грамотрицательных бактерий, вызывающих инфекции человека в Австралии, Швейцарии, США, Испании, Франции и Ирана [24, 31, 83, 96, 137, 145, 158, 166, 234]. В Российской Федерации интегроны также описаны как важные генетические детерминанты антибиотикорезистентности у клинически значимых патогенов, в том числе *K. pneumoniae* [21, 79], *A. baumannii* [143] и *P. aeruginosa* [3, 39, 192].

Цель исследования:

Оценка распространенности и разнообразия интегронов классов 1 и 2 в геномах мультирезистентных клинических штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2019 гг.

Задачи исследования:

1. Создание рабочей коллекции и электронного каталога мультирезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2019 гг., детекция в их геномах интегронов классов 1 и 2. Характеристика чувствительности изучаемых изолятов к антимикробным препаратам, детекция генов антибиотикорезистентности.
2. Идентификация генных кассет интегронов, оценка их представленности в изучаемых изолятах грамотрицательных бактерий, сравнение с распространенностью интегронных структур, размещенных в международной базе данных GenBank.
3. Анализ представленности интегронов классов 1 и 2 в ходе одномоментных обследований госпитализированных пациентов с проявлениями госпитальных инфекций и без клинических проявлений инфекций.
4. Анализ резистомов грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории.
5. Депонирование референс-штаммов в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», размещение известных и новых генетических кассет в базы данных GenBank и INTEGRALL. Создание базы данных интегронов классов 1 и 2, идентифицированных в геномах клинических штаммов грамотрицательных бактерий.
6. Разработка прототипа тест-системы для детекции интегронных структур в геномах грамотрицательных бактерий.

Научная новизна исследования

Идентифицированы 4 новых интегрона класса 1: In1249 (*dfrA12s-orfF-aadA2*) [GB KT316808]; In1379 (*aadA6Δ3:ISPa21e-gcuD*) [GB KU926353]; In1360 (*gcu87-aadB-aphA15d-aadA1a*) [GB KX218442]; In1375 (*bla_{PBL-1}-aacA4*) [GB KY171972] и 1 новый интегрон класса 2 (*dfrA1Δ3:IS911e-sat1-aadA1*) [GB HM592262].

Описан резистом мультирезистентного изолята *Klebsiella pneumoniae*, выделенного в г. Москва в 2019 г., включающий в себя одновременно интегроны класса 1, ген цефалоспорины *bla_{CTX-M-15}* и гены карбапенемаз трех классов: класса A – *bla_{KPC-2}*, класса B – *bla_{NDM-1}* и класса D – *bla_{OXA-48}*.

У 20 % здоровых сотрудников микробиологической лаборатории описано носительство штаммов грамотрицательных бактерий, несущих интегроны класса 1 (36 % изолятов) и интегронов класса 2 (7 % изолятов), а также генов бета-лактамаз *bla*_{CTX-M} (29 % изолятов), *bla*_{TEM} (21 % изолятов), *bla*_{SHV} (18 % изолятов) и *bla*_{NDM} (8 % изолятов).

Впервые в России описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные данные вносят вклад в понимание роли интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций; вклада носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов.

Созданы: коллекция мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от людей в Российской Федерации в 2003-2020 гг. (n=2065), электронный каталог и база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» (зарегистрирована ФИПС №2020621657 от 31.07.2020 г.) – Федеральный уровень внедрения.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» депонированы 149 референс-штаммов грамотрицательных бактерий, охарактеризованных на наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности (Справки о депонировании 2018-2021 гг.) – Федеральный уровень внедрения.

В базу данных GenBank размещены 220 нуклеотидных последовательностей генов антибиотикорезистентности и 30 полногеномных последовательностей штаммов грамотрицательных бактерий – Международный уровень внедрения.

Разработаны Методические рекомендации «Лабораторный образец ПЦР тест-системы в реальном времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2 у грамотрицательных бактерий», утверждены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 27.04.2021 г., протокол №3, Акт межлабораторных испытаний экспериментальных образцов набора реагентов от 08.06.2022 г. – Учрежденческий уровень внедрения.

Материалы диссертационной работы использованы в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва – Межведомственный уровень внедрения.

Материалы диссертационной работы использованы в учебной Программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы

биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (справка от 06.07.2022 г.) – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению резистомов клинических штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации: их фенотипических и генетических особенностей, связанных с проявлением множественной лекарственной устойчивости. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

1. Резистомы госпитальных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных в разных регионах Российской Федерации в 2003-2019 гг., характеризуются наличием интегронов класса 1 (31 %), интегронов класса 2 (13 %) и генов бета-лактамаз (81 %), что определяет их множественную лекарственную устойчивость; продолжающаяся эволюция интегронных структур подтверждается обнаружением новых интегронов класса 1 и 2.

2. Носительство генов антибиотикорезистентности грамотрицательных патогенов группы ESKAPE выявлено у 78 % пациентов нейрореанимации г. Москвы. Описан уникальный резистом клинического штамма *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23, включающий в себя одновременно гены интегронов класса 1, цефалоспориназы *bla*_{CTX-M-15} и карбапенемаз трех классов: класса A – *bla*_{KPC-2}, класса B – *bla*_{NDM-1} и класса D – *bla*_{OXA-48}, локализованных на трех высокомолекулярных плазмидах групп несовместимости IncHI1B, IncC и IncFIB(pQil)/IncFII(K).

3. Выявлено носительство мультирезистентных грамотрицательных бактерий у здоровых сотрудников микробиологической лаборатории, в том числе несущих интегроны классов 1 и 2 (44 % штаммов), бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) (24 % изолятов), карбапенемаз (15 % изолятов), а также носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках НИР Роспотребнадзора «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» 2015-2020 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 116030310007) и «Молекулярно-генетические механизмы вирулентности и резистентности бактерий к антибактериальным препаратам» 2021-2025 гг. (номер регистрации ЕГИСМ 121022400056-5).

Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами в соответствии с международными рекомендациями. Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 18 Всероссийских и международных конференциях: VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, 30 марта - 1 апреля 2015 г.); XVII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 20-22 мая 2015 г.); Международная научно-практическая конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 25-26 мая 2015 г.); 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Сан-Диего, 17-21 сентября 2015 г.) – постерный доклад; VIII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 28-30 марта 2016 г.) – постерный доклад, отмеченный дипломом победителя II степени в конкурсе молодых ученых; VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Московская обл., Серпуховский район, 1 – 3 ноября, 2016 г.) – устный доклад; IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20 апреля 2017 г.); Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА» (Московская обл., Пущино, 23-27 апреля 2018 г.) – устный доклад; X Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Беларусь, 27-28 сентября 2018 г.); XXI Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва,

22-24 мая 2019 г.) – постерный доклад; Российско-Китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XXII Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург 12-15 июня 2019 г.) – постерный доклад; «V национальный конгресс бактериологов» (Москва, 16–17 сентября 2019 г.); ASM Microbe 2020 (Чикаго, 18-22 июня 2020 г.) – постерный доклад; Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020 г.» (Москва, 6–8 октября 2020 г.); XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 21-22 октября 2020 г.); VI Национальный конгресс бактериологов (Казань, 14-16 сентября 2021 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Екатеринбург, 15-17 сентября 2021 г.) – устный доклад, отмеченный дипломом победителя II степени в конкурсе молодых ученых; Научная конференция «Инфекции у пациентов в отделении реанимации. Лечение и профилактика» (Москва, 25 сентября 2021 г.) – устный доклад.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад автора состоит в поиске источников информации, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, в анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций. Основные теоретические и практические положения диссертационной работы, результаты исследования докладывались автором на международных и Всероссийских научных конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.б.н. Фурсовой Н.К., к.б.н. Кисличкиной А.А., к.м.н. Асташкиным Е.И., Новиковой Т.С. и Фурсовым М.В.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 26 научных работ и изобретений, в том числе 5 статей в международных реферируемых научных журналах, одна База данных и 20 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Антибиотикорезистентность грамотрицательных бактерий: клиническая и эпидемиологическая значимость проблемы

В настоящее время многие методы современной медицины немыслимы без применения антибиотиков: трансплантация, химиотерапия рака, ортопедическая хирургия и другие. Однако, в последние десятилетия, арсенал лекарств, доступных для лечения инфекций, повсеместно стремительно уменьшается в результате прогрессивного увеличения резистентности возбудителей к применяемым лекарствам и недостаточно быстрого появления новых антимикробных препаратов (АП). Пораженность пациентов как минимум одной нозологической формой инфекции, связанной с оказанием медицинской помощи (ИСМП), составляет от 4 % до 12 % [40]. По данным Европейского Центра по контролю и профилактике заболеваний (ЕЦКПЗ, англ. European Centre for Disease Prevention and Control - ECDC), около 4131 тыс. пациентов поражается ежегодно ИСМП в Европе, что составляет 7 % от общего числа госпитализированных пациентов. Сходная распространенность ИСМП отмечена в стационарах России - 8 %. ИСМП занимают 10-е место среди ведущих причин смерти в США. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США (ЦКПЗ, англ. Centers for Disease Control – CDC) около 2 млн американцев ежегодно заражаются госпитальными инфекциями, из которых 99 тыс. со смертельным исходом [26]. Доступные данные об устойчивости к антибиотикам в странах Африки к югу от Сахары ограничены, несмотря на растущую угрозу для общественного здравоохранения во всем мире. По прогнозам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), при сохранении наблюдаемых тенденций к 2050 г., смертность вследствие неэффективности АП превысит показатели смертности от злокачественных новообразований [156] (рисунки 1.1 и 1.2).

В 2014 г. ВОЗ объявила устойчивость к АП глобальной чрезвычайной ситуацией. Наибольшую угрозу представляет группа патогенов ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp./ Enterobacterales*), связанные с трудностями терапии [240].

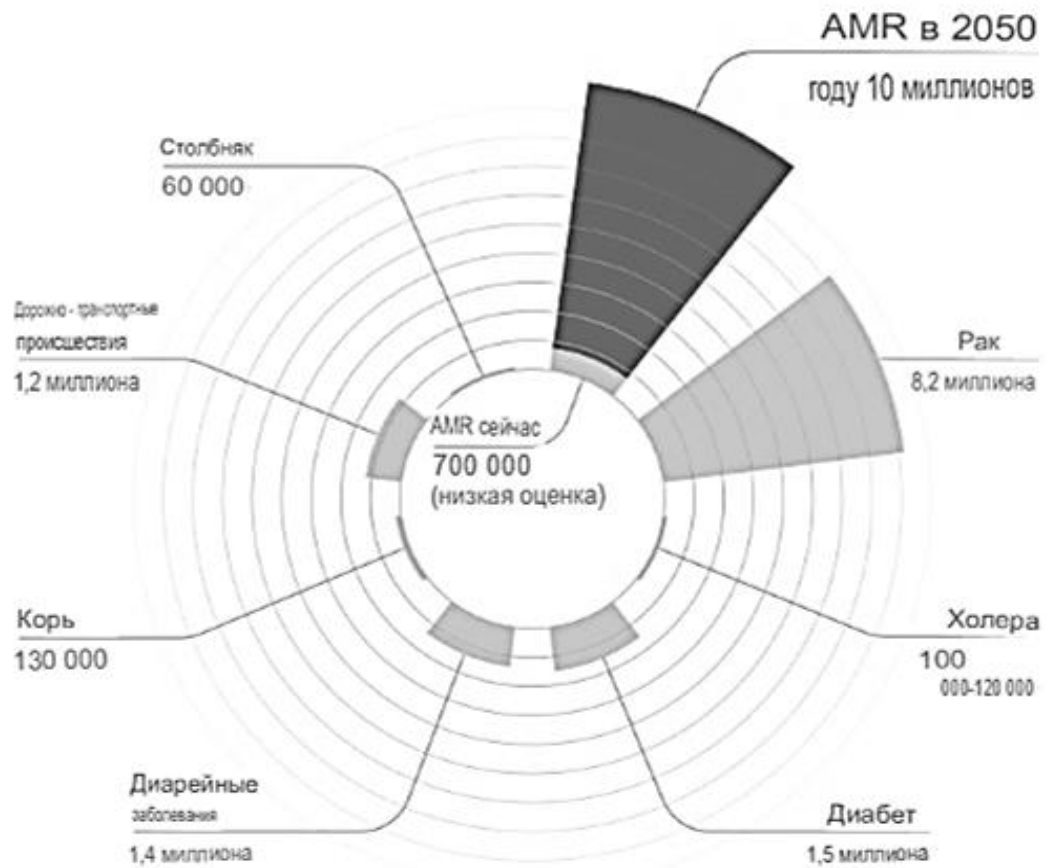


Рисунок 1.1 – Ежегодная смертность от антимикробной резистентности по сравнению с её другими основными причинами [156, с изменениями]

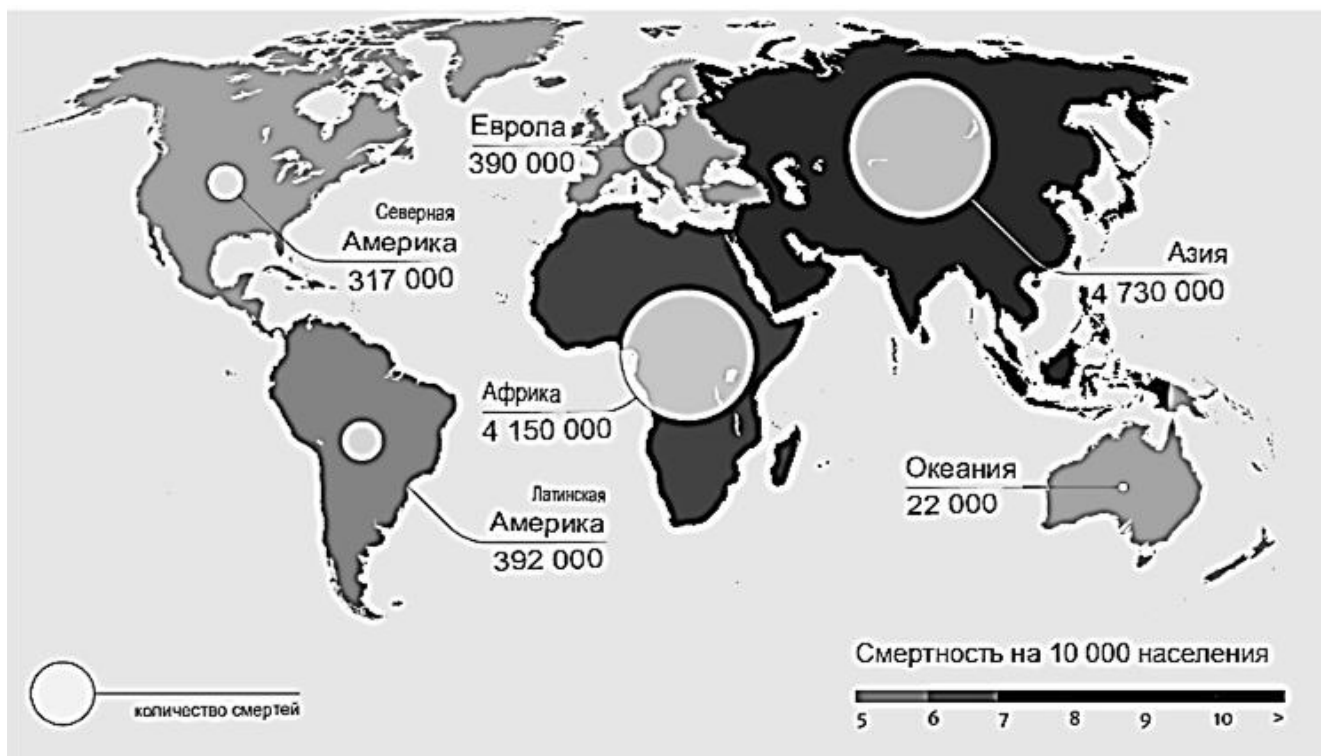


Рисунок 1.2 – Прогноз смертности населения, связанной с распространением антибиотикоустойчивости к 2050 г. [156, с изменениями]

Устойчивые к карбапенемам – препаратам «последней линии» – *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii* считаются «критическими» патогенами, активно циркулирующими в госпитальной среде и распространяющими детерминанты антибиотикорезистентности [8, 42, 47, 158, 210].

По литературным данным, до 30 % внегоспитальных штаммов грамотрицательных бактерий (ГОб), обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), несут интегроны, относящиеся к классу мобильных генетических элементов (МГЭ). Тенденция распространения интегронов может быть пусковым механизмом увеличения доли экстремально резистентных и панрезистентных штаммов [115]. Интегроны распространены не только в геномах бактериальных патогенов человека и животных, но также встречаются в составе геномов природных микроорганизмов в самых разных нишах обитания, включая лесные, пустынные и антарктические почвы, речные, морские отложения и глубоководные отложения, горячие источники, водные биопленки, поверхности растений и др. [66, 88]. Обширное количество исследований направлено на выявление механизмов формирования МЛУ при участии интегронов. Частота встречаемости интегрона класса 1 в изолятах с МЛУ (79 %) и без МЛУ (41 %) выше, чем частота встречаемости интегрона класса 2 в изолятах с МЛУ (13 %) и без МЛУ (18 %) [169].

За последние два десятилетия отмечено, что частота встречаемости интегронов в геномах кишечных бактерий резко возросла, описаны новые генные кассеты, новые сложные структуры генов и сложные геномные острова. Накопление генов устойчивости в интегроны происходит спонтанно или ввиду ответной реакции бактериальной клетки на давление селективных факторов, в том числе антропогенных. Поскольку интегроны способны захватывать несколько генных кассет, отвечающих за устойчивость к различным классам АП, в пределах одного генетического элемента, то использование любого из этих АП может привести к селекции и усилению экспрессии этих детерминант [115]. Более того, интегроны несут детерминанты устойчивости не только к антибиотикам, но и к другим АП – дезинфектантам, антисептикам и тяжелым металлам [206]. Такая коселекция еще больше усложняет ситуацию с множественной резистентностью, может существенно повлиять на систему здравоохранения, поскольку может привести к усложнению лечения инфекционных заболеваний.

Безудержное использование АП на предприятиях по производству продуктов питания животного происхождения и глобализация торговли такими продуктами также значительно способствует передаче МГЭ среди сельскохозяйственных животных и пищевых изолятов *Enterobacterales*. Эти изоляты являются резервуаром для генов устойчивости, опосредованных интегронами, и могут быть ответственны за широкое распространение этих генов среди других бактерий. Кроме того, глобализация торговли продуктами питания усилила межвидовое распространение мобильных элементов устойчивости, что привело к возникновению инфекций с МЛУ почти во всех частях мира. Значительные усилия требуются для быстрого и точного обнаружения интегронов в патогенах с МЛУ-фенотипами с целью внедрения эффективных стратегий контроля за распространением антибиотикорезистентности.

Особенно беспокоит факт быстрого распространения резистентных к АП бактерий по всему миру, что обеспечивается механизмом горизонтального переноса генов, лежащего в основе обмена генетическими детерминантами как внутри, так и между видами бактерий [124]. Однако, необходимо отметить, что распределение устойчивости к грамположительным коккам (устойчивые к метициллину *Staphylococcus aureus* и устойчивые к ванкомицину энтерококки) носит гетерогенный географический характер в то время, как энтеробактерии, продуцирующие БЛРС в сочетании с интегронами, и устойчивые к карбапенему энтеробактерии стали пандемическими во всем мире и эндемичными в некоторых частях мира, соответственно [75]. Существует сильная корреляция между присутствием в геноме интегронов и МЛУ-фенотипами у представителей порядка *Enterobacterales*, независимо от штамма, вида и происхождения. Огромное разнообразие генных кассет, обнаруженных в составе интегронов у представителей порядка *Enterobacterales*, подчеркивает уникальное положение, которое занимает этот таксон в распространении интегронов. Кроме того, увеличение разнообразия генных кассет за последние два десятилетия, указывает на важную роль интегронов в нарастающем распространении антибиотикорезистентности.

Таким образом, интегроны служат серьезным препятствием для использования антибиотиков, и это еще раз подчеркивает необходимость разработки альтернативных терапевтических стратегий, предотвращающих дальнейшую селекцию этих МГЭ. Более того, изучение эпидемиологии интегронов, понимание механизмов их распространения и роли этих мобильных элементов в адаптации бактерий к условиям агрессивной среды

обеспечит основу для разработки более совершенных систем наблюдения для борьбы с бактериями-носителями интегронов в клинических и экологических нишах.

На основании вышеописанного, можно сделать вывод о важности интегронов для распространения генов антибиотикорезистентности среди грамотрицательных бактерий как в госпитальной, так и во внегоспитальной среде [114].

1.1.1. Представленность антибиотикорезистентных возбудителей инфекций в мире

В последние годы интенсивно развивается и особенно актуальна «госпитальная эпидемиология» – эпидемиология заболеваний, обусловленных пребыванием пациента в больнице и вызванных не только патогенными, но и условно-патогенными микроорганизмами, госпитальными штаммами микроорганизмов, распространение которых принципиально отличается от распространения традиционных инфекций. Стратегической задачей здравоохранения является обеспечение качества медицинской помощи и создание безопасной больничной среды. В силу широкого распространения негативных последствий для здоровья пациентов, персонала и экономики государства, ИСМП являются важнейшей проблемой здравоохранения. ИСМП поражают 5–10 % пациентов, находящихся в стационарах, и занимают шестое место в ряду причин смертности населения [126]. В зависимости от действия различных факторов, частота возникновения ИСМП колеблется в разных категориях пациентов: особенно уязвимы новорожденные, пожилые люди, пациенты с тяжелым течением основной патологии и множественными сопутствующими заболеваниями, пациенты, подвергающиеся агрессивным и инвазивным медицинским манипуляциям, трансплантации органов и т. п. В этих группах показатели заболеваемости ИСМП значительно выше. Пациенты с ИСМП находятся в стационаре в 2–3 раза дольше, чем аналогичные пациенты без признаков инфекции. В среднем на 10 дней задерживается их выписка, в 3–4 раза возрастает стоимость лечения, и в 5–7 раз – риск летального исхода [10]. Экономический ущерб, причиняемый ИСМП, значителен: в Российской Федерации эта цифра, по самым скромным подсчетам, может достигать 300 млрд руб. в год (для сравнения – ежегодный экономический ущерб от ИСМП в Европе составляет примерно в 7 млрд евро, в США – 6,5 млрд долларов) [7]. ИСМП существенно снижают качество жизни пациента, приводят к потере репутации учреждения здравоохранения [227].

По результатам анализа данных по 70 странам, опубликованных в сообщении ВОЗ в июне 2021 г., установлено, что на территории обозреваемых стран широко

распространены патогены, вызывающие ИСМП и устойчивые к ко-тримоксазолу (около 50 %) - препарату первого ряда. Не менее тревожным является факт обнаружения высоких показателей устойчивости к ципрофлоксацину при ИСМП, вызванных *E. coli* (медиана 36 % [IQR 24,65-49,04]) и *K. pneumoniae* (медиана показатель, 31 % [IQR 19,69-47-36]), наиболее распространенных патогенов, вызывающих ИСМП. Ципрофлоксацин относится к антибиотикам категории "Watch" по классификации AWaRe и не должен быть антибиотиком первой линии для лечения ИСМП [228, 229]. Таким образом, в связи с бесконтрольным порядком назначения и использования АП, распространенность МЛУ-патогенов стремительно растет [231]. В разных странах распространенность МЛУ изолятов *P. aeruginosa* варьирует от 14 до 30 %, причем устойчивость к карбапенемам среди них встречается в 15-22 % случаев [151, 187]. Например, доля множественноустойчивых бактерий вида *P. aeruginosa* за последнее десятилетие увеличилась на 30 % в странах Восточной Европы [187]. Также критической угрозой для глобального здравоохранения является устойчивость *Acinetobacter baumannii* к АП с МЛУ [101]. В последние десятилетия все чаще сообщалось о вспышках МЛУ-инфекций, вызванных *A. baumannii*, ВОЗ призвала к разработке новых антибиотиков для этого высокоприоритетного патогена [23, 135, 136, 176]. В 2019 г. ВОЗ объявила возрастающую антимикробную резистентность одной из 10 главных глобальных угроз общественному здравоохранению, стоящих перед человечеством в 2019 г. В свою общую программу работы в период с 2019 по 2023 гг. ВОЗ добавила такое направление, как изучение тенденции потребления антибиотиков, обозначив его наиболее приоритетным [228, 229].

Следовательно, изучение распространенности антибиотикорезистентных возбудителей по всему миру становится критически важным направлением и требует сосредоточения на открытии новых АП, активных в отношении ГОБ [210].

1.1.2. Представленность клинически значимых антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий в Российской Федерации

В России, по данным официальной статистики, в последнее десятилетие ежегодно регистрируется примерно 26 тыс. случаев ИСМП (~0,7 на 1000 пациентов), однако достоверные и полные статистические данные о социальном и экономическом бремени, причиняемом ИСМП государству и населению страны, отсутствуют. Около 20 % всех ИСМП приходится на пациентов, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), они могут быть как основной причиной госпитализации

пациентов, так и осложнять течение других заболеваний [4]. В 2018 г., по сравнению с предыдущим 2017 г., отмечено увеличение количества зарегистрированных случаев ИСМП на 18 % (в 2017 г. – 22 963, в 2018 г. – 27 071 случай), что может свидетельствовать о повышении внимания к данной проблеме и некотором улучшении регистрации случаев ИСМП в медицинских организациях [1, 2]. Данные о представленности клинически значимых антибиотикорезистентных бактерий в Российской Федерации соотносятся с общемировыми и свидетельствуют о том, что приведенный ВОЗ в феврале 2017 г. «Список приоритетных патогенов для исследований и разработок новых антибиотиков» актуален и для сложившейся ситуации в нашей стране. В этот список вошли 12 видов бактерий, в том числе представители порядка *Enterobacterales*, карбапенемрезистентные *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Согласно опубликованным данным, отражающим статистику возникновения ИСМП в стационарах России, ведущая роль в возникновении ИСМП принадлежит грамотрицательным условнопатогенным энтеробактериям (в том числе *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и ряду других) [9, 13, 17, 79, 80]. Госпитальные штаммы указанных микроорганизмов, как правило, обладают МЛУ-фенотипами: по данным российских исследователей в научной статье 2017 г. об устойчивости ГОБ, МЛУ-фенотипом обладали 82 % госпитальных изолятов *Enterobacterales*, 64 % – *A. baumannii* и 51 % – *P. aeruginosa* [9, 13]. В другом российском исследовании, проведенном в 2004-2006 гг., среди МЛУ-патогенов, возбудителей вентилятор-ассоциированной пневмонии в ОРИТ, доминировали *K. pneumoniae* (19 %), *P. aeruginosa* (15 %) и *Acinetobacter* spp. (12 %) [9, 16]. Несмотря на то, что в России наблюдаются тенденции снижения уровня устойчивых к карбапенемам изолятов *K. pneumoniae* и *A. baumannii* в отделении ОРИТ, тем не менее, частота обнаружения устойчивых к карбапенемам *P. aeruginosa* остается на значительном уровне [12, 70, 72]. Однако, структура популяции *P. aeruginosa*, а также механизмы устойчивости к карбапенемам, недостаточно хорошо документированы. Обладая пластичным геномом, *P. aeruginosa*, как и *A. baumannii*, способны приобретать и интегрировать новые детерминанты резистентности, в частности, карбапенемазы, приобретая МЛУ-фенотип и становясь векторами диссеминации устойчивости к карбапенемам не только на уровне вида, но и между видами [170]. Главным механизмом резистентности к карбапенемам является продукция ферментов, гидролизующих антибиотики, таких как карбапенемазы [164]. В распространении устойчивости к карбапенемам важную роль играют

неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОВ) *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Наряду с представителями порядка *Enterobacterales*, они приобрели важное значение в структуре ИСМП. Природная устойчивость данных микроорганизмов ко многим классам антибиотиков объясняет трудности лечения инфекций, ассоциированных с ними, и обуславливает необходимость использования карбапенемов и их комбинаций с другими антибиотиками широкого спектра действия. Это объясняет пристальное внимание к представителям *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. как микробиологов, так и специалистов в области эпидемиологии. ИСМП и проблема рациональной антимикробной терапии инфекционных осложнений приобрели особую значимость и актуальность в современной медицине. Потому изучение молекулярной эпидемиологии, в особенности ее механизмов, является актуальным направлением в настоящее время во всем мире и особенно в развивающихся странах, а также в Российской Федерации.

Таким образом, необходимо отметить, что представленность клинически значимых антибиотикорезистентных ГОВ в госпиталях и стационарах Российской Федерации соотносится с описанной распространенностью ИСМП в других странах мира, а значит, внедрение более тщательного и повсеместного эпидемиологического надзора является важнейшей задачей в здравоохранении РФ.

1.2. Вклад интегров в формирование фенотипов антибиотикорезистентности

Интегроны известны своей ролью в распространении генных кассет устойчивости к АП, внося, тем самым, значительный вклад в глобальный кризис лекарственной резистентности [84]. Поскольку интегроны захватывают несколько генов резистентности, обуславливающих устойчивость к различным классам АП, в пределах одного мобильного генетического элемента, то вклад в формирование МЛУ-генотипов достаточно велик [115]. Тем самым, посредством интегров, обеспечивается геномная пластичность и адаптация микроорганизмов к условиям окружающей среды, а именно: содержание и расположение генных кассет в интегоне может быть изменено активностью интегразы, часто индуцируемой под действием стресса, вызванного факторами внешних условий среды [46, 73, 97].

Интегроны могут быть подразделены на две большие категории: мобильные интегроны – несущие несколько кассет антибиотикорезистентности и мобилизуемые транспозонами или плазмидами; и «суперинтегроны» - несущие сотни кассет и локализованные в хромосомах. В первую категорию входят интегроны пяти известных

классов интеграз, которые часто встроены в другие МГЭ – транспозоны и геномные острова. Эти интегроны, особенно интегроны класса 1, имеют клиническое значение. Часто они содержат несколько кассет устойчивости к АП. Считается, что источником интегронов класса 1 были хромосомы бета-протеобактерий, мобилизованные в начале 20 века [83, 89]. С тех пор производные этих интегронов распространились более чем среди 70 видов клинически важных бактерий и приобрели более чем 130 различных генов резистентности, которые придают устойчивость к большинству классов антибиотиков [87, 157]. Интегроны класса 1 были обнаружены на всех континентах, включая Антарктиду, и повсеместно распространены в микробиомах человека и сельскохозяйственных животных [87, 243]. Такая успешная колонизация означает, что до 10^{23} копий интегронов класса 1 ежедневно выбрасывается в окружающую среду [243]. Интегроны класса 1, наряду с другими четырьмя классами, включают в себя почти все кассеты генов устойчивости к антибиотикам, которые можно обнаружить в бактериальных геномах [60]. Следовательно, их успех в значительной степени был обусловлен влиянием присутствия АП в их среде окружения. Мобильные интегроны значительно отличаются от «суперинтегронов», которые включают в себя гораздо большее число генных кассет антибиотикорезистентности, устойчивости к тяжелым металлам, генов токсинов и др. [20, 78, 186].

Поиск и использование новых АП неизбежно приведет к эволюции и распространению новых генов устойчивости среди патогенных бактерий. Интегроны, скорее всего, будут играть значимую роль в их распространении. Своевременное же изучение происхождения наиболее клинически значимых детерминант устойчивости может позволить отследить потенциальные «горячие точки» для появления следующего поколения генов резистентности и создать механизмы, предотвращающие их распространение, прежде чем они попадут в клинические условия [84].

Таким образом, вклад интегронов в формирование МЛУ-фенотипов объясняется их способностью захватывать несколько генов резистентности, обуславливающих устойчивость к различным классам АП, в пределах одного МГЭ.

1.2.1. Интегроны в геномах возбудителей нозокомиальных инфекций

Среди пяти классов интегронов клиническое значение имеют первые три [141]. Интегроны класса 1 являются наиболее распространенным классом среди энтеробактерий, включая патогены родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*,

Yersinia, *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia* и др. [91, 242]. В варибельной части структуры интегронов класса 1 встречаются более 70 различных типов генных кассет, придающих устойчивость к большинству известных АП: бета-лактамов, аминогликозидов, триметоприму, рифампицину, хлорамфениколу, хинолонам, эритромицину и четвертичным аммониевым соединениям [84].

Интегроны класса 2, в отличие от интегронов класса 1, обладают меньшим разнообразием генных кассет в варибельной части. В интегронах класса 2 обычно представлены гены, обеспечивающие устойчивость к триметоприму (*dfrA1*), стрептотрицину (*sat2*) и стрептомицину (*aadA1*). Также, в отличие от интегронов класса 1, интегроны класса 2 менее распространены среди представителей порядка *Enterobacterales* [91].

Интегроны класса 3, хотя и наименее распространены, быстро эволюционируют, колонизируют новые виды бактерий и приобретают новые генные кассеты устойчивости [88]. Они были описаны у *Serratia*, *Klebsiella*, *Escherichia* и в изолятах *Enterobacter*, выделенных из окружающей среды; а недавно - у представителей рода *Citrobacter*. Было установлено, что большинство интегронов класса 3 включают в себя кассеты генов устойчивости к бета-лактамам и аминогликозидам [115]. Кроме того, наблюдается эволюция мобильных генетических элементов, несущих интегроны класса 3, и их нарастающее распространение среди представителей ГОБ.

1.2.2. Интегроны и гены антибиотикорезистентности в резистомах грамотрицательных бактерий

«Резистом» – термин, предложенный Джерардом Райтом для описания совокупности генов антибиотикоустойчивости и их предшественников у микроорганизмов [230]. Гены антибиотикоустойчивости могут присутствовать в фекальной флоре людей и животных [94, 132, 200, 225]. Носительство таких генов связано не только с госпитализацией и лечением антибиотиками: желудочно-кишечный тракт человека и даже животных, является основным источником бактериальных видов-продуцентов генов устойчивости, а также служит резервуаром их горизонтального переноса [95, 121, 130, 144, 216, 225]. Поэтому чрезвычайно актуальным является изучение механизмов распространения генов антибиотикорезистентности среди представителей кишечной микробиоты: неоднократно было показано, что распространению МЛУ способствуют интегроны [131, 146, 202, 233].

Продолжительность носительства может быть очень длительной, в некоторых случаях – до нескольких лет, а процессы глобализации способствуют еще более эффективному распространению генов устойчивости [129, 216]. Уровень носительства и, следовательно, риск колонизации у путешественников, возвращающихся домой, наиболее высок в Юго-Восточной Азии и достигает 69 % [132, 216]. Северная Африка и Восточное Средиземноморье также ассоциируются с более высоким риском носительства у путешественников [129]. В последнее десятилетие был опубликован ряд исследований, посвященных фекальному носительству в различных популяциях (как среди пациентов, так и среди здоровых людей) [68]. Подчеркивается важность носительства как в больничных, так и во внегоспитальных условиях. Носители могут служить источниками эндогенных инфекций или вспышек и выступать в качестве резервуаров генов резистентности. Опубликованные данные ряда исследований показали значительные различия между динамикой носительства генов резистентности у здоровых людей и у людей с историей госпитализации, обращающихся за долгосрочным уходом [52, 77, 109, 118]. Паттерны носительства интегров различались между видами, а также между группами пациентов: *K. pneumoniae* переносила интегроны чаще, чем *E. coli*. Содержащие интегроны изоляты, колонизирующие взрослых, детектировались чаще, по сравнению с изолятами, выделенными от детей [67, 68]. Неоднократно отмечалось наличие генов интеграз у *A. baumannii* в сочетании с генами БЛРС, а также у карбапенем-резистентных *P. aeruginosa* [53, 55, 106, 110, 169, 195, 208]. Примечательно, что в литературе все чаще встречается описание возникновения новых вариантов интегров, особенно в геномах представителей вида *P. aeruginosa*, что может свидетельствовать об активной эволюции интегронных структур в этих бактериях [3, 39]. Более того, распространение интегров не ограничивается только патогенными организмами: описано, что они детектируются в геномах бактерий, полученных из образцов окружающей среды и здоровых животных [161].

Наиболее часто в публикациях освещается неизбирательное применение АП в сельскохозяйственной промышленности, как причина роста антибиотикорезистентности. Потребление АП сельскохозяйственными животными способствует распространению МЛУ из-за селективного давления антибиотиков, вызванного присутствием высоких концентраций антибиотиков в окружающей среде. Это селективное давление, в конечном итоге, приводит к увеличению распространенности устойчивости к АП через

приобретенные гены антибиотикоустойчивости и МГЭ [111, 120, 159]. В частности, носительство антибиотикорезистентных патогенов «пищевого происхождения» сельскохозяйственными животными является одним из многих факторов, способствующим распространению МЛУ и неудачам лечения в медицинских учреждениях. Это указывает на необходимость детального и тщательного исследования носительства таких антибиотикорезистентных патогенов, несущих интегроны, среди сельскохозяйственных животных [35, 59, 74, 115, 120]. Ген интегразы *intI1* был предложен в качестве косвенного показателя для общего наблюдения за распространением генов антибиотикоустойчивости в клинических условиях, популяциях скота и окружающей среды [33, 37, 82, 87, 128]. Известные и новые кассеты генов, связанные с устойчивостью к АП, все чаще встречаются в составе геномов микроорганизмов, выделенных из окружающей среды [66]. Мониторинг распространенности *intI1* предоставляет дополнительную информацию о потенциале передачи множества признаков антибиотикорезистентности, дополняя наблюдение за устойчивостью к конкретным классам противомикробных препаратов.

1.3. Происхождение, структура и эволюция интегров

Интегроны – природные системы экспрессии и клонирования генов антибиотикорезистентности, широко распространенные в геномах бактерий. Они играют важную роль в мобилизации, экспрессии и распространении генов антибиотикорезистентности, в частности – у грамотрицательных патогенов. Впервые интегроны были описаны в литературе Stokes и Hall в 1989 г. [205]. Интегроны имеют длительную эволюционную историю, они встречаются в разнообразных экологических нишах, несут большое количество новых генов с невыясненными функциями. В последние 10 лет накапливаются сведения о том, что интегроны играют большую роль не только в распространении антибиотикорезистентности, но также в бактериальной адаптации и эволюции геномов [84]. Обнаружение интегров в древних бактериях показывает, что они существуют, по крайней мере, сотни миллионов лет и распространились между разными таксонами, несмотря на то, что некоторые интегроны распространяются только «вертикально».

Первые хромосомные интегроны описаны у *Vibrio cholerae*. Они несут сотни генных кассет, кодирующих множество белков с неизвестными функциями, и составляют

около 1-3 % от всего генома. Исследования последних 15 лет показывают, что наличие хромосомных интегров характерно для бактерий окружающей среды, в то время как «клинические» интегроны, типичные для патогенов, локализуются на плазмидах. Около 17 % бактериальных геномов, размещённых в базе данных National Center for Biotechnology Information (NCBI) содержат гены интеграз. Хромосомные интегроны наиболее часто обнаруживаются у разных классов *Proteobacteria*, а также у *Cyanobacteria* и *Spirochaetes*. Хромосомные интегроны также присутствуют у *Pseudomonas*, число кассет у них составляет от 10 до 32. У некоторых видов свободноживущих в окружающей среде бактерий (*Shewanella*, *Oceanobacter* и др.) найдены интегроны с небольшим количеством кассет или вообще без кассет. Хромосомные интегроны являются источником геномного разнообразия, которое может быть использовано для филогенетического типирования штаммов. Разнообразие достигается путем интенсивных перестановок, так у *Vibrio* spp. только 1-10 % кассет идентичны.

Все интегроны имеют три основные структурные единицы, которые обеспечивают мобилизацию и экспрессию экзогенных генов в виде генных кассет. Первой структурной единицей является ген *intI*, кодирующий интегразу (IntI), относящуюся к семейству ферментов - тирозиновых рекомбиназ. Ген интегразы в хромосомных генах может быть направлен как в том же направлении, что генные кассеты, так и в противоположном. Интеграза катализирует рекомбинацию между входящей генной кассетой и рекомбинационным сайтом интегрона *attI*. Генная кассета имеет достаточно простую структуру, состоящую из единой открытой рамки считывания и заканчивающуюся так называемым 59-base элементом или *attC* сайтом. Кольцевые генные кассеты встраиваются в интегрон путём сайт-специфической рекомбинации между *attI* и *attC*. Этот процесс обратим, и кассеты могут быть исключены из состава интегрона [155] (рисунок 1.3).

Таким образом, интегронные структуры обладают двумя важными свойствами для обогащения бактериального генома. Во-первых, новый генетический материал интегрируется в бактериальный геном, во-вторых, новые интегрированные гены экспрессируются с сильного интегронного промотора.

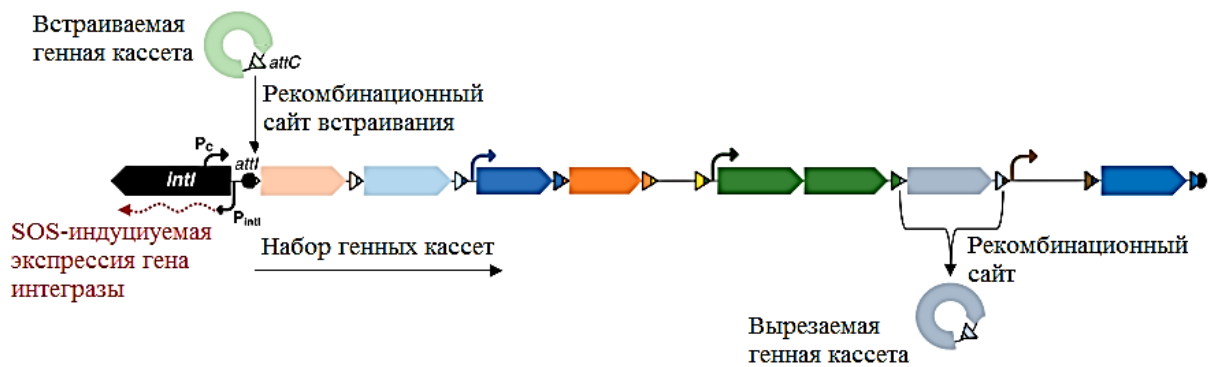


Рисунок 1.3 – Схематичное изображение структуры интегров: ген интегразы (*intI*), специфический сайт рекомбинации (*attI*) и промотор (P_c), позволяющий экспрессировать генные кассеты, специфический сайт рекомбинации, связанный с генной кассетой (*attC*) [84, с изменениями]

Наличие интегров в геноме и их экспрессия сопряжены с дополнительной нагрузкой на биохимический статус бактериальной клетки, что может быть отягощено её большими энергетическими затратами (fitness coast). Это может объяснять почему почти треть генов интегров инактивированы и почему генетические кассеты утрачиваются [213].

Мобильные интегроны и суперинтегроны имеют идентичную структурную организацию, и древность суперинтегров позволяет предположить, что они могут быть предшественниками мобильных интегров. Эти взаимосвязи лежат в основе предположения, что мобильные интегроны произошли от суперинтегров путем провокации *intI* генов и родственных им *attI* сайтов мобильными элементами, которые легко и часто входят в состав транспозонов. Отмечено, что 12 различных кассет резистентности несут сайт *attC*, практически идентичный сайтам *attC*, локализованным в суперинтегронах видов *Xanthomonas* и *Vibrio* [22, 84]. Можно предположить, что проведенная однажды мобилизация при последующем сборе кассет из разных суперинтегров ведет к созданию современных мобильных интегров, что отражено в разнообразии *attC* сайтов, ассоциированных с генными кассетами мобильных интегров [84]. Предположение о том, что мобильные интегроны произошли из суперинтегров, было недавно подтверждено в двух исследованиях. Первое было посвящено изучению плазмид, ассоциированных с устойчивостью к триметоприму у *Vibrio salmonicida*. Sorum с соавторами установили, что устойчивость к триметоприму обеспечивается генной кассетой *dfrA1*, ассоциированной с новым интегронным классом (соответственно его *intI* гену). Генная кассета *dfrA1*, обычно обнаруживаемая в мобильных интегронах как

первого, так и второго классов, располагается во второй позиции среди восьми кассет суперинтегрона *V. salmonicida*. Этот новый класс интегронов имеет две особенности, совместимых с нашей эволюционной моделью. Во-первых, ген интегразы точно происходит из видов *Vibrio* или близко родственных видов — ген на 74 % идентичен генам, кодирующим интегразы интегронов *V. cholerae* и *Vibrio mimicus*. Во-вторых, *attC* сайты трех из семи других кассет структурно подобны, что ранее казалось характерным только для последовательности генных кассет суперинтегронов. Поскольку этот интегрон находится в тесном соседстве с инсерционными последовательностями, можно предположить, что этот элемент соответствует промежуточной структуре в эволюции мобильных интегронов, описанной для геномов клинических изолятов. Создание мобильного интегрона, обеспечивающего фенотип множественной антибиотикорезистентности организму хозяина, может быть достигнуто путем захвата дополнительных кассет резистентности, имеющих преимущество мобильности сложного транспозона, и множественными событиями переноса [22, 203].

Вторая часть доказательств в поддержку гипотезы состоит в том, что показано, что мобильный интегрон может непосредственно захватывать генные кассеты суперинтегрона и получать фенотип антибиотикорезистентности. Показано, что процесс захвата генных кассет суперинтегрона является частым явлением. Изучена новая генная кассета хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*catB9*) в суперинтегрене *V. cholerae* при использовании селективного давления для проявления антибиотикорезистентности. Учитывая предварительные результаты, показавшие, что генные кассеты суперинтегрона являются субстратом для интеграз интегронов 1 класса, когда присутствуют на высококопийной плазмиде, эти результаты показывают, что окружающая среда, включая присутствие антибиотиков, определяют частоту захвата кассет, осуществляемую мобильными интегронами клинических изолятов [210]. Вероятно также, что сборка сложных мобильных интегронов (мобильных интегронов, несущих более чем две кассеты резистентности) осуществляется путем рекомбинации между различными мобильными интегронами скорее, чем в результате последовательных событий захвата из последовательностей генных кассет в суперинтегронах различных видов из окружающей среды. Существуют экологические ниши, которые могут способствовать высокому уровню обмена кассетами между различными мобильными интегронами. Охарактеризована коллекция генных кассет, интегронов и плазмид, циркулирующих в

отдельном растении из сточных вод [140]; недавно стало известно, что аэробная грамположительная коринебактерия, выделенная из подстилки домашней птицы, может выступать в качестве резервуара мобильных интегронов класса 1, что показывает существование условий окружающей среды, отличающихся от явных клинических помещений, в которых обмен генными кассетами между мобильными нтегронами может быть обычным процессом [230].

Посредством сайт-специфической эксцизии и интеграции экзогенные гены (особенно гены лекарственной устойчивости) могут быть интегрированы в платформу интегрона. В настоящее время отмечено более 80 типов генных кассет, обычно включающих *aad*, *aac*, *dfr*, *oxa*, *cat*, *aar*, *ere*, *sat*, *qnr* и *str*, которые опосредуют устойчивость к аминогликозидам, сульфаниламидам, бета-лактамам, хлорамфениколу, рифампицину, эритромицину, стрептотрицину, хинолонам и стрептомициновым антибиотикам [237].

Пять классов мобильных интегронов были исторически определены на основании последовательностей, кодирующих интегразы, которые демонстрируют 40–58 % идентичности. Все пять классов физически связаны с мобильными генетическими элементами, такими как инсерционные последовательности (ISs), транспозоны и конъюгативные плазмиды, все из которых могут служить транспортным средством для внутривидового и межвидового переноса генетического материала. Три класса мобильных интегронов являются «историческими» классами, которые вовлечены в формирование фенотипа множественной резистентности [38]. Интегроны класса 1 ассоциированы с функционирующими и нефункционирующими транспозонами, происходящими от Tn402, который может быть вставлен в большие транспозоны, такие как Tn21. Интегроны класса 2 в основном ассоциированы с производными Tn7, а интегроны класса 3 предпочтительно локализованы в транспозоне Tn12, встроенном в до сих пор неохарактеризованные плазмиды [160, 184]. Другие два класса мобильных интегронов, классы 4 и 5, были идентифицированы по их вовлеченности в формирование резистентности к триметоприму у видов рода *Vibrio*; интегроны 4 класса являются компонентом подмножества SXT-элементов или констинов (от англ. **con**jugative, **s**elf-**tr**ansmissible, **i**ntegrating), маркером которых является ген *ints_{SXT}* интегразы, обеспечивающий интеграцию этих элементов в хромосому, обнаруженных у *V. cholera*, а

интегроны 5 класса локализован на сложном транспозоне в составе плазмиды *V. salmonicida* [64].

Полногеномное секвенирование показало, что интегроны содержатся в 50 % геномов бактерий, принадлежащих самым разнообразным экологическим нишам: от вод горячих источников до антарктических почв. Все обнаруженные к настоящему времени интегроны подразделяются на три большие группы на основании филогенетического родства генов интеграз: (1) группа интегронов протеобактерий, выделяемых из чистой воды и почвенных образцов, включающая клинически важные интегроны класса 1 и класса 3; (2) группа интегронов гаммапротеобактерий из морских источников, включающая интегроны класса 2 и SXT-конъюгативные элементы из рода *Vibrio*; (3) интегроны, в которых ген интегразы расположен в том же направлении, что и генные кассеты [64].

1.3.1. Интегразы классов 1, 2 и 3

Интегроны класса 1 широко распространены в клинических изолятах, и большинство известных генных кассет антибиотикорезистентности принадлежат к этому классу. К настоящему времени, учитывая только те кассеты, которые отличаются по нуклеотидным последовательностям более чем на 5 %, описано около 130 различных генных кассет из интегронов класса 1. Было показано, что *IntI1* может рекомбинировать разнообразные *attC* сайты. Интегразы IntI принадлежат к каталитическому семейству тирозиновых рекомбиназ, которые участвуют в горизонтальном перемещении большого числа фагов (включая интегразу фага λ , λ Int) и в фундаментальных клеточных процессах, таких как демонтаж хромосомных димеров во время клеточного деления. В отличие от других членов семейства тирозиновых рекомбиназ, IntI интегразы могут рекомбинировать нуклеотидные последовательности с низким уровнем подобия. Десятилетие назад был введен новый термин – комплексный интегрон *sul1*-типа – для описания больших генетических элементов, ассоциированных с разными интегронами класса 1, имеющими *orf513*. Это ген, кодирующий транспозазу, принадлежащую к семейству IS91, которая участвует в захвате новых генов резистентности, она обнаружена у *Salmonella enterica* серовара Newport. Название «комплексный интегрон» является неудачным, так как можно предположить, что эти элементы являются новым видом интегронов, с отличной структурой и механизмом действия, тогда как на самом деле это

не так; новое в характере захвата генов этими структурами связано исключительно с активностью *orf513* [25].

Интегроны класса 2 обладают тем же пулом кассет, что и интегроны класса 1, но отличны по структуре гена интегразы. Они также имеют близкую эволюционную историю – происхождение от транспозона Tn402, поскольку, как интегроны класса 1, так и интегроны класса 2, были мобилизованы транспозабельными элементами из хромосомного предшественника. Интегроны класса 2 ассоциированы с транспозоном Tn7, который обладает транспозиционной активностью, направленной на специфические сайты хромосом или плазмид. Все интегроны класса 2 имеют одинаковую внутреннюю мутацию в гене интегразы *Int2*, что говорит об их происхождении от общего предшественника. Ген интегразы клинических интегронов класса 2 инактивирован, поэтому они не способны интегрировать новые кассеты. Редукция в разнообразии генных кассет, возможно, отражает факт, что ген, кодирующий интегразу класса 2 в составе интегрона, содержит точечную мутацию в кодоне 179 (*ochre179*), в результате чего образуется усеченный, нефункциональный белок. Мутация *ochre* – это точечная мутация, которая изменяет кодон, определяющий аминокислоту на стоп-кодон UAA, вызывая преждевременное прекращение построения полипептидной цепи во время трансляции. Мутация *ochre179* в кодоне, кодирующем глутаминовую кислоту, существенна для продукции интегразы с полной рекомбинационной активностью. Однако не известно, где содержатся различия в кассетах в разных деривативах Tn7, которые должны быть приурочены к природной супрессии кодона *ochre179*, сводящегося к активной интегразе, или к *trans*-работающей рекомбинационной активности другой интегразы, подобной интегразе класса 1 (*Int1*), что было показано при опознавании и рекомбинации сайта *attI* интегронов класса 2 (*attI2*). Поэтому генетические кассеты интегронов класса 2 высококонсервативны, и их роль значительно ограничена, по сравнению с интегронами класса 1. Имеется несколько вариантов генных кассет интегронов класса 1, которые возникли в результате рекомбинационных процессов. Кроме того, показано, что интегразы класса 1 способны узнавать рекомбинационный сайт *attI2*, что объясняет наблюдаемое разнообразие генетических кассет класса 2 в клинических изолятах. Как и интегроны класса 1, интегроны класса 2 описаны в патогенных и непатогенных бактериях, а также в бактериях окружающей среды.

Интегроны класса 3 впервые были описаны в клинических изолятах в Японии, а

также у бактерий из окружающей среды. Типичный хромосомный интегрон класса 3 был описан в двух видах рода *Delftia*. Эти интегроны имели наборы кассет, кодирующие белки с неизвестными функциями. Хромосомные интегроны класса 3 могут передавать свои генные кассеты интегронам класса 1, поэтому те же генные кассеты найдены в интегронах класса 1 рода *Pseudomonas*. Интегроны класса 3 из госпитальной среды ассоциированы с антибиотикорезистентностью и имеют эволюционную историю как у интегронов класса 1. Их генные платформы были мобилизованы Tn402, но в обратной ориентации. Ранее интегроны класса 3 сравнительно часто встречались среди геномов бактерий, выделенных на территории Японии и нигде более в мире. Разнообразие их невелико, возможно, потому, что их интегразы не так активны, как у интегронов других классов [88]. Однако описано, что в настоящее время интегроны класса 3 динамично распространяются по всему миру, но их исследование методом ПЦР осложнено из-за отсутствия консервативной области 3' в последовательности ДНК гена интегразы класса 3. С помощью секвенирования интегроны класса 3 были обнаружены у бактерий рода *Serratia*, выделенных от пациентов на территории Польши [50]. Интегроны класса 3 продолжают эволюционировать и распространяться, колонизируя новые виды, захватывая новые кассеты резистентности и встраиваясь в новые плазмидные вектора [88].

1.3.2. Генные кассеты и сайты их встраивания

Генные кассеты – компактные элементы ДНК, в основном, имеют простую структуру, состоящую из одной рамки считывания и рекомбинационного сайта. Рекомбинационные сайты *attC* имеют значительную гомологию, что позволяет образовывать стабильные вторичные структуры, важные как для узнавания интегразой, так и для рекомбинации. Типичная генная кассета имеет следующую структуру слева направо: консервативный рекомбинационный сайт GTTTRY, точка рекомбинации; стартовый кодон (ATG, GTG или TTG) и открытая рамка считывания (ORF); *attC* сайт, содержащий связывающие домены интегразы R'', L'', L' и R'. Большинство кассет содержат одну *orf*, ориентированную слева направо, но описаны кассеты с двумя и более *orf*, без *orf* или с *orf* в обратной ориентации. Центральная часть сайта *attC* – переменная по длине последовательность. Такая структура *attC* сайта обеспечивает формирование структуры, узнаваемой интегразой. Поскольку активность интегразы зависит от структуры в большей степени, чем от последовательности, это объясняет почему этот

фермент обеспечивает мобилизацию генных кассет с очень разными последовательностями *attC*.

Сайт *attI*, как и сайт *attC*, имеет сайты связывания интегразы, называемые L и R. Связывающий сайт R содержит каноническую последовательность 5'-GTTRRRY, в которую встраивается входящая кассета между G и T. Сайт *attI* интегронов класса 1 имеет также два прямых повтора DR1 и DR2, которые не обнаружены в *attI* сайтах интегронов других классов.

Интеграза может катализировать не только рекомбинацию *attI* × *attC*, но, с меньшей эффективностью, между двумя *attC* сайтами, что приводит к образованию набора кассет, замкнутых в кольцо. Такие кольцевые ДНК могут содержать множество генных кассет, что приводит к удалению или перестройке блоков соединённых кассет. Также возможно встраивание кассет в интегронную вставку путём рекомбинации *attC* × *attC*, но *attI* является более предпочтительным. Рекомбинация между двумя *attI* сайтами наименее эффективна, но может наблюдаться у культур в поздней логфазе и ранней стационарной фазе. Такая рекомбинация приводит к образованию гибридных *attI* сайтов и объединяет разные интегроны. Кроме того, описана возможность негомологичной рекомбинации *attI* сайта со вторичными сайтами, которые содержат консервативный мотив GTT, что приводит к встраиванию интегрона новый геномный участок, и это может объяснить распространение интегронов по хромосоме.

Сайт *attC* тоже может рекомбинировать со вторичными сайтами, имеющими мотив GNT, что приводит к инактивации *attC* сайта и фиксации генной кассеты во вторичном локусе. Это может быть важным механизмом внедрения генов в плазмиды и хромосомы. В другом случае, когда вторичный сайт имеет каноническую последовательность GTTRRRY, при неспецифической инсерции *attC* сайта сохраняется интегразная активность [88]. На рисунке 1.4А показана генная кассета в линейной форме, вставленная в массив кассет, где слева направо характерны следующие особенности: консервативный сайт рекомбинации, GTTRRY, с вертикальной стрелкой, показывающей точку рекомбинации; стартовый кодон и открытая рамка считывания, кодирующаяся кассетой; и сайт *attC*, содержащий домены связывания интегразы R'', L'', R' и L'. На рисунке 1.4Б представлена подробная структура единственного сайта *attC*: данные элементы имеют частично палиндромные последовательности, помеченные буквами участки могут сочетаться, образуя таким образом стабильную крестообразную структуру,

распознаваемую интегразами. Дополнительная структура, помеченная звездочкой в L'', обеспечивает правильную ориентацию и вставку кассет в массив. Между концевыми палиндромными областями находится область, которая различается по длине (от 16 до 109 п.н.) и последовательности между разными кассетами. Эта область также способна образовывать стабильную вторичную структуру, и отсутствие консервативности последовательности показывает, что для распознавания важнее структура, а не последовательность. На рисунке 1.4В показан сайт *attI* интегона класса 1. Сайт *attI* имеет L- и R-элементы с консервативной точкой рекомбинации G 2 TTRRRY. Сайт *attI* интегროнов класса 1 также имеет два прямых повтора, DR1 и DR2, но они не известны из сайтов *attI* других классов интегров (рисунок 1.4).

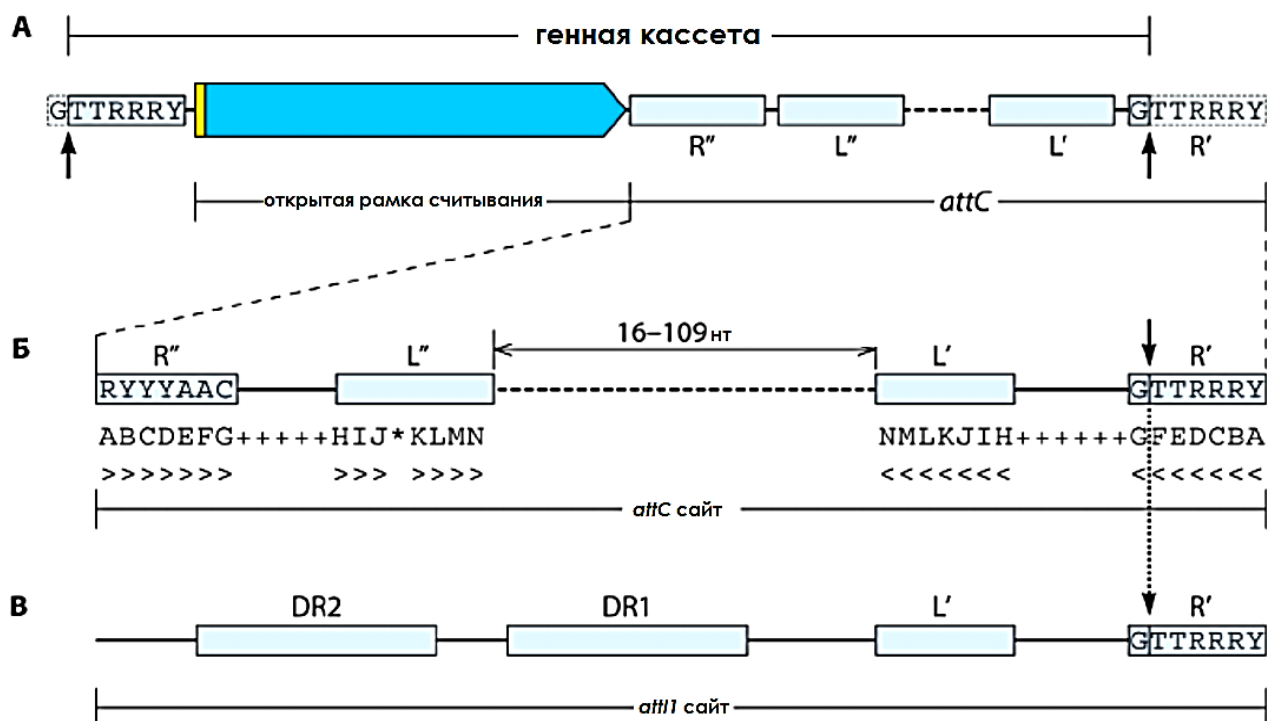


Рисунок 1.4 – Схематичное изображение структуры генных кассет и связанных с ними сайтов рекомбинации [88, с изменениями]

Интегроны сами по себе лишены способности к перемещению, однако чаще всего локализуются на плазмидах в составе транспозонов. Поскольку описаны МГЭ, ответственные за возникновение устойчивости у патогенных бактерий, то нельзя игнорировать их вклад в формирование МЛУ. Впервые интегроны были найдены в составе МГЭ, ответственных за возникновение фенотипов МЛУ у патогенных бактерий, выделенных от человека, животных и растений [205].

1.4. Вклад интегронов в эволюцию антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий

Появление и распространение антибиотикорезистентности среди бактериальных патогенов является наиболее выдающимся примером эволюции, который был предметом изучения у бактерий в течение последних шести десятилетий. Возникновение устойчивости к какому-либо одному виду лекарства было вполне ожидаемо, что было показано в ранних лабораторных исследованиях. Напротив, множественная резистентность была неожиданным явлением, поскольку было обосновано, что одновременное появление множества мутаций, обеспечивающих резистентность, находится за пределами эволюционного потенциала данной бактериальной популяции. Однако, уже через шесть лет после внедрения и массового производства стрептомицина, тетрациклина и хлорамфеникола были идентифицированы изоляты *Shigella dysenteriae*, которые были одновременно резистентны ко всем этим антибиотикам, а также к сульфаниламидам. В то же время, стало также ясно, что появление штаммов с множественной резистентностью не может быть объяснено только мутациями. В 1970-х гг. во многих случаях было установлено, что множественная резистентность ассоциирована с трансмиссибельными плазмидами, а роль интегронов в приобретении генов резистентности была установлена много позже, в конце 1980-х гг. Установлено, однако, что интегроны, внесшие вклад в первые вспышки множественной резистентности в 1950-х гг., произошли с участием Tn21, интегрон-содержащего транспозона, и распространялись плазмидой NR1 (R100). Установленная временная шкала развития множественной резистентности штаммов рода *Shigella* показывает, что бактерии уже были подготовлены для этого и имели соответствующие генетические инструменты, включая интегроны [91].

Мобильные интегроны являются основным двигателем распространения антибиотикорезистентности, особенно среди ГОБ. Они аккумулировали большое число генов резистентности из природного пула детерминант резистентности. Они также участвуют в создании новых и ещё более сложных мобильных элементов, которые несут детерминанты множественной резистентности к антибиотикам, дезинфектантам и тяжелым металлам. Их эволюция продолжается, подталкиваемая постоянным селективным давлением как со стороны антропогенного фактора, так и со стороны условий окружающей среды. Продолжающееся использование антибиотиков в

клинической и сельскохозяйственной деятельности привело к возникновению обильного числа интегронов резистентности. Клинические интегроны класса 1 особенно широко распространились, присутствуя в 10-50 % бактерий-комменсалов здоровых людей, включая детей, которые ещё никогда не принимали антибиотики. Они также присутствуют в бактериях-комменсалах сельскохозяйственных животных, где 80 % *E. coli* содержат интегроны. Такие комменсалы содержат интегроны разнообразной структуры и являются источником детерминант резистентности при горизонтальном переносе генов между природными бактериями, другими комменсалами и патогенами [188].

По этой причине, огромное количество бактерий, содержащих интегроны, попадают в окружающую среду со сточными водами. В Великобритании этот уровень за год оценивается, как 10^{19} бактерий, содержащих интегроны класса 1. Не удивительно, что интегроны и гены резистентности детектируются в поливной воде для растений, а оттуда попадают в океан. Использование удобрений животного происхождения вносит гены резистентности и интегроны в культивируемые почвы. Всё это приводит к тому, что гены резистентности и интегроны выделяются даже в регионах, географически удалённых от цивилизации, таких, как Арктика, а также в исчезающих видах [90].

Гены антибиотикорезистентности и интегроны рассматриваются как существенные загрязнители окружающей среды. В отличие от обычных загрязнителей, они могут реплицироваться и проникать в новые виды. Проникнув в бактерии окружающей среды, интегроны подверглись значительным эволюционным изменениям. Например, в новом хозяине *Acinetobacter johnsonii*, ранее никогда не бывшем патогеном человека, интегроны сформировали необычную генную кассету, включившую в себя две метионин-сульфоксид редуктазы. Эти ферменты репарируют повреждение белков при окислительном стрессе и обеспечивают повышение колонизационной способности внутри ткани животных. Кроме того, в состав этого интегрона включен миниатюрный транспозабельный элемент, что существенно повышает мобильность данного интегрона. Распространение такого интегрона вызывает опасение с точки зрения повышения патогенности и вирулентности представителей рода *Acinetobacter*, которые оцениваются как эмерджентные (вновь возникающие) оппортунистические патогены [88].

Захват экзогенных генов является наиболее эффективным средством, с помощью которого бактериальные виды могут выживать в изменяющихся условиях, включая

воздействие антимикробных средств. Интегроны обеспечивают бактерии системой захвата генов, великолепно адаптированной для используемых режимов лечения множеством антибиотиков. Однако с открытием суперинтегров и тысяч генных кассет, ассоциированных с интегронами в геномах бактериальных видов из окружающей среды, становится ясно, что важность данных элементов выходит за рамки феномена антибиотикорезистентности. Захват генных кассет интегров обеспечивает реципиентные бактерии новыми белками и новыми ферментными функциями, потенциально дающими им адаптивные эволюционные преимущества [84].

Интегроны являются значимыми агентами бактериальной эволюции, обеспечивающими стремительно расширяющийся спектр функций, кодирующихся генными кассетами. Значимость интегров изменила взгляд на адаптивные возможности бактерий, о чем свидетельствует их вклад в рост мультирезистентности с начала 1960-х гг. [30, 141].

Агрессивная среда антибиотиков и других факторов антропогенного происхождения формировалась в течение последних 70 лет: эволюционно это привело к созданию механизмов мобилизации интегров. Интегроны изначально не присутствовали в геномах патогенных энтеробактерий, где они широко распространены в настоящее время. Именно через объединение интегров с транспозонами и конъюгативными плазмидами интегроны распространились и приобрели способность циркулировать среди клинически значимых штаммов. Тем не менее, остается не ясным, почему не все интегроны имели такое распространение или влияние на формирование устойчивости к АП у штаммов бактерий [34]. Не известно, связано ли успешное распространение различных интегров с классом интегразы или с внутренними характеристиками интегрона. Тип гена интегразы может влиять на способность проникновения и сохранения в новых системах, а также на способность интегров включать и исключать из состава собственной варибельной части генные кассеты и передавать их в другие бактериальные системы с помощью конъюгационных плазмид или транспозонов. Однако постоянство и регулярность данных процессов зависит от нагрузки на метаболический обмен «хозяина» интегрона и возможности его «содержания» за счет собственной энергии. Возможно, также это отражается в дифференциальных свойствах интегров, таких как различия в уровнях активности экспрессии промоторов интеграз или различия в диапазонах узнавания сайтов рекомбинации *attC*. Таким образом,

возникает предположение: распространение интегронов класса 1 было наиболее успешным потому, что у гена *int1* более широкий спектр сайтов рекомбинации, предоставляющих доступ к большей части генных кассет, кодирующих различные функции. Высокая стабильность сохранения структур интегронов обеспечивается при высоком селективном давлении АП, и, кроме того, регулируется активностью гена интегразы в условиях метаболизма хозяина интегрона [204], а также за счет сохранения стабильной структуры сайта рекомбинации *attC* (с помощью ДНК-связывающего белка в структуре сайта рекомбинации) [93].

В настоящее время подробно изучены способность распознавания и участие в рекомбинации участков геномов бактерий разных видов, обусловленное наличием фермента интегразы. Тем не менее, некоторые важные вопросы остаются без ответа, например, создание кассет *de novo*. Анализ изученных кассет интегронов позволил предположить, что происхождение генных кассет включает в себя промежуточный этап обратной транскрипции молекул мРНК, чтобы объяснить отсутствие промоторов, недостаточное количество некодирующих последовательностей и наличие только одного гена [99, 100, 178]. Хотя предположение происхождения кассет с матриц РНК интересно, но некоторые контраргументы этой теории более убедительны. Действительно, если бы происхождение кассет путем обратной транскрипции РНК было верным, по крайней мере, один дополнительный механизм понадобилось бы для производства кассет из ДНК, чтобы присутствовали промоторы. Также, принимая во внимание миллионы лет эволюции интегронов и тонкости их взаимодействия с генетическим аппаратом хозяина, это кажется маловероятным, что такая важная функция, как создание кассет, опирается на независимый механизм обратной транскрипции, результаты которой детектированы у очень малого количества интегронов. Описано, что создание новых генных кассет может быть связано со специфичными интронами группы *IIС-attC*, локализованными в консервативном сегменте интегрона. Интроны группы *IIС* представляют собой активные каталитические РНК и мобильные ретроэлементы, которые самосплайсируются (созревают). В целом, сборка кассет *de novo* остается предметом первостепенной важности для понимания функционирования интегронов [220]. Любые попытки предсказать эпидемический потенциал распространения новых генных кассет требуют более глубокого понимания влияния всех факторов, способствующих распространению

генных кассет и насколько часто эти сочетания факторов влияют на возникновение мутаций в генных кассетах [157].

1.4.1. Генетические детерминанты устойчивости к сульфаниламидам и триметоприму

Сульфаниламиды являются структурными аналогами парааминобензойной кислоты (ПАБК). Механизм воздействия сульфаниламидов на бактериальную клетку предполагает их участие в обмене веществ в качестве антиметаболитов, заменяющих ПАБК в составе фолата и, тем самым, приводящих к блокировке ферментативных функций микроорганизма, что приводит к нарушению механизма обмена веществ клетки, а затем и к ее гибели. Триметоприм (диаминопиримидин) является структурным аналогом дигидрофолиевой кислоты, полученной из дигидроптероата – фермента, синтез которого ингибируют сульфаниламиды в фолате путем конкуренции с ПАБК. Триметоприм действует путем конкурентного связывания с ферментом дигидрофолат редуктазой (ДГФР); таким образом, ингибируя производство тетрагидрофолиевой кислоты [174]. Открытие триметоприма в 1960-х гг. сопровождалось повышенным интересом к нему, потому что, как и сульфаниламиды (открытые в 1930-х гг.), триметоприм направлен на ингибирование внутриклеточного синтеза тетрагидрофолиевой кислоты, которая является необходимым метаболическим кофактором в синтезе тимина и пуринов.

Синергизм использования триметоприма и сульфаниламидов, как и ожидалось, оказывает мощный бактерицидный эффект за счет последовательной блокады путей синтеза тетрагидрофолиевой кислоты. Устойчивость к обоим химиотерапевтическим препаратам, поскольку они обычно назначаются в тандеме, была зарегистрирована вскоре после их клинического применения. Хромосомная резистентность к сульфаниламидам может возникать: 1) через мутации, приводящие к увеличению производства ПАБК или, что более распространено, 2) через мутации в хромосомном гене *folP* (кодирующем ДГФР), которые снижают сродство ДГФР к сульфаниламидам без ущерба для связывания ПАБК. Такие мутации были зарегистрированы во многих группах бактерий и нацелены на различные консервативные области гена, ответственного за синтез ДГФР. Аналогичным образом, хромосомная устойчивость к триметоприму может возникать через мутации, которые увеличивают транскрипцию гена *folA* (кодирующего ДГФР), или через мутации, которые снижают сродство ДГФР к триметоприму [139]. Однако, подавляющее большинство клинических изолятов, устойчивых к сульфаниламидам и

триметоприму, обусловлено не наличием хромосомными мутаций в геноме, а приобретением детерминант устойчивости путем горизонтального переноса МГЭ [139]. Параллельно с систематическим совместным использованием препаратов в клинических и сельскохозяйственных условиях гены, придающие устойчивость к сульфаниламидам и триметоприму, часто встречаются вместе на мобильных элементах МГЭ, таких как интегроны класса 1 или конъюгативные плазмиды [139, 197]. Мобильные гены, обеспечивающие устойчивость к сульфаниламидам, являются гомологами хромосомно кодируемого гена *folP* и известны как гены *sul*. Мобильные гены, обеспечивающие устойчивость к триметоприму, являются либо гомологами, либо функциональными аналогами хромосомно кодируемого гена *folA* и известны как гены *dfr* (для ДГФР). Несмотря на их частое совместное присутствие в мобильных генетических элементах, существуют значительные различия между мобильными генами, передающими устойчивость к сульфаниламидам (гены *sul*) и триметоприму (гены *dfr*). На сегодняшний день в клинических изолятах описано только три класса генов *sul*, которые возникли более 500 миллионов лет назад и быстро распространились после коммерческого внедрения сульфатных препаратов [191]. Так, ген *sul1* присутствует в составе консервативного региона интегронов класса 1, обеспечивая устойчивость бактерий к другому сульфаниламиду – сульфаметоксазолу [18, 112].

Гены *dfr* обладают большим разнообразием: в клинически значимых штаммах обнаружено более 30 различных типов генов [211], которые, в свою очередь, были классифицированы на два семейства (*dfrA* и *dfrB*). Эти два семейства кодируют эволюционно неродственные белки заметно отличающихся размеров: гены *dfrA* являются гомологами хромосомно кодируемых генов *folA*, в то время как гены *dfrB* являются функциональными аналогами неизвестного происхождения [194, 218, 221]. Большинство генов *dfrA* имеют стандартное название, состоящее из *dfrA* и числового значения, указывающего на порядок их открытия. По локализации гены, кодирующие ДГФР, присутствуют чаще всего в составе мобильных генетических элементов, таких как транспозоны или плазмиды, а также в виде кассет в составе варибельной области интегронов классов 1 и 2. Сообщается также о неассоциированных с интегронами генах *dfrA*, что указывает на разные источники распространения данных детерминант устойчивости.

1.4.2. Гены устойчивости к аминогликозидам

Резистентность бактерий к аминогликозидам может развиваться за счет продукции ферментов, инактивирующих аминогликозиды, уменьшения транспорта аминогликозидов в бактериальную клетку, модификации мишени действия и активного выведения препаратов из микробной клетки. Основным механизмом устойчивости микроорганизмов к аминогликозидам является модификация молекулы антибиотика бактериальными аминогликозидомодифицирующими ферментами (АГМФ). Фосфорилированные (*aph* – присоединяющие молекулу фосфорной кислоты), ацетилированные (*aac* – присоединяющие молекулу уксусной кислоты) или аденилированные (*aad* – присоединяющие молекулу нуклеотида аденина) аминогликозиды не способны эффективно связываться с бактериальными рибосомами и нарушать синтез белка в микробной клетке. Гены, ответственные за продукцию ферментов, модифицирующих аминогликозиды, локализуются, как правило, на плазидах, что обеспечивает быстрое распространение устойчивости как среди бактерий одного вида, так и среди микроорганизмов других видов. Ещё один механизм устойчивости бактерий к данной группе АП – модификация мишени действия 16S рРНК – фермент 16S рРНК-метилаза, кодируемая плазмидным геном *armA*. Кроме плазмидных генов, существуют и хромосомные гены устойчивости к аминогликозидам, такие как *AcrAB-TolC* и *KpnEF*, активирующие эффлюксные насосы.

Для клинических штаммов микроорганизмов характерна частично перекрестная резистентность к различным препаратам, что связано с возможностью одновременной продукции различных ферментов, инактивирующих аминогликозиды. Грамотрицательные микроорганизмы, проявляющие резистентность к стрептомицину, в большинстве случаев чувствительны ко всем другим аминогликозидам, поскольку аденилтрансферазы *ant(2'')* и *ant(3'')* кодируются генами *aadB* и *aadA* соответственно [175], которые являются наиболее распространенными среди генных кассет интегронов. Эти гены широко распространены во всем мире, были обнаружены в интегронах, выделенных от животных, включая домашних и диких животных, а также животных, задействованных в производстве пищи [98, 189].

1.4.3. Устойчивость к хинолонам

Известны четыре механизма хромосомно- и плазмидно- опосредованной устойчивости к хинолонам: (1) точечные мутации в хромосомных генах ферментов-

мишеней, ДНК-гиразы и топоизомеразы IV; (2) модификация молекул лекарства ацетилированием ферментом, кодируемым геном *aac(6')-Ib-cr*; (3) активное выведение из клетки хинолонов с помощью эффлюксных насосов, кодируемых генами *qepAB* и *oqxAB*; (4) плазмидные гены *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* и *qnrVC*, которые кодируют пентапептидные белки, изменяющие структуру ДНК-гиразы и топоизомеразы IV [182].

Гены *qnr* были мобилизованы из хромосом бактерий и связаны с плазмидами, часто в составе интегронов класса 1. Часто гены устойчивости к хинолонам локализованы на плазмидах, несущих гены БЛРС. Механизмы, опосредованные плазмидами, обеспечивают устойчивость к хинолонам на невысоком уровне, но способствуют быстрому развитию резистентности на высоком уровне за счет ускорения появления точечных мутаций в генах ДНК-гиразы и топоизомеразы IV [213].

1.4.4. Гены бета-лактамаз в составе интегронов

Основными механизмами устойчивости к бета-лактамным антибиотикам являются продукция ферментов, нарушение проницаемости внешней мембраны, модификация мишени действия. Наиболее значимым из этих механизмов является продукция бета-лактамаз, обуславливающая приблизительно 80 % случаев устойчивости к бета-лактамным антибиотикам. У грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций продукция бета-лактамаз является одной из наиболее частых причин резистентности. Бета-лактамазы грамотрицательных микроорганизмов делятся на две группы: кодируемые плазмидными или хромосомными генами. В настоящее время наибольшее значение для клинической практики имеют плазмидные гены БЛРС ГОБ, поскольку они способны разрушать все бета-лактамные антибиотики, включая цефалоспорины III и, в меньшей степени, IV поколения; исключением являются только карбапенемы.

К настоящему времени существует две классификации бета-лактамаз. На дату 30.08.2022 г. в базе данных NCBI «Beta-Lactamase DataBase – Structure and Function» размещены 7537 бета-лактамаз, в том числе класса A (n=1737), класса B (n=811), класса C (n=3627) и класса D (n=1168) (<http://bldb.eu/>). Структурная классификация по Ambler, 1980 г. включает в себя сериновые бета-лактамазы (молекулярные классы A, C и D) и металло-бета-лактамазы (молекулярный класс B). Функциональная классификация по Bush, 1989 г. включает в себя три группы. В первую функциональную группу определены хромосомные цефалоспориназы со слабой ингибирующей активностью: например,

кодируемые генами *ampC*-типа. Вторая функциональная группа наиболее обширна по своему составу и поделена на 12 подгрупп: подгруппа 2a содержит пенициллиназы грамположительных бактерий с узким спектром субстратной специфичности, который включает только пенициллины; подгруппа 2b включает пенициллиназы широкого спектра (TEM-1, TEM-2 SHV-1), гидролизующие пенициллины и ранние цефалоспорины; в подгруппу 2be входят БЛРС, способные расщеплять цефалоспорины III-IV поколений (TEM-3, SHV-2, CTX-M-15), чувствительные к клавулановой кислоте; в подгруппу 2br определены БЛРС с устойчивостью к клавулановой кислоте, расщепляющие пенициллины и цефалоспорины I поколения (TEM-30, SHV-10); в подгруппу 2ber – БЛРС, расщепляющие цефалоспорины III-IV поколений и монобактамы, наряду с ранними цефалоспоридами (TEM-50); в подгруппу 2c – карбенициллиназы, гидролизующие карбенициллин и тикарциллин (PSE-1, CARB-3, BRO-1); в подгруппу 2ce – гидролизующие карбенициллин и цефепим (RTG-4); в подгруппу 2d – бета-лактамазы молекулярного класса D, OXA-бета-лактамазы, расщепляющие клоксациллин, оксациллин и карбенициллин, слабо подавляющиеся ингибиторами (OXA-1, OXA-10); в подгруппу 2de (OXA-11, OXA-15) – БЛРС молекулярного класса D; в подгруппу 2df – карбапенемазы OXA-типа (OXA-23, OXA-24, OXA-48); в подгруппу 2e – хромосомно-кодируемые индуцибельные цефалоспоридазы и цефуроксимазы (CepA, FUR, FPM-1); в подгруппу 2f – сериновые карбапенемазы, чувствительные к клавуланату (KPC-1, IMI-1, SME-1). В третью функциональную группу входят бета-лактамазы молекулярного класса B, которые разделены на 2 подгруппы: представители подгруппы 3a способны расщеплять все бета-лактамы, кроме монобактамов (IMP-1, VIM-1, NDM-1); подгруппы 3b - хромосомно-кодируемые карбапенемазы (CphA, Sfh-1) [45].

В составе интегронов бета-лактамазы типов IMP, VIM, NDM, SPM, GIM, FIM и SIM выявлены у грамотрицательных бактерий в Португалии, Китае, Корее, Бразилии, Перу, Коста-Рике, России, Греции, Польше, Иране и Саудовской Аравии и др. странах мира [11, 27, 29, 36, 39, 41, 51, 62, 104, 122, 138, 163, 192, 219, 234, 238].

1.4.5. Генетические детерминанты устойчивости к макролидам

Многие инфекции, которые можно лечить цефалоспоридами нового поколения, также поддаются лечению макролидами [239]. Химическая структура макролидов включает три компонента: макролактоновое кольцо переменного размера, сахар в 3-положении и аминосахара в 5-положении. Подавляющее большинство макролидов

связываются в пептидном туннеле 50S субъединицы рибосомы, который является выходом наработанного продукта, блокируя просвет, тем самым запрещая элонгацию растущего полипептида [209, 224]. В зависимости от макролида он обеспечивает либо бактерицидное, либо бактериостатическое воздействие на микроорганизмы [209]. Бактерии сформировали множество механизмов устойчивости в отношении макролидов: снижение внутриклеточной концентрации АП с помощью эффлюксных насосов [92], модификацию рибосом [165, 180] защиту рибосом [207] и модификацию макролидфосфотрансферазы (*mph*), а также расщепление макролактонового кольца, катализируемое эстеразами эритромицина (*ere*). У грамотрицательных бактерий механизмы резистентности к макролидам включают инактивацию эритромицин-эстеразами и макролидной фосфотрансферазой.

Гены *ere* (эритромицин-устойчивой эстеразы) и *mph* (макролид фосфотрансферазы) были первоначально обнаружены у *E. coli*, спустя тридцатилетие после внедрения макролидов в массовую в клиническую практику. Гены *mph(C)* и *ere(B)*, по-видимому, произошли от грамположительных бактерий и распространились между грамположительными и грамотрицательными бактериями. Первые два представителя семейства эстераз эритромицина, идентифицированы в госпитальных штаммах *E. coli*, известны как EreA и EreB. С тех пор были открыты еще три: EreA2 в мультирезистентных *Vibrio cholerae* [215], EreC в мультирезистентных *K. pneumoniae* [236] и EreD у *Riemerella anatipestifer* [232]. За исключением EreD, кодируемым хромосомой, все остальные ферменты Ere кодируются мобильными генетическими элементами и поэтому встречаются у множества различных видов бактерий, включая экологические и клинические изоляты. Фермент EreA в основном встречается в экологических изолятах, однако, он также был обнаружен в *E. coli* и *S. aureus*. Ген *ereA2* имеет большее клиническое значение, распространен у *Pseudomonas* spp. [116, 117], *Salmonella indiana* [241], *K. pneumoniae* [14], *E. coli* [19], нетифоидных *Salmonella enterica*, *Salmonella* spp. [148] и *Vibrio cholera* [215]. Фермент EreB может быть обнаружен у целого ряда патогенов, включая: *E. coli* [149], MRSA, MSSA [193], *Staphylococcus saprophyticus* [76], *Klebsiella oxytoca* и *Salmonella* spp. Фермент EreC был детектирован в составе интегрона госпитального карбапенемрезистентного штамма *K. pneumoniae* в 2009 г. [236].

Гены *mph* распространяются с помощью плазмид и транспозонов в широком спектре микроорганизмов. Наряду с грамотрицательными и грамположительными

бактериями порядка *Enterobacterales*, гены *mph* были детектированы в резистомах в составе транспозона Tn21 в генетическом окружении структур интегрона класса 1 у представителей порядка *Aeromonadales* [56].

1.4.6. Устойчивость к соединениям четвертичного аммония

Биоциды используются в клинической практике дольше, чем антибиотики, а ген устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям (ЧАС) – *qac*, или его остаток – является обязательной структурной особенностью интегронов класса 1, выделенных из клинических изолятов. Предполагается, что изначально ген *qacE*, входящий в состав интегронов класса 1 из экологических ниш, внедрился в структуры клинических интегронов. При этом, селективное преимущество обеспечивалось указанным геном как ответ на использование ЧАС в качестве дезинфицирующего средства в больницах, начиная с 1930-х гг. Различные генные кассеты *qac* встречаются в интегронах, и они не связаны с какими-либо известными кассетами устойчивости к антибиотикам. Генные кассеты *qac* могут постоянно присутствовать в наборах генных кассет, состав которых может варьироваться при изменении селективных условий. Кроме того, разнообразные *qac*-кодирующие генные кассеты могут быть легко восстановлены с помощью метагеномной ДНК, присутствующей в биопленочном матриксе [89]. Около половины всех интегронов класса 1 из образцов окружающей среды несут кассеты *qac*. Кроме того, отдельно кассеты *qac* встречаются достаточно часто в составе МГЭ, что указывает на динамический процесс приобретения и перестановки кассет в генных наборах интегронов. Широкое распространение разнообразных *qac*-кассет указывает на общую роль этих эффлюксных насосов в бактериях, выделенных из экосистем, так как считается, что эффлюксные насосы способствуют выведению токсических веществ из клеток бактерий, существующих в природных экосистемах. Рост устойчивости к антибиотикам происходит параллельно с аналогичной тенденцией роста устойчивости к биоцидам, что вызывает опасения о более широком использовании биоцидов, усиливающем селекцию и распространение устойчивых к антибиотикам бактерий [86].

1.4.7. Устойчивость к фениколам

Гены устойчивости к фениколам подразделяются на 37 групп и идентифицированы в 70 родах бактерий. Гены *cat* часто связаны с генными кассетами и интегронами у грамотрицательных бактерий. Некоторые из этих генов были идентифицированы в транспозонах. Ген *cmiA* кодирует эффлюксный насос, обеспечивающий устойчивость к

хлорамфениколу. Было установлено, что генная кассета *cmlA*, по-видимому, несет собственный(е) промотор(ы) - в интегронах полирезистентных плазмид и транспозонов грамотрицательных бактерий. Описано, что один или несколько из этих промоторов функционально активны в отношении экспрессии маркерного гена. Генная кассета *cmlA* часто встречается в составе мультirezистентных интегროнов или ассоциирована с транспозонами, расположенными на конъюгативных и/или неконъюгативных плазмидах, прежде всего, у *P. aeruginosa* и представителей порядка *Enterobacterales* [181].

1.4.8. Устойчивость к рифампицину

Несмотря на то, что 90 % случаев устойчивости к рифампицину у бактерий обусловлены мутационными изменениями в 81-п.н. области гена *rpoB* [153], устойчивость к данному антибиотику может также возникать в результате горизонтального переноса генов *arr*, которые кодируют фермент АДФ-рибозилтрансферазу, ответственный за инактивацию препарата. Ген *arr-1* был впервые описан в хромосоме *Mycobacterium smegmatis*. Впоследствии аллели *arr-2*, *arr-3*, *arr-4* и *arr-5* были описаны как генные кассеты в интегронах класса 1, детектированных в грамотрицательных изолятах в Европе и Азии, демонстрирующих высокий уровень устойчивости к рифампицину. Клинические штаммы *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, несущие описанные ранее и новые кассеты генов *arr*, представляют собой резервуар для распространения этих детерминант резистентности путем горизонтального переноса генов [61, 108].

1.4.9. Устойчивость к стрептотрицину и стрептомицину

Гены устойчивости к стрептотрицину, кодирующие белок стрептотрицинацетилтрансферазу, отличаются небольшим разнообразием по своей молекулярной структуре и механизмам устойчивости, по сравнению с детерминантами устойчивости к другим антибиотикам. Эти гены широко распространены как среди клинических, так и среди природных бактерий. Преимущественно гены, кодирующие стрептотрицинацетилтрансферазы, обнаруживаются в наборах генных кассет интегროнов 2 класса. При этом, *sat2* является единственным геном устойчивости к стрептотрицину, ассоциированным с генной кассетой интегрона, а ген *sat1* представляет собой гибрид генов *estX* и *sat2*: генной кассете *sat2* предшествует другая, ранее безымянная кассета, названная *estX*. Белок, получаемый экспрессией гена *estX*, сливается с продуктом гена *sat2*, образуя более длинный – *sat1*. Такое слияние белков, вероятно, повышающее

уровень устойчивости, является результатом мутации, блокирующей терминацию транскрипции гена *est* [158].

Сцепленные гены *strA-strB*, которые кодируют ферменты, инактивирующие стрептомицин, преимущественно встречаются у грамотрицательных бактерий, однако они были обнаружены и у грамположительных бактерий рода *Corynebacterium*. Стрептомицин ограниченно использовался в клинической практике в течение многих лет, и устойчивость к этому антибиотику не распространена достаточно широко. Однако, персистенция *strA-strB* в бактериальных популяциях подразумевает, что в поддержании этих генов участвуют другие факторы, помимо прямого селективного давления АП. В составе интегронов класса 1 эти гены описаны повсеместно [29].

1.4.10. Устойчивость к линкозамидам

Класс антимикробных препаратов линкозамидов происходит от природного продукта - линкомицина и включает полусинтетические производные - клиндамицин и пирлимицин. Этот класс был впервые охарактеризован в 1960-х гг., и в настоящее время используется для лечения широкого спектра инфекций. В основном эти препараты применяются против грамположительных микроорганизмов, но также находят применение против отдельных видов грамотрицательных и анаэробных бактерий, а также простейших. Механизм действия - блокирование синтеза микробного белка через связывание с 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы, с последующей элиминацией промежуточного продукта, образовавшегося в начальной фазе цикла элонгации. Лечение клиндамицином в прошлом было ограничено из-за быстрого развития резистентности и побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта. Впервые ген устойчивости к линкозамидам *lnuF* (син. *linF*) был обнаружен в составе интегрона в геноме мультирезистентного клинического штамма *E. coli* в Норвегии в 2004 г. [103]. В более поздних работах упоминалось о распространении гена *lnuF* в штаммах бактерий, выделенных от сельскохозяйственных животных, из мясных продуктов и из окружающей среды не только в составе интегронов, но и в составе геномных островов патогенности [85]. Ген *lnuF*, кроме *E. coli*, обнаруживался в геномах представителей родов *Salmonella* и *Proteus* [85, 142]. Было отмечено, что географическое распространение ген *lnuF* получил на территории Нидерландов, Китая, Тайланда, Камбоджи, Малайзии, Индии, Египта и Франции [142]. Описано, что ген *lnuF* в составе наборов генных кассет среди интегронов класса 1 встречается в тандеме *aadA2-lnuF* с молекулярной массой 2000 п.н., среди

интегронов класса 2 – в сочетании генных кассет *linF-sat2-aadA1* с молекулярной массой 2600 п.н. или *dfrA1-linF-aadA1* 2500 п.н.

1.5. Методы выявления интегронов в геномах бактерий

Методами выявления интегронов в геномах бактерий являются гибридизация ДНК-ДНК, ДНК-микрочипы, риботипирование, ПЦР в классическом режиме и ПЦР в режиме реального времени, петлевая изотермическая амплификация, а также секвенирование ДНК.

Метод гибридизации применяется для детекции интегронных структур достаточно редко: если проанализировать публикации, описывающие применение данного метода при детекции интегронов, то можно отметить период времени с 2001 по 2006 гг., как пик популярности использования ДНК-ДНК гибридизации для поиска интегронов [91, 127, 171, 201].

Одним из наиболее точных и современных методов анализа является использование ДНК-микрочипов [65, 134, 243]. Они представляют собой пластинки с иммобилизованными мечеными ДНК-зондами. Каждая пластинка может содержать несколько десятков тысяч зондов, расположенных в определенной последовательности. Метка проявляется только в спаренных двухцепочечных фрагментах. Если в исследуемом образце есть последовательности, комплементарные последовательностям зонда, то гибридизацию можно определить визуально или с помощью специальных приборов. Как правило, детекторы соединены с компьютером, то есть процедура считывания и обработки информации автоматизирована.

ПЦР в режиме реального времени основана на измерении флуоресцентного сигнала в каждом цикле амплификации. Интенсивность сигнала пропорциональна концентрации продукта ПЦР, что в сочетании с возможностью оценить кинетику процесса позволяет проводить количественное определение выбранной последовательности [43].

Для выявления продуктов амплификации в режиме реального времени используют интеркалирующие красители (например, SybrGreen I) или специфические флуоресцентные зонды (например, система TaqMan) [32, 63, 97, 172]. Метод ПЦР в режиме реального времени менее доступен, чем классический вариант ПЦР, из-за своей дороговизны. Но, тем не менее, является одним из популярных методов у исследователей для детекции интегронных структур [134, 243]. Кроме того, для детекции интегронов

используют такую разновидность ПЦР, как петлевую изотермическую амплификацию, а также метод секвенирования [114].

1.6. Заключение по обзору литературы

Клинически значимые бактерии способны вызывать разнообразные по степени тяжести инфекции: кровотока, дыхательной и нервной систем, урогенитального тракта и опорно-двигательного аппарата, особенно у госпитализированных пациентов и людей с подавленной иммунной системой. Положительная динамика терапии инфекций осложняется наличием у бактерий резистентности к применяемым АП, обусловленной молекулярно-генетическими механизмами, такими как инактивация молекул антибиотиков, модификация мишеней действия антибиотиков, активация эффлюксных насосов; изменение проницаемости клеточной стенки и активация метаболического шунта. Грамотрицательные бактерии играют большую роль в качестве возбудителей госпитальных и внегоспитальных инфекций, а также как резервуары генов антибиотикорезистентности.

Быстрое распространение резистентных к АП бактерий во всем мире ассоциировано с горизонтальным переносом генов резистентности, механизм которого основан на внутри- и межвидовом обмене мобильными генетическими элементами. Особенно значимую роль в распространении устойчивости к АП играют системы клонирования и экспрессии генов – интегроны классов 1 и 2. Интегронные структуры обладают двумя важными свойствами для обогащения бактериального генома: новый генетический материал интегрируется в бактериальный геном, новые интегрированные гены экспрессируются с сильного интегронного промотора.

На основании литературных данных, в настоящее время известно пять классов мобильных интегронов, играющих роль в распространении генов антибиотикорезистентности. Все пять классов связаны с мобильными ДНК элементами, такими как инсерционные последовательности (IS-элементы), транспозоны и конъюгативные плазмиды, которые могут служить «транспортным средством» для внутривидового и межвидового переноса интегронов.

Захват экзогенных генов является наиболее эффективным средством, с помощью которого бактериальные виды могут выживать в изменяющихся условиях, включая воздействие антимикробных препаратов. Интегроны – один из механизмов,

обеспечивающих бактерии системой захвата генов, позволяющей противостоять селективному давлению антибиотиков. Однако, общебиологическое и экологическое значение интегронов гораздо шире, чем их роль в формировании антибиотикорезистентности, поскольку захват генных кассет интегронами обеспечивает реципиентную бактерию новыми белками и новыми ферментными функциями, потенциально дающими организму адаптивные эволюционные преимущества.

На основании вышесказанного, оценка распространенности и разнообразия интегронов в геномах мультирезистентных клинических штаммов грамотрицательных бактерий представляет интерес как с клинической точки зрения, так и с точки зрения молекулярной эпидемиологии множественной лекарственной устойчивости.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Биоэтические требования

Изучаемые штаммы бактерий были получены в ходе сотрудничества с микробиологическими лабораториями ООО «Национальное агентство клинической фармакологии и фармации», г. Москва; Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва; ФГАУ «Национальный научно-практический центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава России, г. Москва; ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы»; ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Московская обл., Оболенск. В соответствии с законодательством Российской Федерации, каждый пациент при поступлении в лечебное учреждение или участник исследования подписывал информированное согласие на проведение медицинских процедур и диагностических тестов. Изучаемые штаммы в своих названиях не содержат персональных данных о пациентах, таких как фамилия, имя, этническая принадлежность, возраст, религия, гендерная принадлежность и др.

Скрининговое бактериологическое обследование сотрудников микробиологической лаборатории проведено на основании Заключения Межвузовского комитета по этике ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России № 11-18 от 20.12.2018 г.

Мониторинговое обследование пациентов нейрореанимации проведено на основании Заключения комиссии по этике Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии имени Н. Н. Бурденко № 11/2018 от 01.11.2018 г.

2.2. Микробиологические методы

2.2.1. Штаммы микроорганизмов

Клинические штаммы грамотрицательных бактерий выделены в г. Москве и других регионах России (n=2065) в 2003-2019 гг. (таблица 2.1).

Таблица 2.1 - Изучаемая коллекция клинических изолятов грамотрицательных бактерий

Учреждение	Регион	Годы выделения	Кол-во штаммов
ММА им. И.М. Сеченова	Москва*	2003-2015	110
ООО «НАКФФ»	Москва*	2003-2015	203
ФГАУ «НМИЦ НИИ им. ак. Н.Н. Бурденко»	Москва	2003-2019	1408
ГБУ «ИКБ №1» ДЗ Москвы	Москва	2003-2016	237
ФБУН «ГНЦ ПМБ»	Оболенск	2019	107
ИТОГО			2065

Примечание: «ММА им. И.М. Сеченова» - Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова - ныне Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет); ООО «НАКФФ» - Национальное агентство клинической фармакологии и фармации; ФГАУ «НМИЦ НИИ им. ак. Н.Н. Бурденко» - Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации; ГБУ «ИКБ №1» ДЗ Москвы - Государственное бюджетное учреждение «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения города Москвы; ФБУН «ГНЦ ПМБ» - Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»; * - изоляты грамотрицательных бактерий, полученных из ООО «НАКФФ» и из ММА им. И.М. Сеченова, были выделены от пациентов многопрофильных стационаров в 15 крупных городах РФ Владивосток (n=7), Воронеж (n=6), Екатеринбург (n=7), Иркутск (n=40), Казань (n=3), Краснодар (n=18), Магнитогорск (n=1), Москва (n=81), Омск (n=24), Ростов-на-Дону (n=3), Санкт-Петербург (n=70), Саратов (n=11), Томск (n=14), Уфа (n=3) и Ярославль (n=25)

В качестве референс-штаммов для определения чувствительности к АП использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 и *K. pneumoniae* ATCC 700603, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

В качестве референс-штаммов для детекции гена карбапенемазы *bla*_{NDM-1} использовали штаммы *K. pneumoniae* KPS409 и KPS410, полученные от пациентов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), г. Москва.

В качестве референс-штамма для детекции гена карбапенемазы *bla*_{KPC}

использовали штамм *K. pneumoniae* ATCC ВАА 1902, полученный из Американской коллекции типовых культур.

2.2.2. Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий

Культивирование микроорганизмов на твердых питательных средах проводили при температуре 37 °С в течение 18-24 ч., на жидких питательных средах - при 37 °С в течение 18-24 ч., при аэрации со скоростью вращения 160-180 об/мин. В работе использовали питательные среды: «Питательная среда № 1 ГРМ-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Агар Эндо-ГРМ» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «MullerHinton agar» (Himedia, Мумбаи, Индия), «Мясопептонный бульон» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Muller-Hinton broth» (Himedia, Мумбаи, Индия), «Luria Bertani broth» (Difco, Детройт, США). Хранение бактериальных культур осуществляли в 40 %-ном глицерине при температуре минус 70 °С.

2.2.3. Выделение бактерий из клинического материала

Выделение бактерий из ректальных и трахеальных мазков осуществляли высевом клинического материала «истощающим штрихом» на плотные питательные среды. Аналогичным образом проводят выделение бактерий после взятия мазка из зева. При выделении бактерий из фекалий (полученных в день исследования) готовят суспензию в физиологическом растворе для посева на плотные питательные среды. Для выделения бактерий из образцов мочи и ликвора - распределяли шпателем 0,1 мл образца по поверхности селективной плотной питательной среды «Агар Эндо-ГРМ», «Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7» или «Питательная среда № 1 ГРМ-агар». После 18-20 ч культивирования отбирали отличные друг от друга единичные колонии и пересевали их на «Питательная среда № 1 ГРМ-агар».

2.2.4. Видовая идентификация бактерий

Биохимическую идентификацию проводили на автоматическом анализаторе бактерий VITEK-2 Compact (Biomerieux, Марси Л'Этуаль, Франция) согласно инструкции производителя, с использованием карт для идентификации клинически значимых грамотрицательных палочек VITEK® 2 GN (Biomerieux, Марси Л'Этуаль, Франция).

Масс-спектрометрическим методом идентификацию осуществляли на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Штутгарт, Германия) методом прямого нанесения культуры на мишень.

2.2.5. Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) АП для изучаемых штаммов грамотрицательных бактерий определяли: с помощью автоматической системы VITEK-2 Compact (Biomérieux, Марси Л'Этуаль, Франция) в соответствии с рекомендациями производителя и с использованием карт Vitek2 AST-N 101 для чувствительности к антибиотикам грамотрицательных бактерий (Biomérieux, Марси Л'Этуаль, Франция); методом серийных микроразведений в бульоне с использованием жидкой среды «Muller-Hinton Broth» (HiMedia, Мумбаи, Индия), согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (<https://eucast.org/>) (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Антимикробные препараты, использованные в работе, и интерпретация чувствительности грамотрицательных бактерий согласно EUCAST

Антимикробные препараты	Аббревиатура	МПК, мг/л			
		Enterobacterales		НГОВ (P.a./A.b.)	
		S≤	R>	S≤	R>
Бета-лактамы					
амоксициллин-клавулановая к-та	AMC	8	8	NA	NA
амоксициллин-сульбактам	AMS	8	8	NA	NA
цефуроксим	CXM	0,001	8	NA	NA
цефоперазон-сульбактам	CFP	2	2	8	8
цефокситин	FOX	2	2	8	8
цефотаксим	CTX	1	2	8	8
цефтазидим	CAZ	1	4	8	8
цефтриаксон	CRO	1	2	NA	NA
цефепим	FEP	2	2	8	32
эртапенем	ERM	0,5	0,5	NA	NA
имипенем	IMI	2	4	2	4
меропенем	MEM	2	8	4	8
азтреонам	AZR	1	4	0,001	16
Фторхинолоны					
ципрофлоксацин	CIP	0,25	0,5	0,001	0,5/1
Аминогликозиды					
гентамицин	GEN	2	2	4	4
тобрамицин	TOB	2	2	2	2
амикацин	AMK	8	8	16	16
Тетрациклины					
тетрациклин значения	TET	8	8	8	8
доксциклин	DOC	8	8	8	8
тигексиклин	TGC	0,5	0,5	4	4
Фениколы					
хлорамфеникол	CHL	8	8	NA	NA
Сульфаниламиды					
триметоприм/сульфаметоксазол	TMP/SMX	80	80	80	80

Продолжение таблицы 2.2

Антимикробные препараты	Аббревиатура	МПК, мг/л			
		<i>Enterobacterales</i>		НГОВ (<i>P.a./A.b.</i>)	
		S≤	R>	S≤	R>
Полипептиды					
колистин	CST	2	2	2	2
Нитрофураны					
нитрофурантоин	NIT	64	64	NA	NA

Примечание: АП – антимикробные препараты; EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/); НГОВ – неферментирующие грамотрицательные бактерии; *P.a./A.b.* – *Pseudomonas aeruginosa/Acinetobacter baumannii*; S – чувствительность; R – устойчивость; NA (Not applicable) – неприменимо

2.2.6. Стринг-тест

Наличие признака гипермукоидности у чистых культур определяли с помощью стринг-теста, как описано у Shon et al. [198]. Бактериальные культуры выращивали в течение 18-20 ч при температуре 37 °C на плотных питательных средах с добавлением 5 % эритроцитов барана. Тест считали положительным, если бактериальная колония тянулась за бактериологической петлей на расстояние более 5 мм.

2.3. Молекулярно-генетические методы

2.3.1. Подготовка термолизатов бактериальных клеток

В качестве матрицы для проведения ПЦР в работе использовали клеточные термолизаты. Бактериологическую петлю ночной бактериальной культуры суспендировали в 0,1 мл лизирующего раствора (0,25 % SDS, 0,05 M NaOH) до концентрации 10^8 - 10^9 колониеобразующих единиц в миллилитре (КОЕ/мл) в пробирках вместимостью 1,5 мл типа Eppendorf. Пробы прогревали при температуре 98-100 °C на водяной бане или в твердотельном термостате 15-30 мин, в каждую пробирку добавляли 0,9 мл деионизованной воды, пробы центрифугировали при 13000 g в течение 2 мин при температуре 4 °C. Супернатант отбирали в стерильные микропробирки и использовали в качестве матрицы 1-2 мкл для проведения реакции ПЦР.

2.3.2. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК проводили согласно классической жидкофазной методике, описанной Маниатисом с соавторами [6]: лизис щелочью проводили с помощью ресуспендирования осадка бактерий, полученного из свежесращенной культуры, Раствором I (50 mM глюкозы, 25 mM трис-HCl, pH 8,0, 10 mM ЭДТА), содержащим лизоцим в концентрации 5 мг/мл. Далее добавляли Раствор II (0,2 н. NaOH,

1 % SDS) и инкубировали во льду в течение 10 мин. Затем добавляли Раствор III (5М ацетат калия, pH 4,8) и также инкубировали во льду в течение 10°мин. Смесь центрифугировали при 20000 g в течение 20 мин при 4 °С. Надосадочную жидкость переносили в новые стерильные пробирки и осаждали ДНК изопропанолом и промывали 70 % этанолом. Высушивали осадок и растворяли в ТЕ-буфере (pH 8,0).

2.3.3. Выделение геномной ДНК для полногеномного секвенирования

Выделение ДНК для полногеномного секвенирования проводили методом СТАВ [223].

2.3.4. Полимеразная цепная реакция в классическом режиме

Амплификацию ДНК проводили на приборе «Терцик» (ДНК-Технология, Москва, Россия) с использованием реактивов Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США: 10×*Taq*-буфера с аммонием сернокислым ((NH₄)₂SO₄); 25 mM раствора хлорида магния (MgCl₂); 10 mM раствор смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ); рекомбинантной *Taq*-полимеразы с концентрацией 5 ед/мкл; рекомбинантной *Pfu* полимеразы с концентрацией 5 ед/мкл. ПЦР проводили в 30 мкл реакционной смеси, для каждого образца содержащей: 2,5 мкл 10×*Taq*-буфера с (NH₄)₂SO₄; 2,0 mM MgCl₂; 0,2 mM каждого дНТФ; 5 μM каждого праймера, 0,8 ед. *Taq*-полимеразы или, в случае наработки ампликона для дальнейшего секвенирования, смеси *Taq*- и *Pfu*-полимераз (20:1) и 1-2 мкл матрицы ДНК. В пробирку с отрицательным контролем реакции ДНК не вносили. ПЦР проводили при температурно-временном режиме, описанном в таблице 2.3.

Таблица 2.3 — Режим амплификации ПЦР в классическом режиме

Этап реакции	Описание	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	Начальная денатурация	+94 °С – 2 мин	1
2	Денатурация	+94 °С – 45 сек	30
	Отжиг	+58 °С* – 30 сек	
	Элонгация	+72 °С – 40 сек	
3	Завершающая элонгация	+72 °С – 10 мин	1
4	Хранение	+10 °С	

Примечание: * – температура отжига зависит от используемого праймера

Значения температур, оптимальных для каждой пары специфических праймеров, указаны в таблице 2.4.

Визуализацию продуктов реакции осуществляли с помощью электрофореза в 0,7 %, 1,0 % или 1,5 %-ном агарозном геле в 0,1 М трис-ЭДТА-боратном электродном буфере (121,1 г Трис, 50 г борной кислоты и 80 мл 250 mM ЭДТА с pH 8,1-8,3.) в

электрофоретической камере Sub-Cell 192 (Bio-RAD, Геркулес, США) с добавлением красителя 6×Orange LD DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Гель окрашивали раствором 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Молекулярную массу амплифицированного продукта определяли, сопоставляя с расположением бэндов маркеров молекулярных масс 100bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Гель-документацию проводили с использованием прибора Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-RAD, Геркулес, США) в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм.

Таблица 2.4 — Праймеры, использованные в исследовании, для проведения ПЦР в классическом режиме

Ген	Температура отжига, °C	Название праймера	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Источник
<i>bla_{SHV}</i>	56	SHV-F	atgcgttatattcgctgtg	731	[173]
		SHV-R	tgcttggtattcgggcca		
<i>bla_{TEM}</i>	58	TEM dir	atgagattcaacatttccg	873	[173]
		TEM rev	ctgacagtaccaatgctta		
<i>bla_{CTX-M}</i>	58	CTX-M-Fext	tttgcgatgtgcagtaccagtaa	544	[69]
		CTX-M-R1	ctccgctgccggtttatc		
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	58	OXA-48A	ttgggtggcatcgattatcgg	744	[69]
		OXA-48B	gagcacttctttgtgatggc		
<i>bla_{NDM-1}</i>	55	NDM1-F	gaagctgagcaccgcattag	758	[69]
		NDM1-R	gggccgatgatgattgctc		
<i>bla_{VIM-2,5}</i>	66	VIM-F	tttggctgcataatcgcaacg	800	[168]
		VIM-R	ccattcagccagatcggcat		
<i>bla_{KPC-2}</i>	65	KPC-A-F	tgctactgtatcgccgtc	552	[235]
		KPC-A-R	gtcagtgctctacagaaaacc		
<i>int1</i>	60	IntI1-F	ggccaaggatctggatttcg	483	[177]
		IntI 1-R	acatgcgtgtaaatcatcgctc		
<i>intl1</i>	60	5'CS	ggcatccaagcacaagc	вариабельный	[105]
		3'CS	aagcagacttgactgat		
<i>int2</i>	60	IntI2-F	cacggatatgcgacaaaaaggt	788	[54]
		IntI2-R	gtagcaaacgagtgcgaaat		
<i>intl2</i>	60	attI2-5'	gacggcatgcacgatttgta	вариабельный	[131]
		orfX-R	gatgccatcgcaagtacgag		
<i>ompK36</i>	57	ompK36-F	gaagggtaatcagtaagcagtggc	1186	[199]
		ompK36-R	gcgtgcttagaactggtaaac		

2.3.5. Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

Для детекции генов интеграз и генов антибиотикорезистентности и анализа их транскрипционной активности применяли метод ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора с оптическим ПЦР-модулем CFX96 (Bio-Rad, Геркулес,

США) с использованием «Реакционной смеси для проведения ПЦР-РВ» (Синтол, Россия, Москва) по режиму амплификации, описанному в таблице 2.5.

2.3.6. Секвенирование нуклеотидных последовательностей ДНК

Секвенирование нуклеотидных последовательностей ДНК проводили методом Сэнгера с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems, США) и набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) в ООО «Синтол» (Москва, Россия). ПЦР-продукты готовили к секвенированию путем вырезания их из агарозного геля под контролем системы визуализации в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм. Для очистки продуктов амплификации использовали набор DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США).

Таблица 2.5 — Режим амплификации ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентной детекцией

Этап реакции	Описание	Температурно-временной режим	Количество циклов
1	Начальная денатурация	+95 °C – 5 мин	1
2	Денатурация	+95 °C – 30 сек	39
	Отжиг	+61 °C – 10 сек*	
	Элонгация	+72 °C – 10 сек	
3	Считывание флуоресцентного сигнала	+55 – +95 °C – каждую секунду повышается на 0,2 °C	1
4	Хранение	+10 °C	1

Примечание: * — температура зависит от температуры плавления используемых в реакции праймеров

2.3.7. Полногеномное секвенирование

Для проведения полногеномного секвенирования использовали платформы Ion Torrent PGM (Life Technologies, Карлсбад, США) и Illumina MiSeq (Illumina, Сан-Диего, США). Геномные библиотеки для штаммов были приготовлены с помощью набора реагентов для подготовки библиотек фрагментов ДНК Ion Plus Fragment Library Kit (Life Technologies, Карлсбад, США). ДНК в количестве 500 нг с помощью ультразвука (Diagenode BioRuptor, США) была расщеплена на фрагменты длиной около 400 п.н. Далее, к полученным фрагментам пришивались баркоды (уникальные молекулярные метки, по которым различаются секвенируемые геномные библиотеки) с помощью набор Ion Xpress Barcode Adapters Kit (Life Technologies, Карлсбад, США). С помощью ПЦР в реальном времени была определена концентрация геномных библиотек, по которой определяли количество библиотеки, необходимой для секвенирования. Для этого

разводили полученные библиотеки в сто раз и сравнивали с разведениями стандартной библиотеки Ion Library Quantification Kit (Life Technologies, Карлсбад, США). Эмульсионную ПЦР полученных геномных библиотек проводили с использованием Ion One Touch с набором реагентов Ion One Touch 400 Template Kit (Life Technologies, Карлсбад, США). Далее проводили очистку (селекцию) геномных библиотек с помощью Ion One Touch ES и магнитных частиц Dynabeads My One Streptavidin C1 (Life Technologies, Карлсбад, США). Далее проводили полногеномное секвенирование полученных геномных библиотек на платформе Ion Torrent PGM (Life Technologies, Карлсбад, США) с использованием чипа Ion 318™ Chip Kit (Life Technologies, Карлсбад, США) и набора Ion PGM 400 Sequencing Kit (Life Technologies, Карлсбад, США). Секвенирование штаммов проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, Сан-Диего, США) согласно инструкции производителя.

Полученные риды (короткие секвенированные последовательности) были собраны *de novo* с помощью программы Unicycler v 0.4.7 с параметрами по умолчанию [222]. Аннотация собранных геномов была проведена при помощи сервера NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [212].

2.4. Биоинформатические методы

2.4.1. Дизайн олигонуклеотидных праймеров

Дизайн последовательностей олигонуклеотидных праймеров проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI9 (Invitrogen, Карлсбад, США) с использованием последовательностей данного гена, представленных в базе данных GenBank. Изготовление олигонуклеотидов для исследования осуществляли в ООО «Синтол» (Москва, Россия) и в ООО «Евроген» (Москва, Россия).

2.4.2. Дизайн праймеров для ПЦР в режиме реального времени

Подбор последовательностей праймеров проводили с использованием программ GeneRunner версия 3.05 (Hastings Software Inc. Hastings, Нью-Йорк, США) и Vector NTI версия 6.0 (InforMax, Оксфорд, Великобритания). Проверку на специфичность подобранных праймеров к исследуемым областям генома проводили с помощью ресурса Primer-Blast, NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, Бетесда, США).

2.4.3. Анализ амплифицированных фрагментов ДНК

Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программ Chromas 2.6.2. (Technelysium Pty Ltd, Брисбен, Австралия) и Vector NTI9 (Invitrogen, Карлсбад, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и идентификацию генов антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий осуществляли с помощью веб-ресурса BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Нуклеотидные последовательности ДНК размещали в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.4.4. Размещение последовательностей в базе данных GenBank

Выравнивание последовательностей ДНК осуществляли при помощи алгоритма BLAST (Nucleotide BLAST) и базы данных GenBank. В ходе данной работы секвенированы и размещены в базе данных GenBank 108 последовательностей переменных участков интегронов класса 1 и 23 последовательности - интегронов класса 2, а также 58 последовательности генов бета-лактамаз с генетическим окружением, включающим в себя мобильные генетические элементы.

2.4.5. Размещение последовательностей в базе данных INTEGRALL

Проанализированные и идентифицированные последовательности структур интегронов размещали в базе данных INTEGRALL в соответствии с алгоритмом пополнения БД (<http://integrall.bio.ua.pt/?>), используя схему присвоения номенклатуры, представленную на сайте.

2.4.6. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей

Множественное выравнивание последовательностей генетических кассет антибиотикорезистентности проводили в программе Unipro UGENE (Унипро, Новосибирск, Россия), построение филогенетического дерева проводили с помощью метода «ближайших соседей» в программном обеспечении MEGA 6 (MEGA Software, Филадельфия, США).

2.5. Статистические методы

2.5.1. Стандартные статистические методы

Для анализа встречаемости интегронов, а именно: генов интеграз и наборов генетических кассет в представленных коллекциях микроорганизмов был использован пакет программного обеспечения Microsoft Excel (версия Excel 2013-15): рассчитывали

среднее значение, доверительный интервал. Данные обрабатывали статистически с использованием параметрического t-критерия Стьюдента. Для интерпретации информации путем построения графиков и рисунков использовали программное обеспечение GraphPad Prism (Сан-Диего, Калифорния, США). Результаты статистического анализа считали значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. ДЕТЕКЦИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНТЕГРОНОВ КЛАССОВ 1 И 2 В КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММАХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ В 2003-2015 ГГ.

3.1. Фенотипическая и генетическая характеристики изолятов возбудителей госпитальных инфекций

Клинические изоляты грамотрицательных бактерий (n=1248), в том числе *P. aeruginosa* (n=320), *K. pneumoniae* (n=271), *Acinetobacter baumannii* (n=232), *E. coli* (n=191), *Enterobacter* spp. (n=132), *Proteus* spp. (n=67), *Citrobacter freundii* (n=13), *Serratia* spp. (n=8), *Morganella morganii* (n=7), *Salmonella enterica* (n=2), *Achromobacter xylosoxidans* (n=2), *Providencia* spp. (n=2), *Shigella flexneri* (n=1), выделены из дыхательной системы (n=493), мочевыделительной системы (n=379), хирургических ран (n=159), пищеварительного тракта (n=77), крови (n=60), нервной системы (n=28), кожи и слизистых (n=15) от пациентов многопрофильных стационаров города Москвы и других регионов РФ в 2003-2015 гг., а также из госпитальной среды (n=37). Поскольку источниками выделения большей части изолятов были дыхательная и мочевыводящая системы, это может указывать на то, что инфицирование пациентов было ассоциировано с использованием системы искусственной вентиляции легких и наличием уретральных катетеров (рисунки 3.1-3.2).

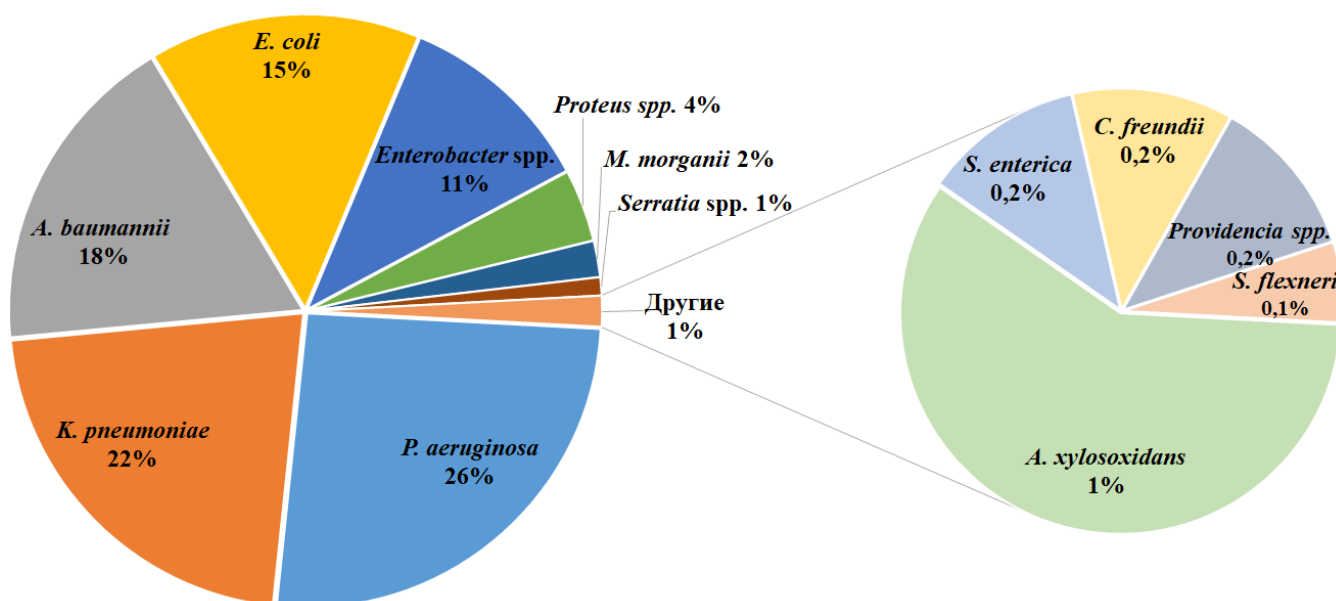


Рисунок 3.1 – Видовой состав изучаемой коллекции клинических изолятов (n=1248), выделенных в 2003-2015 гг.

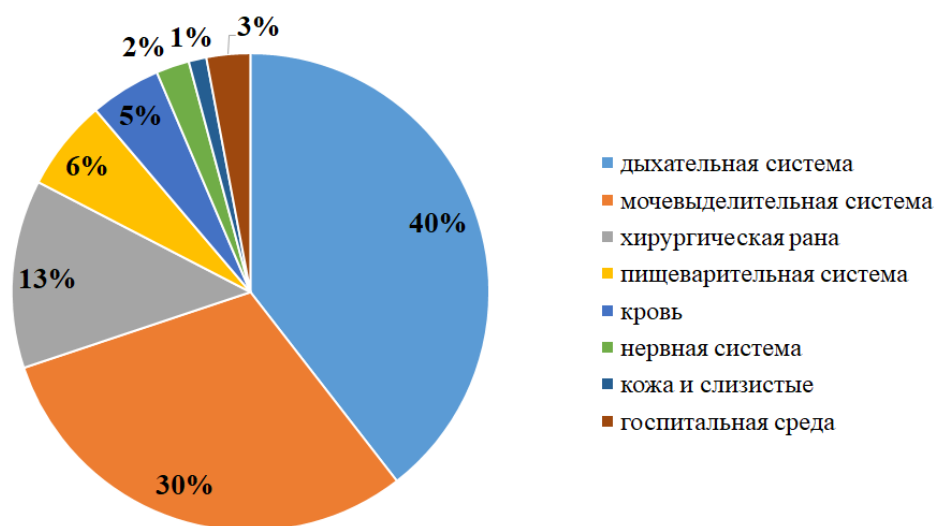
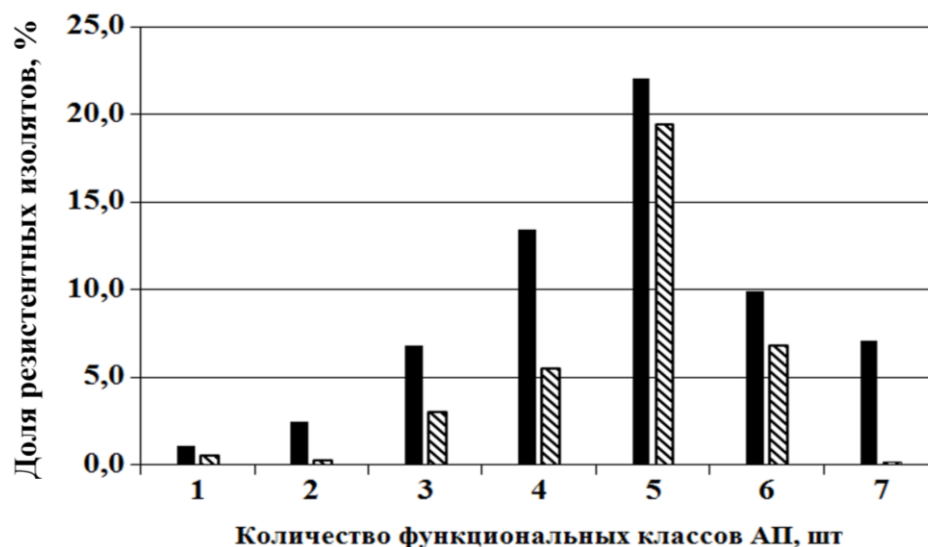


Рисунок 3.2 – Источники выделения клинических изолятов (n=1248), выделенных в 2003-2015 гг.

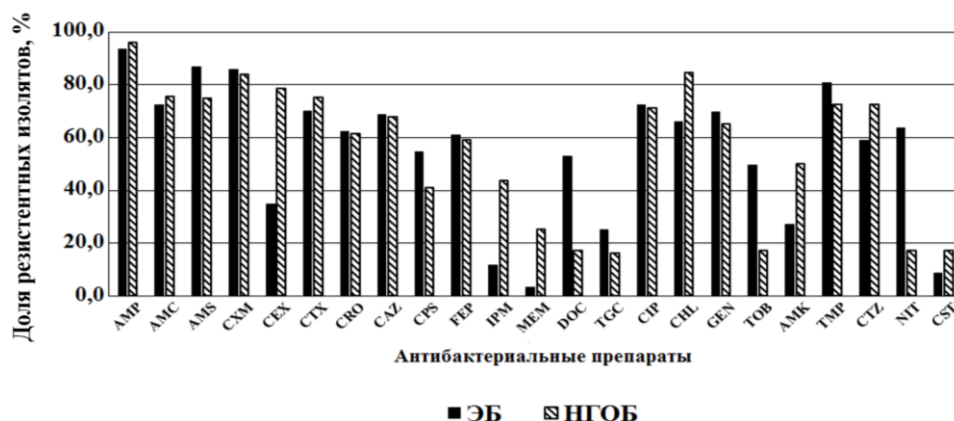
У 84 % изолятов изучаемой коллекции был выявлен фенотип МЛУ – нечувствительность хотя бы к одному препарату из ≥ 3 антимикробных функциональных групп, в соответствии с классификацией Magiorakos et al. [133]. Среди МЛУ-изолятов 10 % были устойчивы к 3 функциональным группам препаратов, 19 % – к четырем, 42 % – к пяти, 17 % – к шести, 7 % – к семи (рисунок 3.3).



АП – антимикробные препараты; ЭБ – бактерии порядка *Enterobacterales*,
НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

Рисунок 3.3 – Доля изолятов, устойчивых одновременно к нескольким функциональным классам антимикробных препаратов

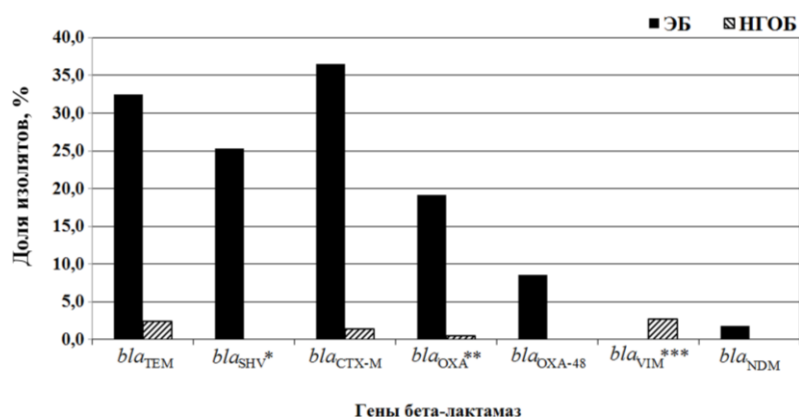
Анализ чувствительности к антимикробным препаратам показал преобладание штаммов, устойчивых к бета-лактамам, в том числе к пенициллинам (99 % изолятов), цефалоспорином (95 %) и карбапенемам (20 %); к аминогликозидам (87 %), хлорамфениколу (74 %) и сульфаниламидам (72 %) (рисунок 3.4).



AMP – ампициллин; AMC – амоксициллин/клавулановая кислота; AMS – амоксициллин-сульбактам; CXM – цефуроксим; CEX – цефокситин; CTX – цефотаксим; CRO – цефтриаксон; CAZ – цефтазидим; CFP – цефоперазон-сульбакта; FEP – цефепим; IPM – имипенем; MEM – меропенем; DOC – доксициклин; TGC – тигециклин; CIP – ципрофлоксацин; CHL – хлорамфеникол; GEN – гентамицин; TOB – тобрамицин; AMK – амикацин; TMP – триметоприм; CTZ – котримоксазол; NIT – нитрофурантоин; CST – колистин; АП – антимикробные препараты; ЭБ – бактерии порядка *Enterobacteriales*, НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

Рисунок 3.4 – Доля изолятов грамотрицательных бактерий, устойчивых к антимикробным препаратам

Большая доля изолятов были устойчивы к препаратам резервного ряда: 22 % изолятов - к тигециклину, 27 % изолятов - к имипенему, 38 % изолятов - к амикацину, 14 % изолятов - к колистину. Доля устойчивых изолятов к карбапенемам (имипенему и меропенему) в изучаемой нами коллекции составила 27 % и 19 % изолятов, соответственно. Высокий уровень устойчивости изучаемых изолятов к бета-лактамам - пенициллинам, цефалоспорином и карбапенемам - был ассоциирован с наличием у них генов бета-лактамаз типов *bla*_{TEM} (35 % штаммов), *bla*_{SHV} (25 %), *bla*_{CTX-M} (38 %), *bla*_{OXA} (31 %), *bla*_{VIM} (3 %) и *bla*_{NDM} (2 %) (рисунок 3.5).



* - гены *bla*_{SHV}-типа выявлены только у *K. pneumoniae*; ** - гены *bla*_{VIM}-типа выявлены только у *P. aeruginosa*; *** - гены *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-40}-, *bla*_{OXA-23}- и *bla*_{OXA-51}- типов) выявлены только у *A. baumannii*; ЭБ – бактерии порядка *Enterobacteriales*, НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

Рисунок 3.5 – Представленность генов бета-лактамаз в изолятах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг.

Для разных видов бактерий были характерны разные наборы генов бета-лактамаз. Так, гены *bla*_{SHV}-типа детектированы только у *K. pneumoniae* (92 % изолятов); гены *bla*_{VIM}-типа – только у *P. aeruginosa* (17 %); гены *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-40}-, *bla*_{OXA-23}- и *bla*_{OXA-51}-типов) – только у *A. baumannii* (88 %). Ген карбапенемазы *bla*_{OXA-48} [GenBank KP056311], ассоциированный с устойчивостью к карбапенемам (эртапенему), а также интегрон класса 1, детектированы только у одного изолята *E. cloacae* B-1530/14. Было показано, что изолят *E. cloacae* B-1530/14 получил данные гены на конъюгативной плазмиде группы несовместимости IncL/M с маркерами *repA* и *traU* в результате горизонтального переноса от *K. pneumoniae*, циркуляция которых была зарегистрирована в отделении нейрореанимации г. Москвы на протяжении 2013-2014 гг. Данное наблюдение имело научную новизну, поскольку *bla*_{OXA-48} – позитивные изоляты *E. cloacae* были описаны в Европе начиная с 2012 г., а в России до нашего исследования не были описаны. *E. cloacae* относится к числу возбудителей госпитальных инфекций, представляющих опасность из-за возможности формирования полирезистентных клонов [81].

В ходе данной работы в изучаемой коллекции изолятов были выявлены 842 интегрона, в том числе класса 1 - 737 интегронов (59 % изолятов) и класса 2 - 105 интегронов (8 % изолятов). При этом интегроны были детектированы в 43 % представителей порядка *Enterobacterales* и в 25 % изолятов НГОВ. Наибольшее количество интегронов класса 1 было выявлено у *E. coli*, *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, а интегронов класса 2 - у *P. mirabilis*. Для сравнения, в базе данных GenBank интегроны класса 1 (n=62597) также были существенно более распространены на дату 10.03.2018 г., по сравнению с интегронами класса 2 (n=2410).

В нашем исследовании большая часть интегронов класса 1 (54 %) и интегронов класса 2 (88 %) содержали в своей варибельной части наборы генных кассет, ассоциированные с устойчивостью изолятов к аминогликозидам, хлорамфениколу, сульфаниламидам и бета-лактамам, а также кассеты *orf*, кодирующие белки с неизвестными функциями. Кроме того, идентифицированы интегроны класса 1 без генных кассет в варибельном регионе, что может рассматриваться как «резерв» накопления генетических детерминант антибиотикорезистентности в будущем.

3.2. Распространенность генных кассет интегронов классов 1 и 2 в изолятах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг.

Представленность наборов генных кассет. В ходе исследования выявлено 22 варианта наборов генных кассет в интегронах 1 класса и 4 варианта – в интегронах 2 класса (рисунок 3.6). Интегроны класса 1 имели наборы, состоящие из 1 генной кассеты (*aacA4*; *aadA1*; *aadA2*; *aadB*; *bla_{PSE-1}*; *dfrA7*; *estX*), из 2 генных кассет (*aacA4-cmlA1j*; *aacA4-orfD*; *aadA6-orfD*; *aadB-aadA1y*; *aadB-catB3*; *blaOXA30-aadA1*; *dfrA17-aadA5*; *dfrA1-aadA1*; *dfrA1-orfC*; *dfrA5-ereA2*), из 3 генных кассет (*aacA7-smr2-orfD*; *dfrA12-orfF-aadA2*; *dfrA12s-orfF-aadA2*) и из 4 генных кассет (*aacC1-orfX-orfY-aadA1*; *orfD2-aacA4'-17-orfE14-catB8*). Интегроны класса 2 содержали наборы из 2 генных кассет (*dfrA1-sat2*) и 3 генных кассет (*dfrA12-sat2-aadA1*; *dfrA1-IS911-sat1-aadA1*; *dfrA1-sat2-aadA1*). В базе данных GenBank на дату 10.03.2018 г. наиболее представлены интегроны, несущие 1 генную кассету (n=33120) и 2 генные кассеты (n=28537), а менее представлены – несущие 3 кассеты (n=413) и 4 кассеты (n=527). У интегронов класса 2 описаны наборы с 2 генными кассетами (n=1302) и с 3 генными кассетами (n=1108). В нашем исследовании наиболее представлены кассеты: *dfrA17-aadA5*; *dfrA12-orfF-aadA2*; *aadA1*; *aacC1-orfX-orfY-aadA1*; *dfrA1-orfC*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA6-orfD*; *aadB-aadA1y* и *dfrA1-aadA1* интегронов класса 1 и один набор генных кассет *dfrA1-sat2-aadA1* интегронов класса 2. В базе данных GenBank наиболее представленными были интегроны классов 1: *aadB*; *aadB-aadA1y*; *blaOXA30-aadA1*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA2*; *estX* и *dfrA17-aadA5*, и интегроны класса 2 *dfrA1-sat2*. Пять наборов генных кассет отнесены к наиболее представленным как в нашей коллекции, так и в базе данных GenBank: *dfrA17-aadA5*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadB-aadA1y* (таблица 3.1).

Представленность генных кассет. Нами идентифицированы 31 генная кассета, наиболее распространенными среди которых были *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *orfF*, *sat1*, *aacA4* и *orfC*. В базе данных GenBank на дату 10.03.2018 г. наиболее распространенными у бактерий были генные кассеты *aadB*, *aacA4*, *aacC1*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *bla_{VIM-2}*, *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12*, *orfC*, *orfE*, *orfY* и *sat1*, а менее распространенными – *aacA1*, *aadA6*, *aadA7*, *bla_{PSE1}*, *dfrB4*, *ereA2*, *smr2* и *dfrA12s*. Девять генных кассет, отнесенных к наиболее распространенным в нашей коллекции, также были широко представлены в базе данных GenBank: *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *sat1*, *aacA4* и *orfC* (таблица 3.2).

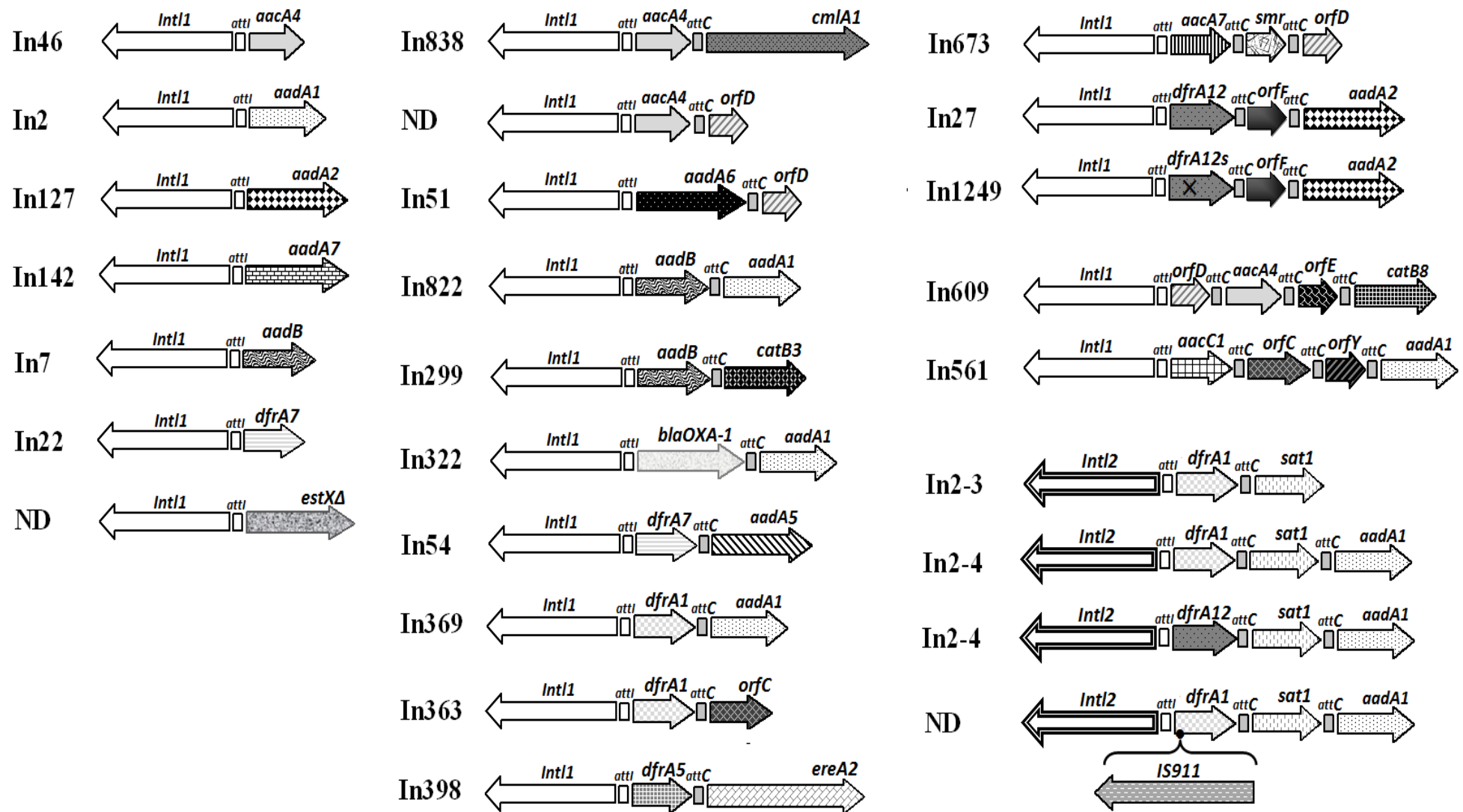


Рисунок 3.6 – Варианты наборов генных кассет в интегронах классов 1 и 2, детектированные в изолятах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг.

Таблица 3.1. Сравнение представленности интегронов классов 1 и 2, идентифицированных в изучаемых изолятах грамотрицательных бактерий, по сравнению с таковой в базе данных GenBank на дату 10.03.2018 г.

Класс интегрона	Набор генных кассет	INTEGRALL	Номер размещенной нуклеотидной последовательности набора генных кассет в базе данных GenBank	Доля в коллекции, %	Доля в БД GB, %
1	<i>dfrA17-aadA5</i>	In54	GQ896493, GQ896494, GQ896495, GQ896496, GQ896497, GQ896498, GQ896499, GQ896500, GQ896501, GU055937, KF952266, KJ579283, KM009102, KM085438, KP713389, KP713390, KP713391, KP789947, KP789950, KP902673, KR610432, KT175892, KT175893, KT175894, KT175895, KT305944, KT305945, KT305943, KT316804, KT316805, KU860565	26,72	1,78
1	<i>dfrA12-orfF-aadA2</i>	In27	GQ924762, GQ924763, GQ924764, GQ924765, GQ924766, GQ924767, GU001949, HM043572, HM043573, HM043574, HM569734, KJ363320, KM009101, KM236804, KP789948, KP796139, KP902672, KP965723, KR610433	16,38	0,29
2	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	In-2-4	HM043575, HM043576, HM043577, KJ633801, KM009106, KM009107, KM085439, KM085440, KP271998, KP713393, KP796140, KP965725, KT175896, KT316806, KT316807, KX274124	13,79	1,6
1	<i>aadA1</i>	In2	GQ924774, GQ924775, GQ924776, GQ924777, KP789949, KP902674, KU860564	6,03	9,72
1	<i>aacC1-orfX-orfY-aadA1</i>	In561	KM009103, KM009104, KM009105, KR610434	3,45	0,07
1	<i>dfrA1-orfC</i>	In363	KC862254, KC862255, KC862256, KF971879	3,45	0,11
1	<i>aacA4</i>	In46	HQ832472, HQ832473, JN003857	2,59	8,7
1	<i>aacA4-cmlA1j</i>	In838	HM043570, HM043571, HM569733	2,59	8,7
1	<i>aadA6-orfD</i>	In51	HQ832477, KP713392, KU870999	2,59	0,06
1	<i>aadB-aadA1y</i>	In822	HQ914241, KU901703, KY885012	2,59	21,32
1	<i>dfrA1-aadA1</i>	In369	GQ924770, KR610435, KT305946	2,59	0,01
1	<i>aacA7-smr2-orfD</i>	In673	HQ832478, HQ832479	1,72	0
1	<i>aadB</i>	In7	GQ924772, GQ924773	1,72	21,32
1	<i>bla_{OXA30}-aadA1</i>	In322	GQ924769, JN003856	1,72	9,56
2	<i>dfrA1-sat2</i>	In2-3	KP796141, KP796142	1,72	1,9
1	<i>aacA4-orfD</i>	ND	GQ924771	0,86	0,06
1	<i>aadA2</i>	In127	GU001948	0,86	7,29
1	<i>aadA7</i>	In142	HQ832475	0,86	0,22
1	<i>aadB-catB3</i>	In299	HQ914240	0,86	0,06
1	<i>blaPSE1</i>	In167	HQ832476	0,86	0,02
1	<i>dfrA12s-orfF-aadA2</i>	In1249	KT316808	0,86	0,31
1	<i>dfrA5-ereA2</i>	In398	GQ924768	0,86	0,02
1	<i>dfrA7</i>	In22	KP789951	0,86	1,34
1	<i>estX</i>	ND	KP965724	0,86	4,82
1	<i>orfD2-aacA4'-17- orfE14-catB8</i>	In609	HM485586	0,86	0,7
2	<i>dfrA12-sat2-aadA1</i>	In-2-4	KJ579284	0,86	0,02
2	<i>dfrA1-IS911-sat1-aadA1</i>	ND	HM592262	0,86	0

Примечание. ND — номер интегрона не определен; БД – база данных

Таблица 3.2. Представленность генных кассет в изучаемых изолятах грамотрицательных бактерий, по сравнению с таковой в базе данных GenBank на дату 10.03.2018 г.

Генная кассета	Кодируемый фермент	Фенотип устойчивости	Доля в коллекции, %	Доля в БД GB, %
<i>aadA1</i>	Аминогликозид (3) аденилилтрансфераза	STR, SPE	12,98	8,24
<i>dfrA7 (dfrA17)</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип А	THR	12,60	2,95
<i>aadA5</i>	Аминогликозид (3) аденилилтрансфераза	STR, SPE	11,83	1,77
<i>dfrA1</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип А	THR	9,92	5,28
<i>aadA2</i>	Аминогликозид (3) аденилилтрансфераза	STR, SPE	8,02	6,26
<i>dfrA12</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип А	THR	7,63	3,28
<i>orfF</i>	Гипотетический белок	НИ	7,63	1,18
<i>sat1(sat2)</i>	Стрептотрицин-ацетилаза	STT	7,63	5,7
<i>aacA4</i>	Аминогликозид (6') ацетилтрансфераза	AG	3,05	10,02
<i>orfC (orfX)</i>	Гипотетический белок	НИ	3,05	8,05
<i>orfD</i>	Гипотетический белок	НИ	2,67	1,17
<i>aadB</i>	Аминогликозид (2'') аденилилтрансфераза	STR, SPE	2,29	17,95
<i>aacC1</i>	Аминогликозид (3) ацетилтрансфераза	AG	1,53	2,26
<i>orfY</i>	Гипотетический белок	НИ	1,53	4,86
<i>aadA6</i>	Аминогликозид (3) аденилилтрансфераза	STR, SPE	1,15	0,32
<i>cmlA1</i>	Хлорамфеникол-экспортер	CM	1,15	1,15
<i>aacA7</i>	Аминогликозид (6') ацетилтрансфераза	AG	0,76	0,82
<i>bla_{OXA} (bla_{OXA30})</i>	Бета-лактамаза класса D OXA-типа	BL	0,76	0,48
<i>smr2</i>	Небольшой белок множественной резистентности	BL, AG, CM, THR, QNL	0,76	0,23
<i>bla_{PSE-1}</i>	Металло-бета-лактамаза класса B PSE-типа	BL	0,38	0,03
<i>catB3</i>	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	CM	0,38	0,84
<i>catB8</i>	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	CM	0,38	0,86
<i>dfrA5</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип А	THR	0,38	0,55
<i>ereA2</i>	Эритромицин-эстераза	ERI	0,38	0,04
<i>orfE</i>	Гипотетический белок	НИ	0,38	1,91
<i>estX</i>	Эстераза	Инсектициды	0,38	4,06
<i>dfrA12s</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип А	THR	0,38	0
<i>aacA1</i>	Аминогликозид (6') ацетилтрансфераза	AG	0,00	0,14
<i>aadA7</i>	Аминогликозид (3) аденилилтрансфераза	STR, SPE	0,00	0,18
<i>bla_{VIM-2}</i>	Металло-бета-лактамаза класса B VIM-типа	BL	0,00	9,33
<i>dfrB4</i>	Дигидрофолат-редуктаза тип В	THR	0,00	0,07

Примечание. AG — аминогликозиды, BL — бета-лактамы, CM — хлорамфеникол, ERI — эритромицин, НИ — неизвестно, SPE — спектиномицин, STR — стрептомицин, STT — стрептотрицин, THR — триметоприм, QNL — фторхинолоны, БД – база данных

Интересно отметить, что в исследовании итальянских авторов 2009 г. наиболее представленными генными кассетами были: *aadA1* (259 ссылок), *aacA4* (204 ссылки), *dfrA1* (162 ссылки), *aadA2* (150 ссылок) и *aadB* (89 ссылок), то есть за прошедшие 9 лет представленность этих генных кассет в базе данных GenBank увеличилась в 25, 40, 27, 34 и 164 раза, соответственно [157].

3.3. Новые интегронные структуры, выявленные в ходе исследования

In1249. В клиническом штамме *E. coli* I-7433, выделенном из мочи пациента в стационаре Москвы в 2014 г., идентифицирован новый интегрон класса 1, которому в базе данных INTEGRALL присвоен номер In1249. Секвенирование вариабельной части этого интегрона выявило наличие трех генных кассеты (*dfrA12s-orfF-aadA2*), причем генная кассета *dfrA12s* [KT316808] является новым аллелем гена, кодирующего дигидрофолат редуктазу, которая обеспечивает устойчивость к триметоприму. Анализ первичной структуры гена показал наличие значимой нуклеотидной замены T305C, которая привела к аминокислотной замене Val102Ala в составе кодируемого фермента (рисунок 3.7).

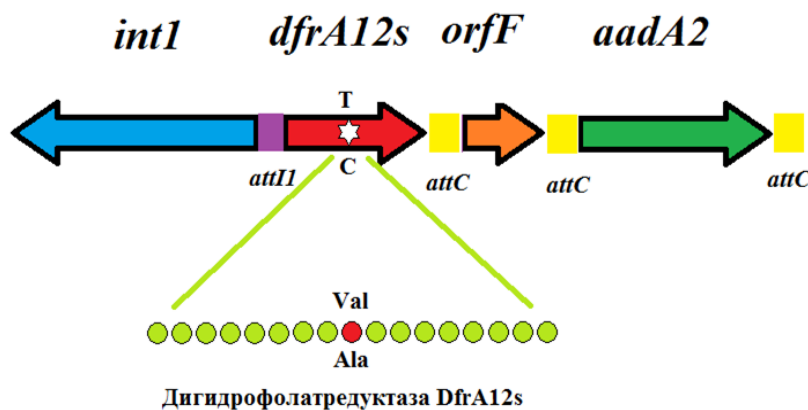


Рисунок 3.7 – Структура нового интегрона In1249 в штамме *E. coli* I-7433 [GenBank KT316808]

In1379. В геноме штамма *P. aeruginosa* t9P1, выделенном из трахеи пациента, находящегося на искусственной вентиляции легких в 2015 г., несущего ген *bla*_{CTX-M-15}, выявлен также новый интегрон класса 1 с набором генных кассет (*aadA6:ISPa21-orfD*), в котором в генную кассету аминогликозидаденилил-трансферазы *aadA6* встроился IS элемент ISPa21 в ориентации, противоположной направлению транскрипции поврежденного гена. Этому новому интегرون

специализированной базой данных INTEGRALL присвоен индивидуальный номер In1379 (рисунок 3.8).

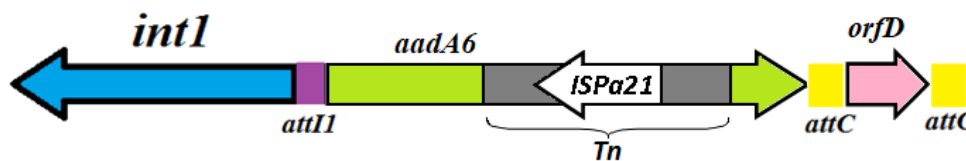


Рисунок 3.8 – Структура нового интегрона In1379 в штамме *P. aeruginosa* B-2113P/15 [GenBankKX870013]

In1360. В штамме *P. aeruginosa* B-1384P/15, выделенном из эндотрахеального аспирата от пациента нейрохирургического ОПИТ 27.07.2015 г., описан новый интегрон класса 1, которому базой INTEGRALL присвоен номер In1360. Варибельная часть этого интегрона состоит из набора четырех генных кассет: новой генной кассеты *orfNC* с неизвестной функцией, которой в базе данных INTEGRALL присвоено наименование *gcu87*; генной кассеты *aadB*, кодирующей аминогликозид-2'-аденилтрансферазу (aminoglycoside 2'-adenyltransferase); нового аллеля *aphA15d* генной кассеты *aphA15* (по данным базы данных INTEGRALL), детерминирующей аминогликозидфосфо-трансферазу (aminoglycosidephosphotransferase), и генной кассеты *aadA1a*, кодирующей аминогликозид аденилтрансферазу (aminoglycosideadenyltransferase) (рисунок 3.9).



Рисунок 3.9 – Структура нового интегрона In1360 в штамме *P. aeruginosa* B-1384P/15 [GenBankKX218442]

Видимо, данный интегрон внес свой вклад в фенотип антибиотикорезистентности штамма *P. aeruginosa* B-1384P/15, который характеризовался устойчивостью к 7 функциональным классам антимикробных препаратов: бета-лактамам (амоксциллину/клавулановой кислоте, амоксциллину/сульбактаму, цефуроксиму, цефотаксиму), фторхинолонам (ципрофлоксацин), аминогликозидам (гентамицину), сульфаниламидам (триметоприму и котримоксазолу), тетрациклинам (тигексиклин), нитрофурантоину

хлорамфениколу; был чувствителен к бета-лактамам (цефтазидиму, цефоперазону/сульбактаму, цефепиму и имипенему), к аминогликозидам (амикацину) и полимиксинам (колистину). Новая генная кассета *gcu87* (487 п.н.) занимает первое место в наборе генных кассет варибельного участка интегрона, содержит открытую рамку считывания размером 405 п.н., которая не имеет аналогов в базе данных GenBank. Трансляция нуклеотидной последовательности открытой рамки считывания *in silico* позволила определить аминокислотную последовательность (134 а.к.) нового гипотетического белка. Наибольшая степень идентичности данной белковой последовательности в базе данных белковых последовательностей GenBank обнаружена с последовательностями гипотетических белков псевдомонад *P. hussainii* (55 %), *P. caeni* (43 %) и *P. pohangensis* (43 %). Для вида *P. aeruginosa* подобных белковых последовательностей не обнаружено.

In1375. В штамме *P. aeruginosa* B-2175P/15, выделенном 30.11.2015 г. из мочи пациента, идентифицирован новый интегрон класса 1. Секвенирование варибельного участка интегрона показало, что в его составе находятся 2 генные кассеты: ранее не описанная кассета (1236 п.н.) с неизвестной функцией и кассета аминогликозидацетилтрансферазы *aacA4* (639 п.н.), определяющая устойчивость к аминогликозидам. Поиск в базе данных GenBank не выявил гомологичных последовательностей ДНК с первичной последовательностью новой кассеты. Поиск по аминокислотной последовательности, кодируемой данным геном, показал, что в базе данных белковых последовательностей присутствуют 5 бета-лактамаз класса А с идентичностью более 70 %: в штамме *Cellvibrio* sp. (GB WP_087466909.1) — 83 % идентичности, в штамме *Cellvibrio* sp. (GB PSBB023) — 82 % идентичности, в штамме *Pseudoxanthomonas suwonensis* (GBWP_052629552.1) — 78 %, в штамме *Alishewanella aestuarii* (GBWP_008607360.1) — 72 % и в штамме *Alishewanella* sp. HH-ZS (GB WP_065956549.1) — 71 % идентичности. Результат поиска позволил сделать вывод, что новая генная кассета содержит ген новой бета-лактамазы класса А, который нами был обозначен *bla_{PBL-1}*. Новый интегрон размещен в базе данных GenBank [GenBank KY171972] и в специализированной базе данных INTEGRALL, где интегرونу присвоен идентификационный номер In1375, подтверждено наличие новой генной кассеты и утверждено ее наименование *bla_{PBL-1}* (рисунок 3.10).

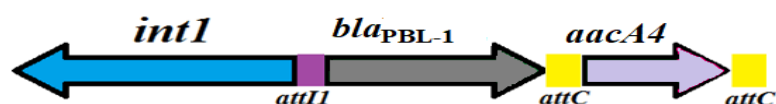


Рисунок 3.10 – Структура нового интегрона In1375 в штамме *P. aeruginosa* B-2175P/15 [GenBankKY171972]

Кроме того, последовательность KY171972, сравниваемая с использованием ресурса BLAST с размещенными нуклеотидными последовательностями в базе данных GenBank, была идентична всего лишь от 36 % до 62 % на плаزمидных геномах бактерий видов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* и представителей *Enterobacter* spp. и *Citrobacter* spp.

Фенотип штамма *P. aeruginosa* B-2175P/15 характеризуется устойчивостью к 6 функциональным классам антимикробных препаратов — ко всем использованным бета-лактамам, фторхинолонам (ципрофлоксацину), аминогликозидам (гентамицину, нетилмицину, амикацину), сульфаниламидам (триметоприму, котримоксазолу), нитрофурантоину, фосфомицину, и чувствительностью только к колистину. Новая кассета содержит рамку считывания размером 903 п.н., которая кодирует белковую последовательность 300 а.к. Сравнение аминокислотной последовательности, транслируемой с гена *bla_{PBL-1}*, с наиболее близкой последовательностью бета-лактамазы класса А с 83 % идентичности показало, что они отличаются по 52 аминокислотам, локализованным практически по всей длине последовательностей, что указывает на существенные различия этих структур.

Таким образом, в госпитальном штамме *P. aeruginosa* идентифицирован новый интегрон класса 1, несущий новую, не описанную ранее генную кассету, которая кодирует новую бета-лактамазу класса А.

In2-IS911. В клиническом штамме *S. flexneri* Y-5, выделенном во время вспышки дизентерии в Якутске в 2010 г., идентифицирован новый интегрон класса 2, в котором структура генной кассеты *dfrA1* нарушена вставкой последовательности IS911 (1256 п.н.) (рисунок 3.11).



Рисунок 3.11 – Структура нового интегрона класса 2 в штамме *S. flexneri* Y-5 [GenBank HM592262]

Данная структура генетической кассеты (*dfrA1-IS911-sat1-aadA1*) не была описана ранее и депонирована в базу данных GenBank под номером HM592262. При использовании ресурса BLAST выявлено, что последовательность HM592262 обладала сходством с иными последовательностями, размещенными в базе данных, с идентичностью 77 % и менее. Уникальность структуры и присутствие во всех изолятах *S. flexneri*, выделенных при вспышке дизентерии, позволило использовать интегрон класса 2 в качестве молекулярно-генетического маркера для эпидемиологического анализа и позволило сделать вывод о клональности данной вспышки.

Значимость новых интегронов. Интересно, что три из четырех описанных выше новых интегронов были обнаружены у штаммов вида *P. aeruginosa*, оказывающего наибольшее влияние на формирование МЛУ-фенотипов среди патогенов, вызывающих внутрибольничные инфекции. У госпитальных штаммов *P. aeruginosa* идентификация появления новых генетических структур — интегронов класса 1 произошла в течение достаточно короткого периода времени наблюдения (3 лет) в отделении нейрореанимации. Наблюдаемое появление новых генетических структур антибиотикорезистентности у штаммов *P. aeruginosa* свидетельствует об активности генетических процессов, ассоциированных с формированием множественной лекарственной устойчивости у госпитальных патогенов.

В ходе исследования подтверждена общепризнанная роль интегронов в качестве своеобразного «депо» генетических детерминант антибиотикоустойчивости и «резерва» для создания новых комбинаций генных кассет. Описанные новые модификации генных кассет *dfrA12s* и *dfrA1-IS911*, генная кассета *aadA6* с ISPa21e элементом, генная кассета *gsu87*, генная кассета *aphA15d* и генная кассета *bla_{PBL-1}*, кодирующая не описанную ранее бета-лактамазу класса А могут служить полезными молекулярно-генетическими маркерами для отслеживания распространенности кассет, эволюции наборов генных кассет и при эпидемиологическом анализе. Проведенный анализ генных кассет на основании представленности в базе данных GenBank и идентифицированных в ходе исследования указывает на широкую распространенность интегронов классов 1 и 2 в геномах клинических штаммов бактерий, выделенных в разных регионах мира. Необходимо отметить, что новые интегроны описаны у ряда исследователей по

всему миру: среди представителей *A. baumannii* в Иране, Корее и Италии, среди *P. aeruginosa* во Франции и России [3, 36]. Таким образом, возникновение новых интегронных структур, в результате делеций и инсерций, может свидетельствовать о непрекращающемся развитии множественной лекарственной устойчивости, обусловленной интегронами классов 1 и 2 [5].

3.4. Филогенетический анализ генных кассет интегронов классов 1 и 2

Для выяснения эволюционных связей между генными кассетами, наиболее распространенными в интегронах классов 1 и 2, встречаемых в клинических штаммах ГОБ, были построены филогенетические деревья на основании анализа нуклеотидных последовательностей.

Филогенетическое родство генетических кассет в изучаемых штаммах отражено на дендрограмме, построенной на основе анализа однонуклеотидных замен с использованием «метода объединения соседей» (англ., neighbor-joining method). В качестве референс-последовательностей использовали нуклеотидные последовательности генных кассет *aacA1*, *aacA4*, *aacA7*, *aacC1*, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA6*, *aadA7*, *aadA13*, *aadA24*, *aadB*, *bla_{IMP-13}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{PSE-1}*, *bla_{VIM-2}*, *catB3*, *catB8* и *cmlA1* (рисунок 3.12).

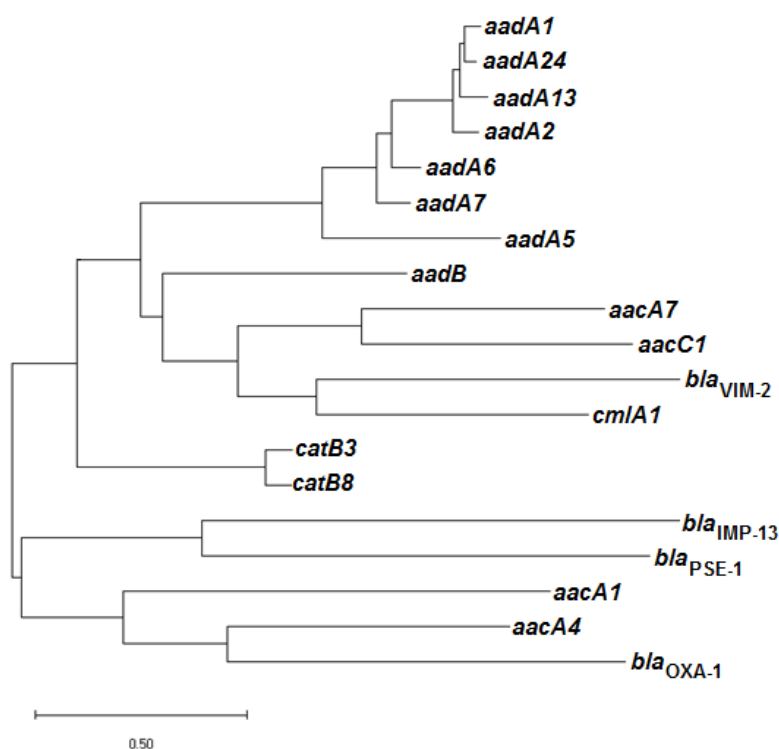


Рисунок 3.12 – Дендрограмма, отражающая филогенетическое родство нуклеотидных последовательностей генных кассет, наиболее распространенных в интегронах классов 1 и 2

Кластеризация генных кассет указывает прежде всего на общность происхождения продуктов, кодируемых конкретными кассетами. Однако интересно, что кассеты, кодирующие аминогликозидацетилтрансферазу, обуславливающую бактериальную устойчивость к аминогликозидам, оказались в соседнем кластере с кассетами, кодирующими бета-лактамазы, разбив, при этом, кластер бета-лактамаз на два подкластера.

3.5. Разработка лабораторного образца мультиплексной ПЦР тест-системы в режиме реального времени для детекции генов интегронов классов 1 и 2

Необходимость разработки мультиплексной системы праймеров и зондов для детекции генов интегронов классов 1 и 2 была связана с тем, что определение структуры интегона – достаточно длительный и трудоёмкий процесс, кроме того, для описания резистомов штаммов с фенотипами множественной лекарственной устойчивости при возникновении вспышки госпитальной инфекции необходимо сократить затрачиваемое на исследование время.

Перечень генов-мишеней для детекции генов интегронов классов 1 и 2 (n=8), был выбран на основании изучения научной литературы о представленности генных кассет и их эпидемиологической значимости в возникновении вспышек госпитальных инфекций, а также по результатам анализа представленности генных кассет в базе данных GenBank и в изолятах изучаемой нами коллекции ГОБ.

Праймеры и зонды подобраны на нуклеотидные последовательности изучаемых генов, представленных в базе данных INTEGRALL (<http://integrall.bio.ua.pt/>). Размер амплифицируемых участков генов рассчитан в пределах 74-108 п.н. Специфичность нарабатываемых ПЦР-продуктов с использованием этих праймеров была подтверждена секвенированием, показана их полная идентичность с последовательностями, размещёнными в базе данных GenBank (таблица 3.3). Частичные последовательности генов размещены нами в базе данных GenBank (Приложение В).

Схема детекции генов интегронов классов 1 и 2 включала в себя выделение чистой культуры микроорганизма из образца клинического материала, экстракцию ДНК и амплификацию ДНК генов интеграз 1 и 2 классов (*intl1*, *intl2*) и генных кассет антибиотикорезистентности *aadA1*, *aadA2*, *aadB*, *aacA4*, *dfrA1* и *sat2*.

Таблица 3.3 – Специфичные праймеры и зонды для детекции генов интегронов классов 1 и 2 в ПЦР в режиме реального времени

Ген	Ссылка	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')	Продукт, п.н.
<i>int1</i>	EU912537	For: CTGTCCTGGCTGGCGAA	89
		Rev: AGCACCTTGCCGTAGAAGAA	
		Probe: /6-FAM/-CATCGTCAGGCATTGGCGGC-/BHQ-1/	
<i>int2</i>	MK994977	For: CGCGAAAGGCATTGAAG	88
		Rev: GTAGCAAACGAGTGACGAA	
		Probe: /ROX/-CAGGCATCGTTAGCAAGCGTG-/BHQ-2/	
<i>aacA4</i>	MH796166	For: TAGCGCAAGAGTCCGTCA	84
		Rev: TTCCAAGAGCAACGTACGA	
		Probe: /ROX/-ATGGAGAGCCGATTGGGTATG-/BHQ-2/	
<i>aadA1</i>	MK882281	For: GCGAACTGCAATTTGGAGAA	95
		Rev: TGTCAGCAAGATAGCCAGAT	
		Probe: /6-FAM/-CAGGTATCTTCGAGCCAGCCA-/BHQ-1/	
<i>aadA2</i>	KJ363320	For: CTGGCCGTGCATTTGTA	101
		Rev: GTCGTTTCATCAAGCTTTACG	
		Probe: /6-FAM/-CGATATTGATTTGTTGGTTACTGTG-/BHQ-1/	
<i>aadB</i>	CP086672	For: CTGTAGGACTCTATGTGCTT	74
		Rev: ATCTGGGATTACTTTTACTATG	
		Probe: /ROX/-GTCGACTGGTGGTACTTTCATCG-/BHQ-1/	
<i>dfrA1</i>	MG757585	For: TGGTAGCTATATCGAAGAAT	108
		Rev: ACAGCCATTGGTTATAGGTA	
		Probe: /Cy5/-GAGTGCCAAAGGTGAACAGCT-/BHQ-2/	
<i>sat2</i>	MG757585	For: TGTGCGGAAGATTGAACTCA	85
		Rev: TTTGCCTCGGTGCGTGTG	
		Probe: /Cy5/-AACATGGAACGATCTAGCCTCT-/BHQ-2/	
<i>16S rRNA</i>	MK885613	For: ACTGGAAACGGTAGCTAAT	108
		Rev: TACCCACCTACTAGCTAAT	
		Probe: 6-HEX/-CTAATACCGCATAACGTCGCAAGA-/BHQ-1/	

Примечание: FAM/Blue, ROX/Orange, Cy5/Violet и 6-HEX/Green – флуоресцентные красители; BHQ-1, BHQ-2 – гасители флуоресценции; праймеры и зонд на ген 16S рРНК использовали в качестве внутреннего контрольного образца

Мультиплексность тест-системы обеспечивалась тем, что в первой пробирке детектировали две мишени, а во второй и третьей – по три мишени (таблица 3.4).

Таблица 3.4 — Комплектация мультиплексной ПЦР тест-системы

Реакционная смесь	Гены-мишени	Матрица		
		ДНК _о	ПКО	ОКО
Смесь I	<i>int1</i> <i>int2</i>	пробирка 1	пробирка 4	пробирка 7
Смесь II	<i>aadA2</i> <i>aacA4</i> <i>sat2</i>	пробирка 2	пробирка 5	пробирка 8
Смесь III	<i>aadA1</i> <i>aadB</i> <i>dfrA1</i>	пробирка 3	пробирка 6	пробирка 9

Примечание: ДНК_о - ДНК тестируемого образца; ПКО - положительный контрольный образец (ДНК референс-штамма, несущего соответствующие гены); ОКО - отрицательный контрольный образец (деионизованная вода)

Амплификацию ДНК проводили на приборе CFX-960 (BioRad, США) с использованием реактивов ООО «Синтол» (Москва, Россия) в 25 мкл реакционной смеси, для каждого образца содержащей: 2,5 мкл 10×Taq-буфера с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2,0 мМ MgCl_2 ; 0,2 мМ каждого дНТФ; 5 мМ каждого праймера, 0,8 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл матрицы ДНК. В качестве матрицы использовали ДНК тестируемого образца, в качестве матрицы положительного контроля – ДНК референс-штамма (положительный контрольный образец), несущего соответствующие гены, в качестве отрицательного контроля – деионизованную воду (отрицательный контрольный образец) (таблица 3.4). Таким образом, комплект мультиплексной ПЦР тест-системы включал в себя 9 пробирок. Для статистической достоверности все реакции проводили в трех технических повторностях.

Препараты ДНК тестируемых бактериальных культур выделяли с помощью коммерческих наборов для выделения ДНК «ДНК-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия). В качестве положительных контрольных образцов использовали ДНК штаммов, содержащих названные гены, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Референс-штаммы госпитальных инфекций для детекции генов интеграз и кассет антибиотикоустойчивости

Вид	Штамм	Номер в «ГКПМ-Оболенск»	Дата выделения	Гены
<i>P. aeruginosa</i>	B-2175P/15	B-8524	30.11.2015	<i>intl1, aacA4</i>
<i>P. mirabilis</i>	B-917P/16	B-9497	28.03.2016	<i>intl1, intl2, aadA1, aadA5, dfrA1, dfrA17, sat2</i>
<i>K. pneumoniae</i>	B-2226K/15	B-9498	09.12.2015	<i>intl1, aadA1, aadA2, aadB, dfrA12</i>

ПЦР проводили по программе: начальная денатурация при температуре +95 °С – 5 мин; 39 циклов, состоящих из денатурации при температуре +95 °С – 10 с, отжига праймеров при температуре +58 °С – 20 с и элонгации при температуре +72 °С – 15 с; хранение при температуре +4 °С – постоянно.

Разработанная мультиплексная ПЦР тест-система в режиме реального времени была апробирована на 16 образцах ДНК, выделенных из клинических и коллекционных штаммов грамотрицательных (n=8) и грамположительных (n=8) бактерий, охарактеризованных на наличие у них генов интегронных структур 1 и 2 классов (*intl1, intl2, aadA1, aadA2, aadB, aacA4, dfrA1* и *sat2*) методом секвенирования по Сэнгеру (таблица 3.6).

Таблица 3.6 – Штаммы бактерий, использованные для испытания набора реагентов «Мультиплексная ПЦР-РВ тест-система: Гены интегронов классов 1 и 2»

Штамм	ГКПМ-Оболенск	Гены интегронов
Грамотрицательные бактерии		
<i>P. aeruginosa</i> B-2175P/15	B-8524	<i>intl1, aacA4</i>
<i>P. mirabilis</i> B-917P/16	B-9497	<i>intl1, intl2, aadA1, aadA5, dfrA1, dfrA17, sat2</i>
<i>K. pneumoniae</i> B-2226K/15	B-9498	<i>intl1, aadA1, aadA2, aadB, dfrA12</i>
<i>K. pneumoniae</i> B225/20	B-9023	<i>intl1, dfrA1</i>
<i>K. pneumoniae</i> B306/20	B-9024	<i>intl1, dfrA1</i>
<i>K. pneumoniae</i> 11PKp/19a	B-8912	<i>intl1, aadA1</i>
<i>K. pneumoniae</i> 6TKp/19b	B-8913	<i>intl1, aadA1, aadB, dfrA1</i>
<i>Escherichia coli</i> C600	B-1468	-
Грамположительные бактерии		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	B-5931	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC49619	B-7756	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ROS-150	B-8697	-
<i>Bacillus</i> spp. F	B-6822	-
<i>Paenibacillus terrae</i> B 2245	B-7834	-
<i>Bacillus lentus</i> ПС-1	B-7150	-
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC14485	B-8121	-
<i>Enterococcus mundtii</i> E28	B-8398	-

Полученные результаты по детекции генов интегронных структур с использованием разработанной мультиплексной ПЦР тест-системой полностью совпали с результатами генотипирования штаммов методом секвенирования ДНК (таблицы 3.7 и 3.8).

Таким образом, продемонстрирована 100 % специфичность набора реагентов «Мультиплексная ПЦР-РВ тест-система: Гены интегронов классов 1 и 2»: в препаратах ДНК штаммов, имеющих гены *intl1*, *intl2*, *aacA4*, *aadA1*, *aadA2*, *aadB*, *dfrA1* и *sat2*, выявлены соответствующие генетические маркеры при положительной ПЦР реакции с флуоресцентной детекцией; в препаратах ДНК штаммов, не имеющих перечисленных генов интегронов классов 1 и 2, не выявлены соответствующие генетические маркеры при отрицательной ПЦР реакции.

Определение чувствительности ПЦР тест-системы осуществляли с помощью проведения реакций амплификации, используя 10-кратные разведения в деионизованной воде матричных ДНК штаммов, несущих гены интегронных структур.

Таблица 3.7 – Результаты детекции генов интегронов классов 1 и 2 в штаммах грамотрицательных бактерий «ГКПМ-Оболensk»

Тестируемый ген	B-8524		B-9497		B-9498		B-9023		B-9024		B-8912		B-8913		B-1468		ОКО		ПКО	
	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.
<i>intl1</i>	16,31	+	28,45	+	N/A	—	23,71	+	21,72	+	16,11	+	16,67	+	37,78	—	N/A	—	19,98	+
<i>intl2</i>	N/A	—	21,10	+	25,03	+	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	23,38	+
<i>aacA4</i>	15,35	+	N/A	—	N/A	—	N/A	—	38,87	—	35,24	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	18,68	+
<i>aadA1</i>	33,12	—	25,54	+	17,50	+	N/A	—	N/A	—	15,67	+	23,05	+	37,15	—	N/A	—	37,06	+
<i>aadA2</i>	N/A	—	N/A	—	15,59	+	37,25	—	33,11	—	N/A	—	N/A	—	39,36	—	36,20	—	23,05	+
<i>aadB</i>	38,36	—	N/A	—	18,74	+	N/A	—	N/A	—	N/A	—	19,06	+	35,94	—	38,22	—	16,86	+
<i>dfrA1</i>	34,92	—	25,01	+	N/A	—	16,87	+	11,22	+	N/A	—	24,18	+	N/A	—	34,90	—	16,68	+
<i>sat2</i>	N/A	—	24,52	+	N/A	—	35,58	—	35,02	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	37,27	—	23,08	+

Таблица 3.8 – Результаты детекции генов интегронов классов 1 и 2 в штаммах грамположительных бактерий «ГКПМ-Оболensk»

Тестируемый ген	B-5931		B-7756		B-8697		B-6822		B-7834		B-7150		B-8121		B-8398		ОКО		ПКО	
	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.	С _{ср}	Инт.
<i>intl1</i>	36,31	—	38,45	—	N/A	—	33,71	—	31,72	—	38,45	—	38,45	—	38,45	—	N/A	—	19,98	+
<i>intl2</i>	N/A	—	37,10	—	35,03	—	N/A	—	N/A	—	37,10	—	37,10	—	37,10	—	N/A	—	23,38	+
<i>aacA4</i>	35,35	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	38,87	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	18,68	+
<i>aadA1</i>	33,12	—	35,54	—	37,50	—	N/A	—	N/A	—	35,54	—	35,54	—	35,54	—	N/A	—	37,06	+
<i>aadA2</i>	N/A	—	N/A	—	35,59	—	37,25	—	33,11	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	36,20	—	23,05	+
<i>aadB</i>	38,36	—	N/A	—	38,74	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	N/A	—	38,22	—	16,86	+
<i>dfrA1</i>	34,92	—	35,01	—	N/A	—	36,87	—	31,22	—	35,01	—	35,01	—	35,01	—	34,90	—	16,68	+
<i>sat2</i>	N/A	—	34,52	—	N/A	—	35,58	—	35,02	—	34,52	—	34,52	—	34,52	—	37,27	—	23,08	+

Примечание: «+» - положительный результат; «—» - отрицательный результат; С_{ср} – среднее значение порогового цикла, рассчитанное из значений С_t в трипликатах; N/A - отсутствие пересечений с пороговой линией; Инт. – интерпретация результата; * - имеют указанные гены; ** - не имеют указанных генов; ПКО – положительный контрольный образец; ОКО - отрицательный контрольный образец

Показано, что набор реагентов «Мультиплексная ПЦР-РВ тест-система: Гены интегронов классов 1 и 2» позволяет выявлять гены интегронных структур в препаратах ДНК штаммов грамотрицательных бактерий в реакционной смеси, содержащей $\geq 0,008$ нг/мкл ДНК (таблицы 3.9-3.11).

Таблица 3.9 – Детекция генов *int1*, *aadA1* и *aadA2* по каналу FAM в 10-кратных разведениях ДНК штамма *K. pneumoniae* В-9498

№ п/п	Концентрация ДНК*, нг/мкл	Значения порогового цикла (Ct) по каналу FAM					
		<i>int1</i>		<i>aadA1</i>		<i>aadA2</i>	
		Ct _{cp}	Инт.	Ct _{cp}	Инт.	Ct _{cp}	Инт.
1	0,6	24,69	+	19,16	+	24,22	+
2	0,06	30,92	+	23,45	+	29,81	+
3	0,006	33,93	—	29,17	+	34,18	—
4	0,0006	N/A	—	N/A	—	N/A	—

Примечание: «+» - положительный результат; «—» - отрицательный результат; Ct_{cp} – среднее значение порогового цикла, рассчитанное из значений Ct в трипликатах; «N/A» - отсутствие пересечений с пороговой линией; Инт. – интерпретация результата; * - конечная концентрация ДНК в пробирке с реакционной смесью

Таблица 3.10 – Детекция генов *int2*, *aadB* и *aacA4* по каналу ROX в 10-кратных разведениях ДНК штаммов *P. mirabilis* В-9497 и *K. pneumoniae* В-9498

№ п/п	Значения порогового цикла (Ct) по каналу ROX								
	Концен трация ДНК*, нг/мкл В-9497	int2		Концен трация ДНК*, нг/мкл В-9498	aadB		Концен трация ДНК*, нг/мкл В-9497	aacA4	
		Ct _{cp}	Инт.		Ct _{cp}	Инт.		Ct _{cp}	Инт.
1	0,8	19,99	+	0,6	22,45	+	0,8	19,16	+
2	0,08	24,07	+	0,06	28,02	+	0,08	23,45	+
3	0,008	29,47	+	0,006	31,31	—	0,008	29,17	+
4	0,0008	N/A	—	0,0006	N/A	—	0,0008	N/A	—

Примечание: то же, что в таблице 3.9

Таблица 3.11 – Детекция генов *dfrA1* и *sat2* по каналу Cy5 ROX в 10-кратных разведениях ДНК штамма *P. mirabilis* В-9497

№ п/п	Концентрация ДНК*, нг/мкл	Значения порогового цикла (Ct) по каналу Cy5			
		<i>dfrA1</i>		<i>sat2</i>	
		Ct _{cp}	Инт.	Ct _{cp}	Инт.
1	0,8	19,16	+	18,30	+
2	0,08	23,45	+	22,45	+
3	0,008	29,17	+	26,96	+
4	0,0008	N/A	—	N/A	—

Примечание: то же, что в таблице 3.9

Таким образом, чувствительность разработанной мультиплексной ПЦР-РВ тест-системы для выявления генов интегронов классов 1 и 2 составила $\geq 0,008$ нг/мкл ДНК.

3.6. Заключение по Главе 3

В ходе исследования оценена распространенность и разнообразие интегронов классов 1 и 2 в геномах мультирезистентных клинических изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2015 гг. В изолятах идентифицированы 842 интегона: интегроны класса 1 – в геномах 31 % изолятов, интегроны класса 2 – в геномах 13 % изолятов. Среди 22 вариантов наборов генных кассет интегронов класса 1 наиболее распространенными были *dfrA17-aadA5*; *dfrA12-orfF-aadA2*; *aadA1*; *aacC1-orfX-orfY-aadA1*; *dfrA1-orfC*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA6-orfD*; *aadB-aadA1y* и *dfrA1-aadA1*; среди 4 вариантов наборов генных кассет интегронов класса 2 – *dfrA1-sat2-aadA1*. Для сравнения, в базе данных GenBank в этот период времени наиболее представленными были интегроны класса 1: *aadB*; *aadB-aadA1y*; *bla_{OXА-30}-aadA1*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA2*; *estX* и *dfrA17-aadA5*, и класса 2 – *dfrA1-sat2*. Пять наборов генных кассет отнесены к наиболее представленным как в нашей коллекции, так и в базе данных GenBank: *dfrA17-aadA5*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadB-aadA1y*. Идентифицирован 31 тип генных кассет, наиболее часто встречались *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *orfF*, *sat1*, *aacA4* и *orfC*. Девять типов генных кассет, отнесенных к наиболее распространенным в нашей коллекции, также были широко представлены в базе данных GenBank: *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *sat1*, *aacA4* и *orfC*.

В данной работе описаны новые интегроны: четыре новых интегона класса 1: In1249, In1379, In1360 и In1375 у *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, и интегрон класса 2 In2-IS911 у *Shigella flexneri*. Описанные новые варианты генов *dfrA12s*, *dfrA1-IS911*, *aadA6::ISPa21e*, *gsu87*, *aphA15d* и *bla_{PBL-1}* указывают на продолжающуюся эволюцию интегронных структур в геномах клинически значимых патогенов.

Для оптимизации детекции интегронных структур в клинических штаммах в ходе исследования была разработана мультиплексная ПЦР тест-система в режиме реального времени «Мультиплексная ПЦР-РВ тест-система: Гены интегронов классов 1 и 2», позволяющая определять гены интеграз классов 1 и 2, аминогликозид-модифицирующих ферментов *aacA4*, *aadA1*, *aadA5*, дигидрофолат-редуктаз *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12* и стрептотрицинацетилтрансферазы *sat2*), имеющая специфичность 100 % и чувствительность $\geq 0,008$ нг/мкл ДНК.

Глава 4. ИНТЕГРОНЫ КЛАССОВ 1 И 2 В РЕЗИСТОМАХ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ НЕЙРОРЕАНИМАЦИИ В 2015 – 2019 ГГ.

4.1. Интегроны классов 1 и 2, идентифицированные в штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2015 - 2019 гг.

Характеристика коллекции. В ходе изучения возможного носительства мультирезистентных грамотрицательных бактерий и генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов НМИЦН имени академика Н.Н. Бурденко в 2015 г., в 2017 г. и в 2019 г. были получены клинические образцы (ректальные и трахеальные мазки, а также пробы мочи), из которых были выделены 710 изолятов грамотрицательных бактерий (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – Дизайн проведения исследований по точечной превалентности генов антибиотикорезистентности и количество вовлеченных в исследование пациентов

Год	Количество одномоментных обследований	Количество пациентов	Количество изолятов
2015	3	62	189
2017	3	52	177
2019	7	60	344
ИТОГО	13	174	710

Идентифицированы грамотрицательные бактерии 26 видов: *A. baumannii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia gladioli*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Elizabethkingia meningoseptica*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella aerogenes*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

Доля МЛУ-изолятов. В ходе трехгодичного периода наблюдения в отделении реанимации и интенсивной терапии нейрохирургии (нейро-ОРИТ) г. Москвы наиболее представленными видами клинических изолятов грамотрицательных бактерий были *K. pneumoniae* (n=236, 32 %), *P. aeruginosa* (n=107, 14 %) и *Acinetobacter baumannii* (n=84, 10 %). Данные виды были

охарактеризованы с точки зрения доли МЛУ изолятов в 2015, 2017 и в 2019 гг., при этом доля МЛУ-изолятов у *K. pneumoniae* возросла с 75 % до 98 %, у *A. baumannii* - с 78 % до 85 %, у *P. aeruginosa* - с 94 % до 100 % (рисунок 4.1).

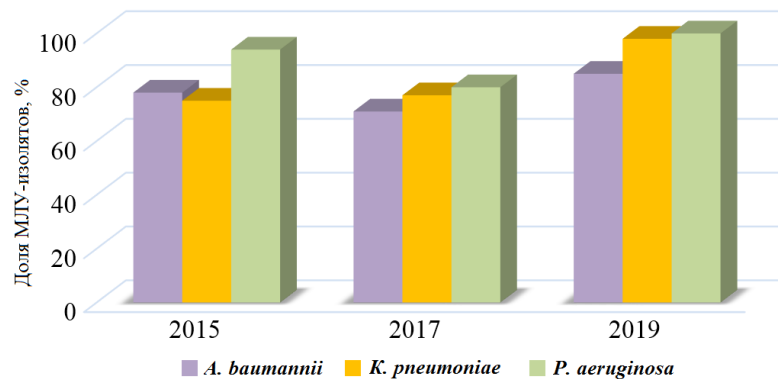


Рисунок 4.1 – Доля бактериальных изолятов с МЛУ-фенотипами, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2015-2019 гг.

Распространенность интегронов. Интегроны класса 1 выявлены у 238 изолятов ГОБ (33 %), а интегроны класса 2 – у 22 изолятов (3 %), при этом в 3 % изолятов идентифицированы одновременно интегроны классов 1 и 2. Показано, что доля интегронов класса 1 увеличилась с 83 % в 2015 г. до 92 % в 2019 г. (рисунок 4.2).

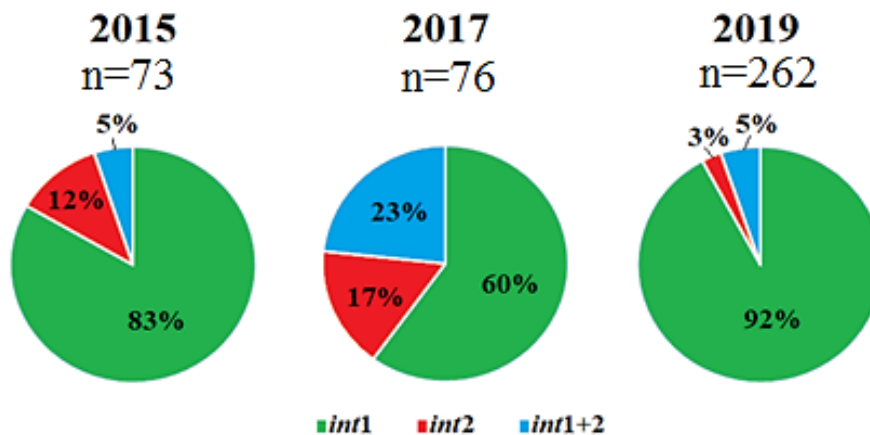


Рисунок 4.2 – Динамика представленности интегронов классов 1 и 2 в изолятах изучаемых коллекций, выделенных в 2015 г., 2017 г. и 2019 г.

В изолятах *A. baumannii* отмечено преобладание интегронов класса 1: с 2015 по 2019 гг. их доля увеличилась с 33 % до 48 %. Интересно, что у 5 % изолятов *A. baumannii*, выделенных в 2015 г., были выявлены интегроны класса 2 одновременно с интегронами класса 1. Изоляты *K. pneumoniae*, несущие интегроны класса 1, составляли 47, 30 и 43 % в 2015, 2017 и 2019 гг., соответственно. Интегроны класса 2 у *K. pneumoniae* были выявлены значительно реже: в 2015 г. - у

6 %, в 2017 г. не были представлены, а в 2019 г. - у 4 % изолятов. Доли изолятов *P. aeruginosa*, содержащих интегроны класса 1, составляли 28, 27 и 62 % в 2015, 2017 и 2019 гг., соответственно. Интегроны класса 2 были детектированы в 2 % и 12 % изолятов *P. aeruginosa* в 2015 и 2017 гг., соответственно, но не выявлены в 2019 г. (рисунок 4.3).

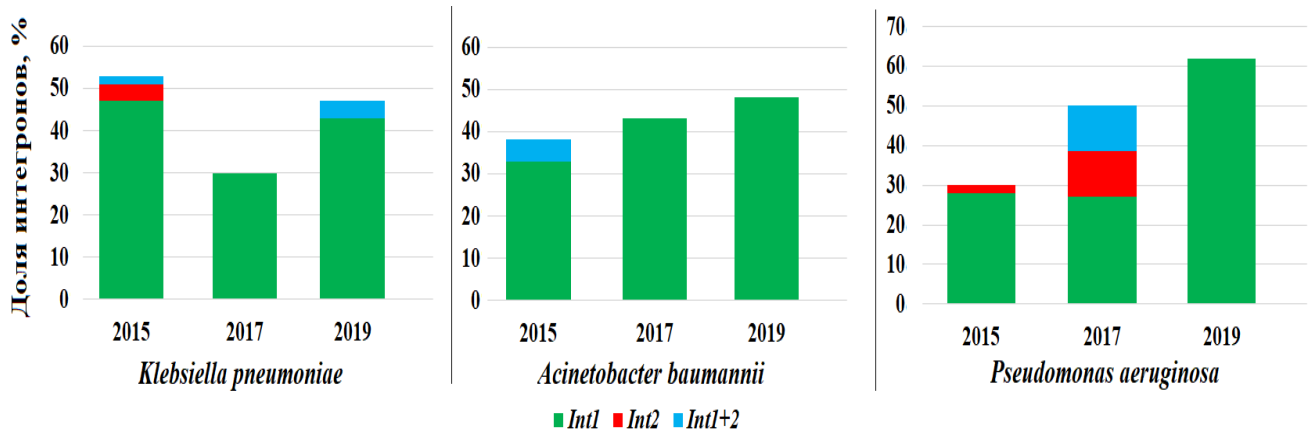
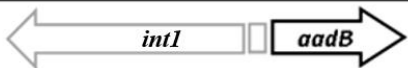
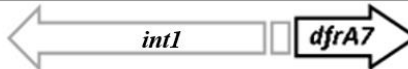
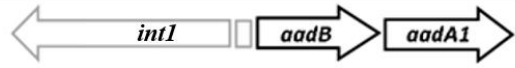
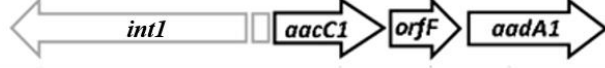


Рисунок 4.3 – Представленность интегров классов 1 и 2 в изолятах *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в ходе одномоментных обследований в 2015, 2017 и 2019 гг.

Анализ наборов генных кассет в интегронах классов 1 и 2. В 2015, 2017 и 2019 гг. в изолятах ГОБ, выделенных от пациентов нейрохирургического отделения, идентифицированы 14 вариантов наборов генных кассет интегров класса 1 и один вариант набора генных кассет интегрона класса 2. Наиболее распространены были интегроны, несущие по две генные кассеты: (26 % от общего количества интегров) и интегроны, несущие по одной генной кассете (22 %). Менее распространены были интегроны с тремя генными кассетами (15 %) и с четырьмя генными кассетами (11 %) (рисунок 4.4).

В ходе исследования идентифицированы 280 генных кассет в составе интегров, включая 190 (68 %) кассет в интегронах класса 1 и 90 (32 %) кассет – в интегронах класса 2. Наиболее представленными были кассеты *aadA1* (n=72, 26 %), *dfrA12* (n=43, 15 %) и *sat2* (n=30, 11 %).

Таким образом, вклад интегров классов 1 и 2 в резистомы ГОБ, выделенных в 2015-2019 гг., может быть оценен как значительный и нарастающий. Проведенный анализ показал высокий уровень содержания интегров в геномах госпитальных штаммов, что, по нашему мнению, представляет большую угрозу распространения MDR среди *Enterobacterales*.

Количество генных кассет	Структура интегрона	Ссылки GB
1		[KX216848]
		[KU870990]
		[KR028104] [KR028105] [KR028106]
2		[KR028102] [KX267565]
		[KR028103]
		[KU860569]
		[MF447896]
		[KY911215]
		[KX870013]
		-
3		[KU860566] [KU860570] [KU870991]
		[KR028101] [KR028107]
4		[KR028101] [KR028107]
3		-

int1/int2 – класс интегразы; GB – база данных GenBank; *Tn* – транспозон

Рисунок 4.4 – Структуры интегронов, детектированных в геномах грамотрицательных бактерий, выделенных при одномоментных обследованиях в период с 2015 по 2019 гг.

Наибольший интерес при изучении наборов генных кассет вызвал изолят *P. aeruginosa* t9P1/15, в котором идентифицирован интегрон класса 1 In1379 с уникальной структурой: инсерцией *ISPa21e* элемента в генную кассету *aadA6* (рисунок 3.7). Выявление таких новых структур может свидетельствовать об активности генетических процессов, ассоциированных с формированием множественной лекарственной устойчивости у госпитальных патогенов.

4.2. Носительство генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Целью данного исследования была оценка уровня носительства генетических детерминант (генов интеграз классов 1 и 2, генов бета-лактамаз *bla*_{TEM}-, *bla*_{SHV}- и *bla*_{CTX-M}-типов и карбапенемаз *bla*_{NDM}-, *bla*_{VIM}-, *bla*_{KPC}-, *bla*_{OXA-48}-типов) в дыхательной системе и кишечнике пациентов нейрореанимации г. Москвы. Исследование было проведено в ходе 7 одномоментных обследований по точечной превалентности генов антибиотикорезистентности в период с октября по ноябрь 2019 г. (таблица 4.2).

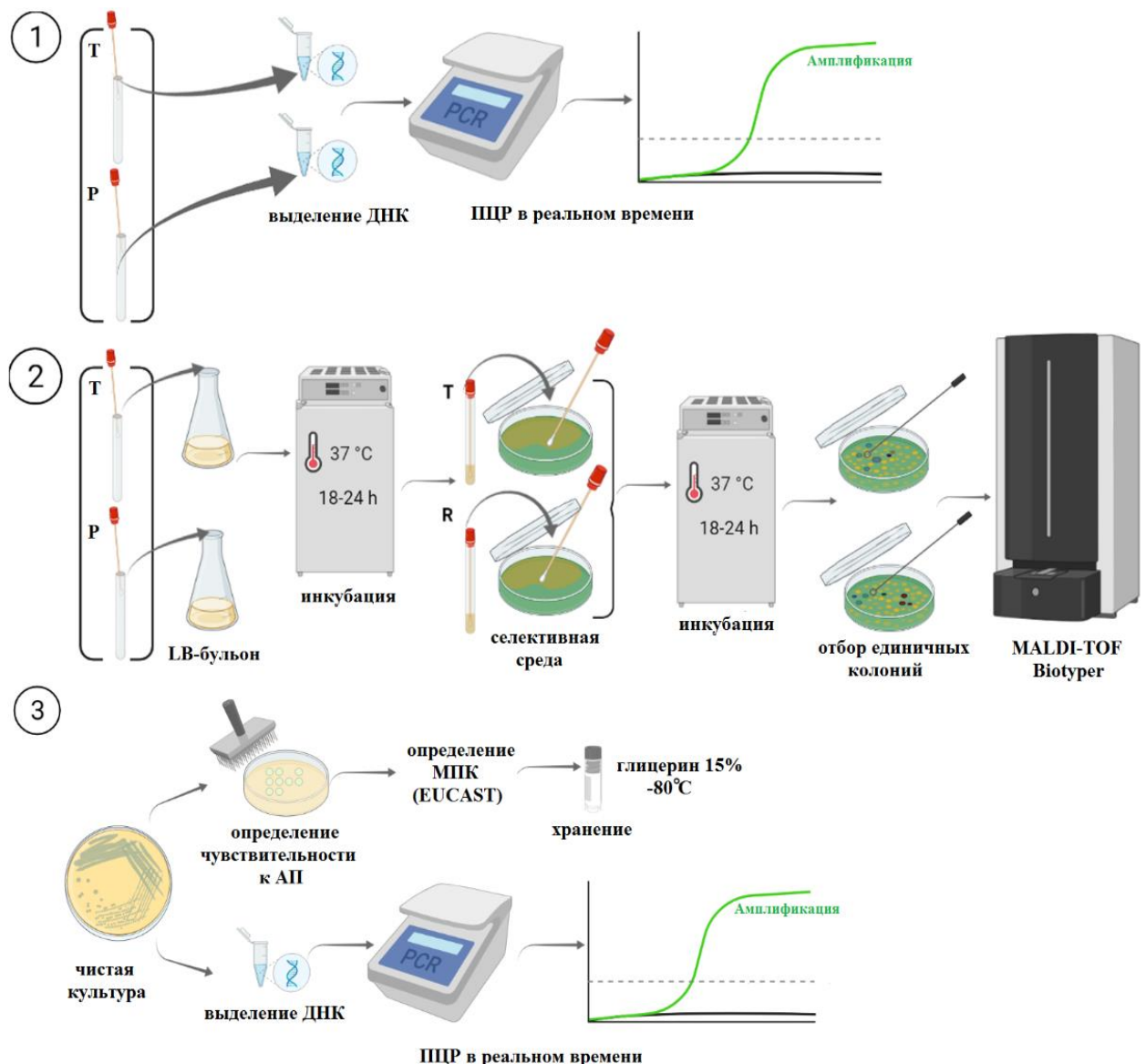
Таблица 4.2 – Даты проведения исследования по точечной превалентности генов антибиотикорезистентности и количество вовлеченных в исследование пациентов

Даты взятия материала:	18.10. 2019	24.10. 2019	31.10. 2019	07.11. 2019	14.11. 2019	21.11. 2019	29.11. 2019	Всего
Количество пациентов	22	16	23	22	20	20	24	60
Количество образцов	44	31	46	44	40	40	48	293
Количество бактериальных изолятов	48	33	49	48	50	57	70	355

Дизайн исследования по мониторингу генов антибиотикорезистентности в клинических образцах. Каждое обследование включало в себя отбор ректального (Р) и трахеального (Т) мазков. Из образцов клинического материала выделяли тотальную ДНК, которую использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР в реальном времени для выявления генетических детерминант антибиотикорезистентности (рисунок 4.5).

В ходе исследования были обследованы 60 пациентов, в том числе 27 пациентов, обследованных однократно, 12 пациентов - двухкратно, 10 пациентов - трехкратно, 3 пациента – четырехкратно, 2 пациента - пятикратно, один пациент - шестикратно и пять пациентов – семикратно, поскольку в период проведения исследования осуществлялись выписка и поступление новых пациентов в отделение. Возрастная медиана участников эксперимента составила 53,8 года (от 14 до 73 лет), а гендерное соотношение (мужчины/женщины) среди пациентов составило 1,07 (31/29). Уровень летальности за весь период времени исследования составил 10 % (n=6). Пациенты отличались по срокам нахождения в реанимации до начала

исследования: 1-10 сут (n=45), 11-30 сут (n=6), 31-81 сут (n=7), 1131 сут (n=1). Большинство пациентов (n=28) до и/или во время исследования получали терапию карбапенемами, немногие пациенты (n=15) получали цефалоспорины и ингибитор-защищенные цефалоспорины, остальные пациенты (n=17) не получали бета-лактамов. В качестве внешних проявлений нозокомиальных инфекций в нашем исследовании у пациентов фиксировали кишечную дисфункцию и/или инфекцию дыхательной системы. У половины пациентов (n=30) были отмечены госпитальные инфекции, в том числе - симптомы кишечной дисфункции (n=13) и симптомы инфекции дыхательной системы (n=21), оба симптома были отмечены у 4 пациентов.



Т – трахеальный мазок, Р – ректальный мазок, АП – антимикробные препараты,
МПК – минимальная подавляющая концентрация

Рисунок 4.5 – Дизайн эксперимента по изучению носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности и потенциальных грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций у пациентов нейррореанимации в октябре-ноябре 2019 г.

Всего проанализировано 293 клинических образца, из которых была выделена тотальная ДНК, включая 146 ректальных мазков (Р) и 147 трахеальных мазков (Т). В 119 образцах ДНК, в которых были обнаружены детерминанты антибиотикорезистентности, идентифицированы 357 генов бета-лактамаз, включая 116 *bla*_{TEM}, 79 *bla*_{CTX-M}, 45 *bla*_{SHV}, 37 *bla*_{OXA-48}, 32 *bla*_{KPC}, 39 *bla*_{NDM} и 9 *bla*_{VIM}. Кроме того, были идентифицированы 62 интегрона, в том числе 41 интегрон класса 1, и 21 интегрон класса 2.

У большинства пациентов выявлены гены бета-лактамаз *bla*_{TEM}-(n=47) и *bla*_{SHV}-(n=19) типов, гены цефалоспорины *bla*_{CTX-M}-(n=20) типа, гены карбапенемаз *bla*_{NDM}-(n=14), *bla*_{OXA-48}-(n=13), *bla*_{VIM}-(n=7) и *bla*_{KPC}-(n=10) типов. Кроме того, у 17 пациентов были детектированы интегроны класса 1, у 8 пациентов - интегроны класса 2. Примечательно, что 10 пациентов (а именно, 4, 5, 6, 8, 12, 15, 20, 31, 36 и 39) имели гены карбапенемаз одновременно в ректальных и трахеальных клинических образцах. Четырнадцать пациентов были носителями генов карбапенемаз на протяжении всего периода исследования. Три пациента не имели генов карбапенемаз в начале исследования, но позже стали носителями генов *bla*_{OXA-48}+*bla*_{NDM}+*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}+*bla*_{VIM} и *bla*_{VIM}+*bla*_{NDM}, соответственно. Напротив, три пациента утратили гены карбапенемаз во время пребывания в отделении интенсивной терапии, после чего эти гены не обнаруживались в исследуемых образцах. Комбинация карбапенемазных генов *bla*_{NDM}+*bla*_{KPC} была обнаружена у двух пациентов; *bla*_{KPC}+*bla*_{OXA-48} - также у двух пациентов; *bla*_{VIM}+*bla*_{OXA-48} - у одного пациента; *bla*_{VIM}+*bla*_{NDM} - также у одного пациента. Интересно, что 11 клинических образцов от семи пациентов содержали одновременно три гена карбапенемаз *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} и *bla*_{OXA-48}, а также ген цефалоспорины *bla*_{CTX-M-15} и два интегрона класса 1. Таким образом, 11 % проанализированных клинических образцов несли два или более генов карбапенемаз (рисунок 4.6, таблица 4.3).

Значительная доля (22 %) клинических образцов несли гены карбапенемаз: ген *bla*_{OXA-48} был обнаружен в 18 из 34 образцов Р, несущих гены карбапенемаз, и в 19 из 31 образцов Т; ген *bla*_{NDM} - в 22 образцах Р и 17 образцах Т; ген *bla*_{KPC-2} - в 17 образцах Р и 15 образцах Т; ген *bla*_{VIM} - в 4 образцах Р и 6 образцах Т. Следует отметить, что представленность генов карбапенемаз в ректальных образцах была в два раза выше по сравнению с таковой в трахеальных образцах.

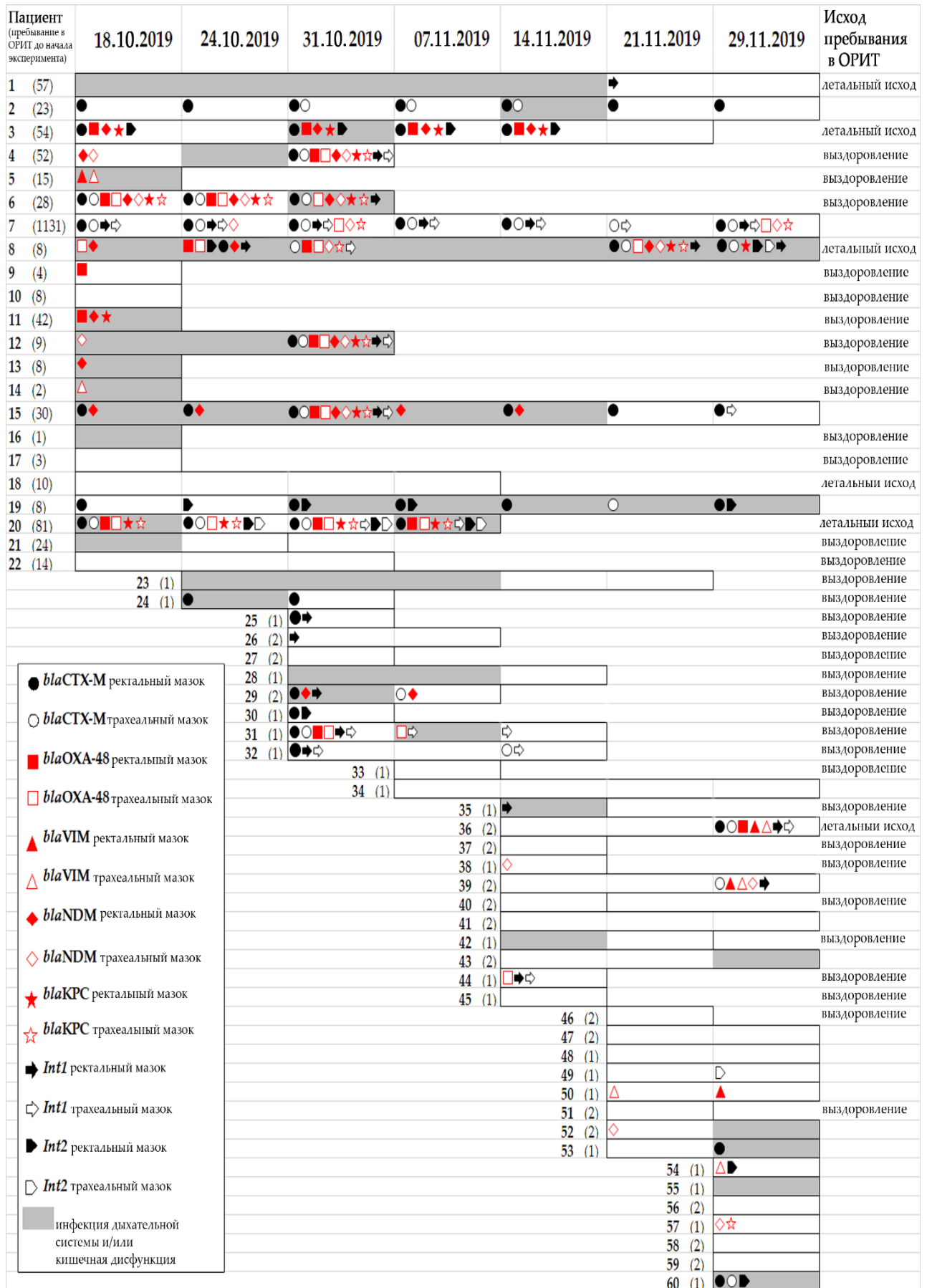


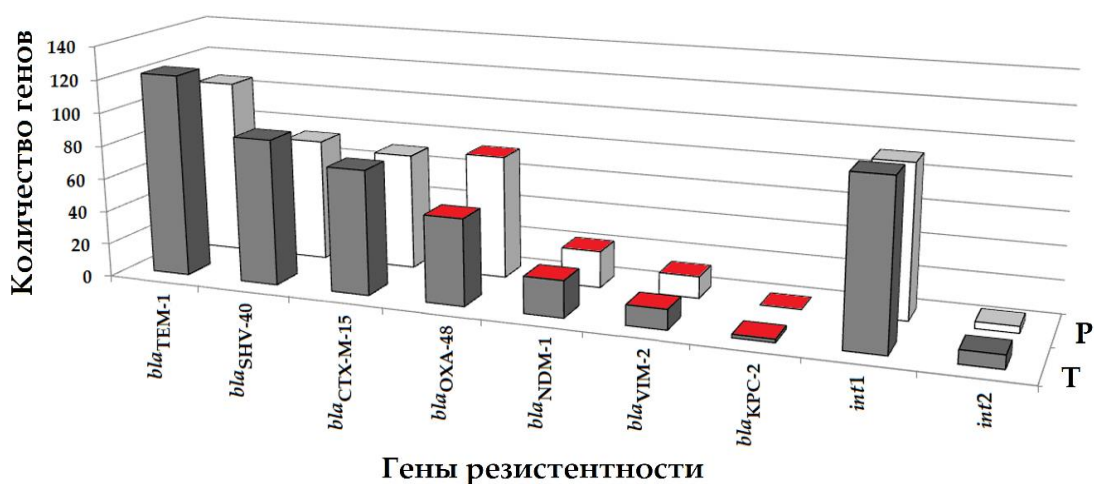
Рисунок 4.6 – Динамика обнаружения генов интегронов и бета-лактамаз в ректальных и трахеальных клинических образцах, полученных от пациентов нейрореанимации в октябре-ноябре 2019 г.

Таблица 4.3 Представленность генов карбапенемаз и их комбинаций в ректальных и трахеальных образцах пациентов нейрореанимации в октябре-ноябре 2019 г.

Предсталенность и комбинации генов карбапенемаз	Пациент
Пациенты, несущие гены карбапенемаз одновременно в ректальных и трахеальных образцах	4, 5, 6, 8, 12, 15, 20, 31, 36, 39
Пациенты, несущие гены карбапенемаз в течение всего исследования	3, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 14, 20, 38, 44, 50, 54, 57
Пациенты, которые приобрели гены карбапенемаз во время исследования	7, 36, 39
Пациенты, утратившие гены карбапенемаз во время исследования	15, 31, 52
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{NDM}+bla_{KPC}+bla_{OXA-48}+bla_{CTX-M}+int1$	Р 3, 4, 6, 8, 11, 12, 15 Т 4, 6, 7, 8, 12, 15
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{NDM}+bla_{KPC}$	Р 6 Т 57
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{KPC}+bla_{OXA-48}$	Р 8, 20 Т 20
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{VIM}+bla_{OXA-48}$	Р 36
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{VIM}+bla_{NDM}$	Т 36
Пациенты, несущие сочетание генов $bla_{OXA-48}+bla_{NDM}+bla_{KPC}$	Р 4, 6, 8, 12, 11, 15 Т 4, 6, 7, 8, 12, 15

Примечание: Р – ректальный мазок, Т – трахеальный мазок

Ректальное носительство генов карбапенемаз выявлено у 17 % пациентов, а трахеальное носительство - у 18 % пациентов (рисунок 4.7).



Р – ректальный мазок, Т – трахеальный мазок, красным – гены карбапенемаз
Рисунок 4.7 – Представленность генов антибиотикорезистентности (n = 419) в клинических образцах трахеальных и ректальных мазков

Таким образом, мониторинг носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2019 г. выявил высокий уровень представленности генетических детерминант бета-лактамаз, карбапенемаз и интегронов классов 1 и 2 в трахеальных и ректальных клинических образцах.

4.3. Носительство множественно лекарственно устойчивых грамотрицательных бактериальных изолятов у пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Всего от пациентов нейро-ОРИТ было получено 344 изолята грамотрицательных бактерий, в том числе 183 - выделенных из ректальных мазков (Р) и 161 изолят - из трахеальных мазков (Т). Наиболее распространенными видами бактерий были *K. pneumoniae* (n=75 Р; 68 Т), *E. coli* (n=38 Р; 23 Т), *A. baumannii* (n=21 Р; 32 Т), *P. aeruginosa* (n=24 Р; 18 Т) и *Enterobacter* spp. (n=8 Р; 3 Т); менее распространенными - *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1 Р; 8 Т), *Proteus mirabilis* (n=5 Р; 2 Т), *Citrobacter* spp. (n=4 Р; 2 Т), *Morganella morganii* (n=3 Р; 0 Т), *K. oxytoca* (n=1 Р; 1 Т), *K. aerogenes* (n=1 Р; 1 Т), *K. variicola* (n=1 Р; 0 Т), *Serratia marcescens* (n=0 Р; 1 Т), *Hafnia alvei* (n=0 Р; 1 Т), *Providencia stuartii* (n=1 Р; 0 Т) и *Burkholderia gladioli* (n=0 Р; 1 Т) (рисунок 4.8).

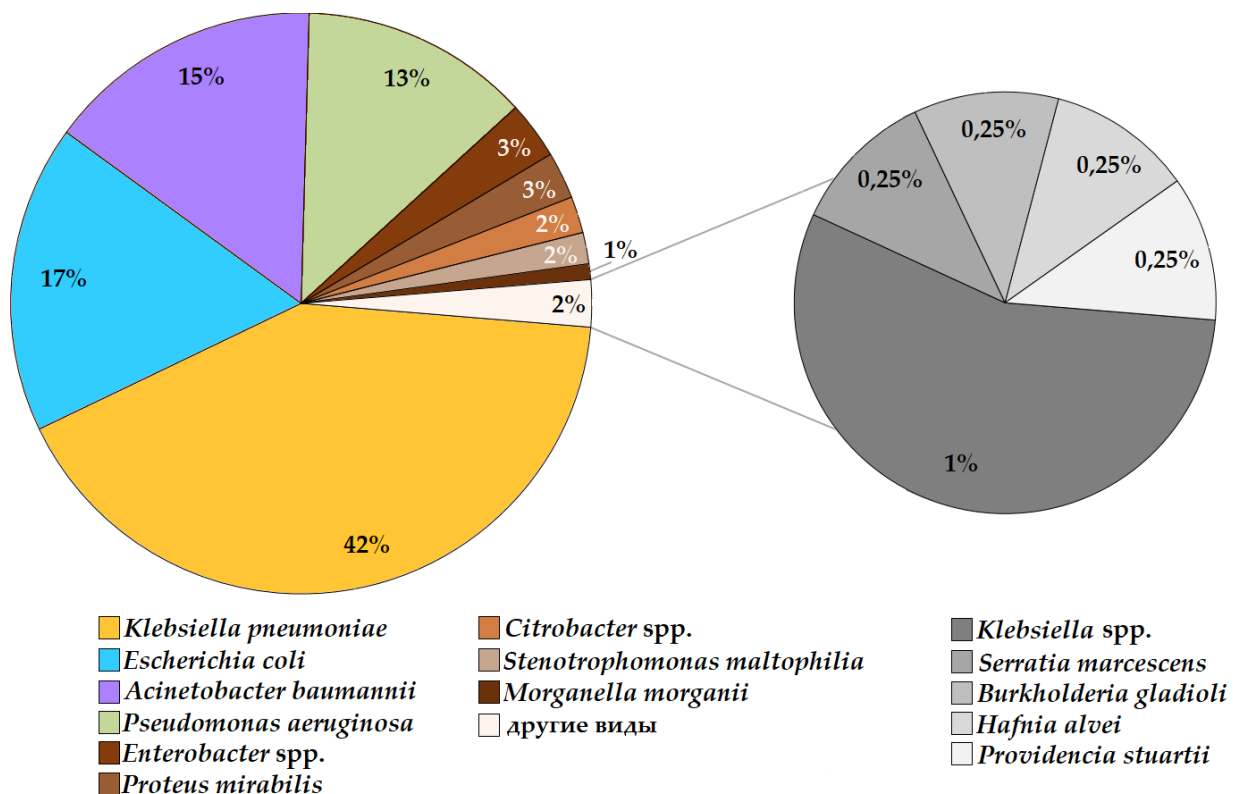
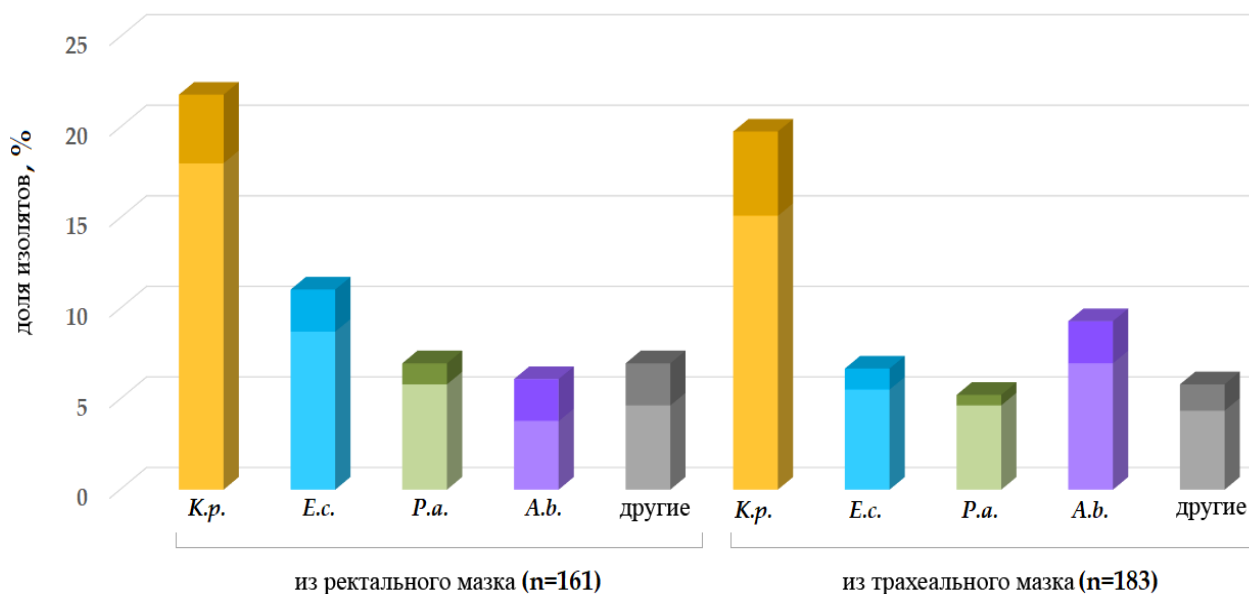


Рисунок 4.8 – Видовой состав грамотрицательных бактерий (n=344), выделенных от пациентов нейро-ОРИТ в 2019 г.

Примечательно, что от 38 пациентов были выделены изоляты ГОБ из группы ESKAPE (*K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и *E. coli*), устойчивые к карбапенемам (n=161).

Среди изолятов, выделенных от пациентов без видимых клинических проявлений кишечной дисфункции или инфекции дыхательной системы, *A. baumannii* в два раза чаще обнаруживались в трахеальных мазках, чем в ректальных, а *E. coli* были более распространены в ректальных мазках, чем в трахеальных (рисунок 4.9).



K.p. - *Klebsiella pneumoniae*; *E.c.* - *Escherichia coli*; *P.a.* - *Pseudomonas aeruginosa*; *A.b.* - *Acinetobacter baumannii*; др. - *B. gladioli*, *Citrobacter* spp.; *Enterobacter* spp.; *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *K. variicola*, *H. alvei*, *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *S. maltophilia* и *S. marcescens*

Рисунок 4.9 – Доля изолятов, выделенных из ректальных и трахеальных мазков пациентов без клинических проявлений (светлый тон) и с инфекцией дыхательной системы или кишечной дисфункцией (темный тон)

Изучение фенотипов, выделенных изолятов показало, что большинство из них (n=311, 95 %) были устойчивы к бета-лактамам, 169 (52 %) - к аминогликозидам, 155 (47 %) - к фторхинолонам, 154 (47 %) - к хлорамфениколу, 26 (34 %) - к тетрациклам, 5 (2 %) - к сульфаниламидам. По критериям Magiorakos et al. [133], 7 изолятов (2 %) были отнесены к категории S (чувствительные), 120 изолятов (36 %) - к категории R (устойчивые хотя бы к одному препарату из <3 функциональных классов антимикробных препаратов), 200 изолятов (62 %) - к категории МЛУ (устойчивые хотя бы к одному препарату из ≥3 функциональных классов антимикробных препаратов) (рисунок 4.10).



Рисунок 4.10 – Доля бактериальных изолятов, выделенных от пациентов нейрореанимации с октября по ноябрь 2019 г., устойчивых к 1-6 антимикробным функциональным группам: бета-лактамам (пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы), тетрациклинам, хинолонам, фениколам, аминогликозидам и сульфаниламидам; категория S - зеленый цвет; категория МЛУ - красный цвет

Анализ генотипов изолятов с МЛУ фенотипами показал наличие ассоциации этих фенотипов с детерминантами антибиотикорезистентности. Всего идентифицировано 718 генов бета-лактамаз, включая гены *bla*_{CTX-M} (n=212), *bla*_{TEM-1} (n=156), *bla*_{SHV} (n=140), *bla*_{NDM} (n=43), *bla*_{OXA-48} (n=37), *bla*_{KPC} (n=25), *bla*_{OXA-58-like} (n=53), *bla*_{OXA-23-like} (n=41), *bla*_{OXA-40-like} (n=9) и *bla*_{VIM-2} (n=2), кроме того - 262 интегрона, в том числе класса 1 (n=248) и класса 2 (n=14).

В группе изолятов, чувствительных ко всем использованным антимикробным препаратам (S-категория), были идентифицированы *S. maltophilia* (n=7); изоляты, устойчивые хотя бы к одному препарату из < 3 антимикробных функциональных групп (R-категория) - *E. coli* (n=43), *Enterobacter spp.* (n=10), *A. baumannii* (n=7), *Citrobacter spp.* (n=6), *K. pneumoniae* (n=4), *M. morgannii* (n=2), *S. maltophilia* (n=2), *B. gladioli* (n=1), *H. alvei* (n=1), *K. oxytoca* (n=1), *P. mirabilis* (n=1), and *S. marcescens* (n=1); изоляты с фенотипом МЛУ относились к видам *K. pneumoniae* (n=130), *A. baumannii* (n=44), *P. aeruginosa* (n=41), *E. coli* (n=16), *P. mirabilis* (n=6), *K. aerogenes* (n=2), *E. cloacae* (n=1) и *K. variicola* (n=1).

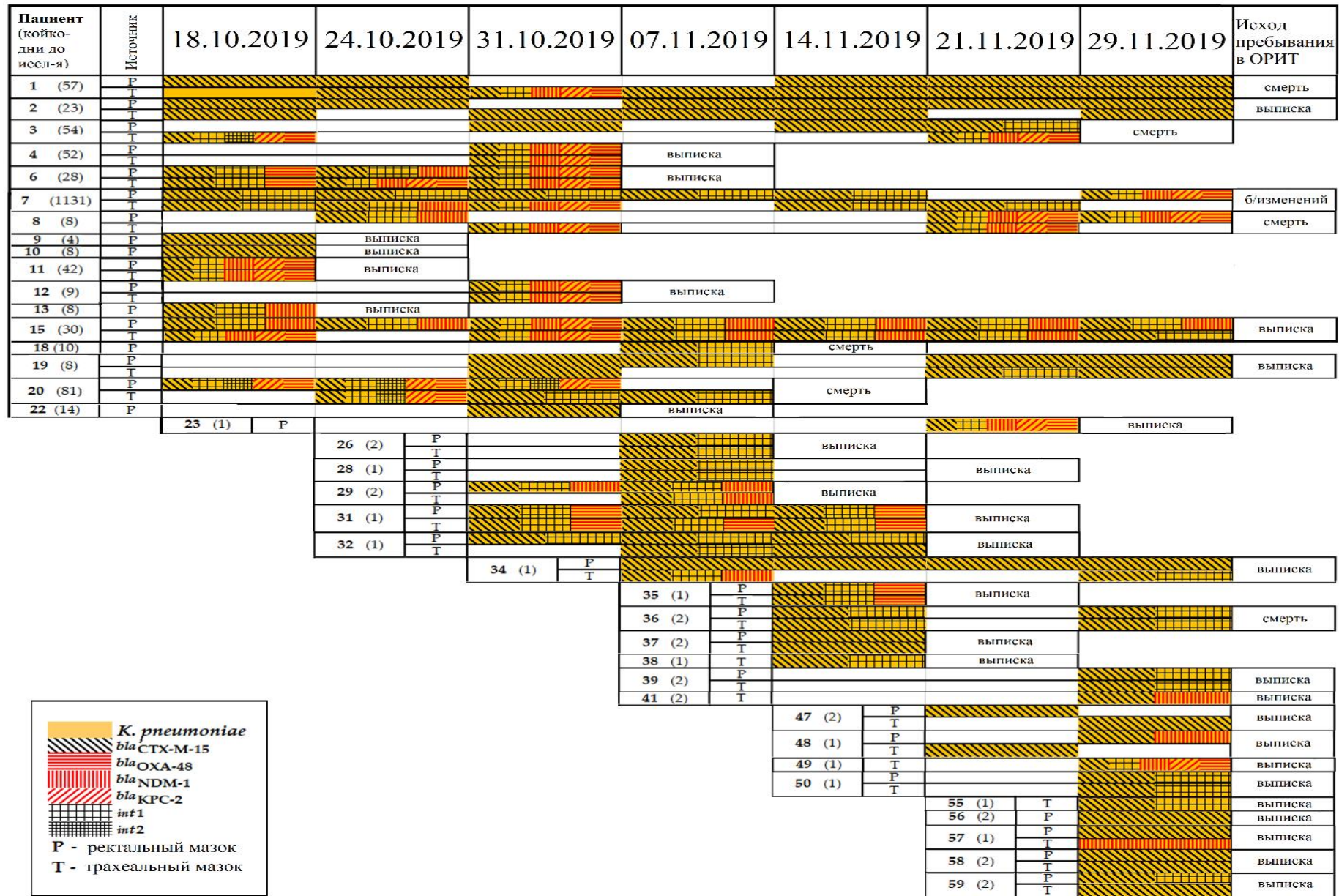
Следует отметить, что 87 % (n=299) от общего числа изолятов относились к видам ГОБ, входящим в состав группы ESKAPE-патогенов. Наиболее распространенными среди них были: *K. pneumoniae* (40 % изолятов), *A. baumannii* (34 % изолятов) и *P. aeruginosa* (22 % изолятов). Часть этих изолятов (n=161)

обладали устойчивостью к карбапенемам (меропенему). Наибольшая доля устойчивых к меропенему изолятов зафиксирована у *A. baumannii* (100 % изолятов), достаточно высокая доля таких изолятов - у *P. aeruginosa* (78 % изолятов) и *K. pneumoniae* (41 % изолятов), менее высокая - у *E. coli* (2 % изолятов). В карбапенем-резистентных изолятах патогенов группы ESKAPE идентифицированы гены карбапенемаз: *bla*_{NDM-1} (40 % изолятов), *bla*_{OXA-48} (32 % изолятов), *bla*_{KPC-2} (26 % изолятов) и *bla*_{VIM-2} (2 % изолятов) (рисунки 4.11-4.14).

4.4. Изучение резистомов клинических изолятов грамотрицательных бактерий группы ESKAPE

Изоляты *K. pneumoniae* были выделены от 39 (65 %) пациентов, в том числе от 28 пациентов, у которых *K. pneumoniae* были выделены из ректальных мазков и трахеальных мазков одновременно хотя бы один раз за время обследования. От 8 пациентов (а именно, 6, 11, 31, 35, 37, 57, 58 и 59) были выделены изоляты *K. pneumoniae* из ректальных мазков и трахеальных мазков одновременно в течение всего периода пребывания данного пациента в нейро-ОРИТ. От 9 пациентов (а именно, 2, 9, 10, 13, 15, 29, 32, 34 и 56) выделены изоляты *K. pneumoniae* только из ректальных мазков, а от 3 пациентов (а именно, 1, 10 и 55) – только из трахеальных.

Показано, что 98 % выделенных изолятов *K. pneumoniae* имели фенотипы МЛУ, что ассоциировано с высоким уровнем выявления генов антибиотикорезистентности. Всего в геномах *K. pneumoniae* было выявлено 491 ген бета-лактамаз, включая *bla*_{SHV} (n=143), *bla*_{CTX-M} (n=142), *bla*_{TEM} (n=97), *bla*_{NDM} (n=44), *bla*_{OXA-48} (n=37), and *bla*_{KPC} (n=26), а также 100 интегронов, в том числе класса 1 (n=93) и класса 2 (n=7). Описаны резистомы *K. pneumoniae*, сочетающие несколько генов бета-лактамаз одновременно. Комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-48}+*bla*_{KPC} была идентифицирована в 5 изолятах, выделенных от 2 пациентов (3 и 20). Комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-48} была идентифицирована в 10 изолятах, выделенных от 3 пациентов (6, 31 и 35). Комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*bla*_{NDM} описана у 18 изолятов, выделенных от 7 пациентов (6, 7, 8, 13, 15, 29 и 34). Новая комбинация генов, не описанная ранее, *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-48}+*bla*_{KPC}+*bla*_{NDM}, была обнаружена в изолятах (n=18) *K. pneumoniae*, выделенных от 8 пациентов (а именно, 3, 4, 7, 8, 11, 12, 23 и 49) (рисунок 4.11).

Рисунок 4.11 – Динамика обнаружения изолятов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Изоляты *E. coli* были выделены от 36 (60 %) пациентов, в том числе от 9 пациентов (а именно 23, 39, 42, 43, 44, 46, 48, 49 и 52) у которых *E. coli* были выделены из ректальных мазков и трахеальных мазков одновременно хотя бы один раз за время обследования. Показано, что 26 % выделенных изолятов *E. coli* имели фенотипы МЛУ, что ассоциировано с соответствующим уровнем выявления генов антибиотикорезистентности. Всего в геномах *E. coli* было обнаружено 82 гена бета-лактамаз, включая *bla*_{CTX-M} (n=48), *bla*_{TEM} (n=33) и *bla*_{NDM} (n=1), а также интегроны класса 1 (n=21). Выявлено преобладание резистомов *E. coli*, сочетающих несколько генов: комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*int1* была обнаружена в 18 изолятах *E. coli*, выделенных от 13 пациентов (а именно, 5, 8, 9, 19, 20, 21, 22, 23, 37, 39, 45, 48 и 49); комбинация генов *bla*_{NDM}+*int1* – в одном изоляте от одного пациента (а именно, 23) (рисунок 4.12).

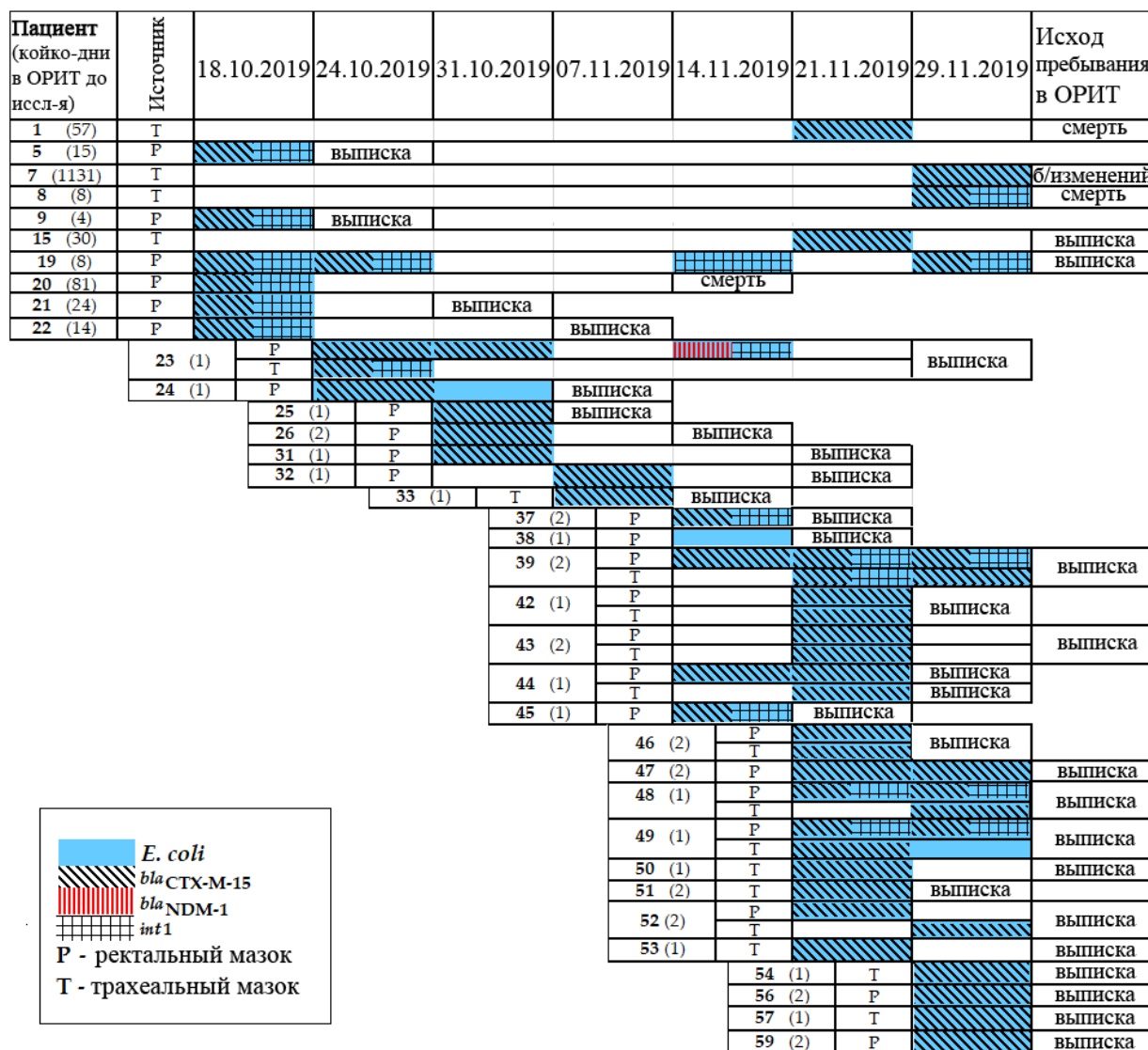


Рисунок 4.12 – Динамика обнаружения изолятов *E. coli*, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Изоляты *A. baumannii* были выделены от 20 (33 %) пациентов, в том числе от 8 пациентов (а именно 1, 4, 8, 10, 15, 22, 34 и 49) у которых *A. baumannii* были выделены из ректальных мазков и трахеальных мазков одновременно хотя бы один раз за время обследования. Показано, что 85 % выделенных изолятов *A. baumannii* имели фенотипы МЛУ, что ассоциировано с высоким уровнем выявления генов антибиотикорезистентности. В геномах *A. baumannii* было обнаружено 135 генов бета-лактамаз, включая *bla*_{TEM} (n=21), *bla*_{CTX-M} (n=9), *bla*_{OXA-51-like} (n=54), *bla*_{OXA-40-like} (n=43) и *bla*_{OXA-23-like} (n=8); а также интегроны класса 1 (n=36). Комбинация генов *bla*_{OXA-40-like}+*bla*_{OXA-51-like}+*int1* была идентифицирована в 23 изолятах *A. baumannii*, выделенных от 11 пациентов (а именно, 2, 8, 15, 19, 20, 21, 22, 34, 37, 47 и 55). Комбинация генов *bla*_{OXA-40-like}+*bla*_{OXA-51-like} была обнаружена в 10 изолятах, выделенных от 4 пациентов (а именно, 4, 19, 20 и 34); комбинация генов *bla*_{OXA-23-like}+*bla*_{OXA-51-like} - в 7 изолятах от 4 пациентов (а именно, 1, 12, 32 и 49); комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-40-like}+*bla*_{OXA-51-like}+*int1* - в 6 изолятах от 5 пациентов (а именно, 18, 19, 20, 21 и 22). Наименее представленные комбинации генов *bla*_{OXA-51-like}+*int1* обнаружены в 3 изолятах от 2 пациентов (а именно, 9 и 10), *bla*_{OXA-40-like}+*bla*_{OXA-51-like} - в 2 изолятах от 2 пациентов (а именно, 1 и 46), и *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-23-like}+*bla*_{OXA-51-like} - в 1 изоляте от 1 пациента (а именно, 1) (рисунок 4.13).

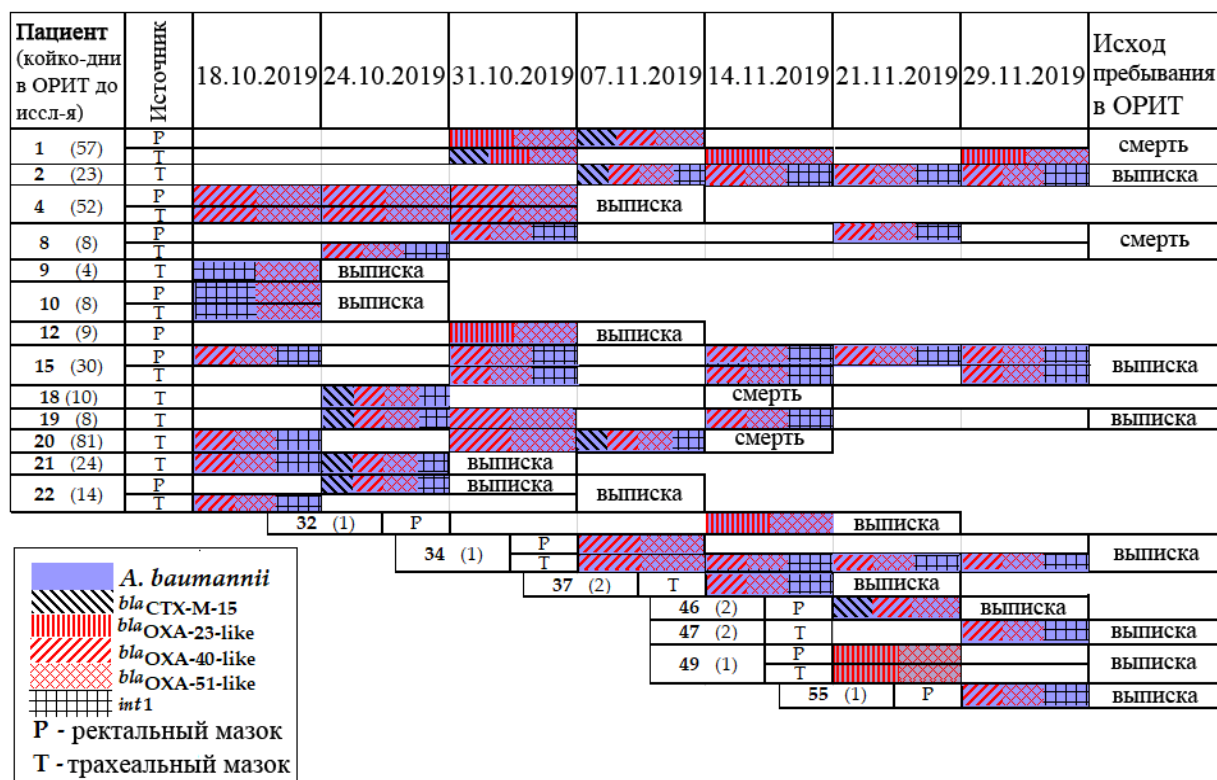


Рисунок 4.13 – Динамика обнаружения изолятов *A. baumannii* выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Изоляты *P. aeruginosa* были выделены от 14 (23 %) пациентов, в том числе от 4 пациентов (а именно 1, 2, 3 и 32), у которых *P. aeruginosa* были выделены из ректальных мазков и трахеальных мазков одновременно хотя бы один раз за время обследования. Показано, что 100 % выделенных изолятов *P. aeruginosa* имели фенотипы МЛУ, что ассоциировано с высоким уровнем выявления генов антибиотикорезистентности. Всего в геномах *P. aeruginosa* было обнаружено 5 генов бета-лактамаз, включая 3 гена *bla*_{CTX-M} и 2 гена карбапенемазы *bla*_{VIM}, а также 32 интегрона класса 1. Комбинация генов *bla*_{CTX-M}+*int1* была обнаружена в 3 изолятах, выделенных от 3 пациентов (а именно, 2, 3 и 20); комбинация генов *bla*_{VIM}+*int1* - в 2 изолятах, выделенных от 1 пациента (а именно, 34) (рисунок 4.14).

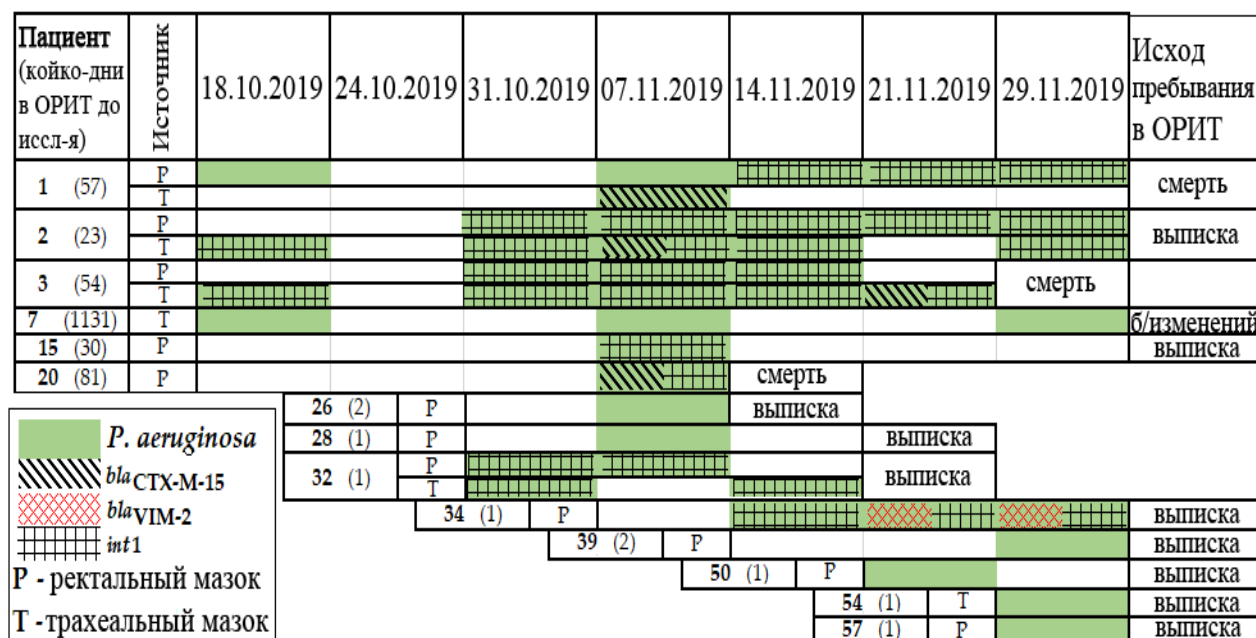


Рисунок 4.14 – Динамика обнаружения изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Таким образом, показано, что интегроны классов 1 и 2 присутствовали в 63 % клинических изолятов ГОБ, в том числе в 69 % *K. pneumoniae*, в 34 % *E. coli*, в 68 % *A. baumannii* и в 76 % *P. aeruginosa*.

4.5. Изучение геномов *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39, капсульного типа K23, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз

Анализ полных геномов изолятов *K. pneumoniae* ST39/K23, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз позволил определить аллельный профиль генов домашнего хозяйства, соответствующий сиквенс-типу ST39: *garA2*

(ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы); *infB1* (ген фактора инициации трансляции); *mdh2* (ген малатдегидрогеназы); *pgi4* (ген фосфоглюкозоизомеразы); *phoE9* (ген фосфопорина E); *rpoB1* (ген бета-субъединицы РНК-полимеразы B); *tonB14* (ген периплазматического энергетического трансдучера). Капсульный тип изолятов идентифицирован как K23 по аллелю гена *wzi83*, кодирующего белок наружной мембраны, участвующий в прикреплении капсулы *K. pneumoniae* к поверхности эукариотической клетки.

Размеры полных геномов варьировали от 5,02 до 8,61 Mb, GC-состав – от 50,96 до 58,02 %, количество контигов варьировало от 143 до 1261, количество генов – от 4861 до 6033 (таблица 4.5).

Фенотипы и генотипы чувствительности к антимикробным препаратам.

Четыре клинических изолята, выделенных из ректальных и трахеальных мазков от пациентов 3, 11, 12 и 20, характеризовались фенотипами МЛЮ (таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Характеристика изолятов *K. pneumoniae* ST39/K23, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз

Изолят	Дата выделения	Источник выделения	Пациент	МПК, мг/л						МЛЮ*
				CAZ	MEM	TGC	GEN	CIP	CHL	
11РКР/19а	18.10.2019	Р	11	>256	128	16	>256	256	>256	5
12РКР/19с	31.10.2019	Р	12	ND	>256	ND	>256	256	ND	3
20РКр/19с	31.10.2019	Р	20	>256	>256	2	>256	256	256	5
ЗТКР/19g	21.11.2019	Т	3	>256	256	ND	>256	ND	>256	3

Примечание: МПК – минимальная подавляющая концентрация; МЛЮ – множественная лекарственная устойчивость; * - количество классов антимикробных препаратов, к которым изолят устойчив; Р – ректальный мазок; Т – трахеальный мазок; CAZ – цефтазидим; MEM – меропенем; TGC – тигециклин; GEN – гентамицин; CIP – цiproфлоксацин; CHL – хлорамфеникол

Все изоляты имели фенотипы МЛЮ, были устойчивы к цефалоспорином, карбапенемам, тетрациклинам, аминогликозидам, фторхинолонам и хлорамфениколу. В их геномах идентифицированы от 6 до 8 генов бета-лактамаз, от 3 до 7 генов резистентности к аминогликозидам, по одному гену устойчивости к фосфомицину, от 2 до 3 генов устойчивости к фениколам, по три гена устойчивости к хинолону, по два гена устойчивости к сульфаниламидам и от 1 до 2 генов устойчивости к макролидам.

Таблица 4.5 – Характеристика полных геномов изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз

	<i>K. pneumoniae</i> strain									
	11PKP/19a	4PKP/19c	4TKP/19c	6PKP/19c	7TKP/19c	8TKP/19c	12PKP/19c	12TKP/19c	20PKP/19c	3TKP/19g
ID изолята	SCPM-O-B-8912	SCPM-O-B-8914	SCPM-O-B-8915	SCPM-O-B-8916	SCPM-O-B-8917	SCPM-O-B-8918	SCPM-O-B-8919	SCPM-O-B-8920	SCPM-O-B-8922	SCPM-O-B-8923
Сиквенс-тип/ Капсульный тип	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23	ST39/K23
Источник выделения	rectal swab	rectal swab	tracheal swab	rectal swab	tracheal swab	tracheal swab	rectal swab	tracheal swab	rectal swab	tracheal swab
Дата выделения	18-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Oct-2019	21-Nov-2019
Характеристики полногеномных последовательностей										
BioSample ID	SAMN18878033	SAMN18878035	SAMN18878036	SAMN18878037	SAMN18878038	SAMN18878039	SAMN18878040	SAMN18928738	SAMN18928740	SAMN18928741
Номер SRA	SRR14338904	SRR14338902	SRR14338901	SRR14338900	SRR14338899	SRR14338898	SRR14338897	SRR14493699	SRR14493697	SRR14493696
GenBank	JAGUTV000000000	JAGUTT000000000	JAGVVO000000000	JAGUTS000000000	JAGUTR000000000	JAGUTQ000000000	JAGVVJ000000000	JAHAVO000000000	JAHAVM000000000	JAHAVL000000000
GC-состав, %	56.62	56.71	50.96	56.82	56.61	56.75	56.75	58.02	56.61	56.63
Number of reads	1456636	2144028	785708	717966	891800	610484	656388	15594554	20917268	17905631
Количество контигов	200	223	1261	422	274	291	159	143	183	173
Размер генома, п.н.	6025232	5988366	8613020	5716153	5960613	5895045	5858555	5018211	6013894	6018579
Средний размер рида, ×	192	194	257	256	260	261	261	194	194	193
Размер генома, ×	53	78	23	32	38	26	29	750	769	668
N50, п.н.	201524	190681	58722	41652	99187	93206	121985	112581	220508	218689
Количество генов	6032	6013	4861	5899	6025	5970	5847	4954	6033	6032
Генетические детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам										
Бета-лактамы	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{SHV-40} <i>bla</i> _{TEM-1B} <i>bla</i> _{CTX-M-15} <i>bla</i> _{OXA-1} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>bla</i> _{OXA-48} <i>bla</i> _{KPC-2} <i>bla</i> _{NDM-1}
Аминогликозиды	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (3'')- <i>Ia</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (3'')- <i>Ia</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i> <i>aadA8b</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA1</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (3'')- <i>Ia</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA1</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA1</i> <i>armA</i>	<i>aac</i> (6') <i>aac</i> (3)- <i>Ila</i> <i>ant</i> (3'')- <i>Ia</i> <i>ant</i> (2'')- <i>Ia</i> <i>aadA2</i> <i>armA</i>
Фосфомидины	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
Фениколы	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>catA1</i> <i>catB3</i>	<i>cmlA1</i> <i>catA1</i> <i>catB3</i>
Хинолон	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>	<i>qnrS1</i> <i>oqxA</i> <i>oqxB</i>
Сульфаниламиды	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
Триметоприм	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA12</i>
Макролиды	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>	<i>msrE</i>	<i>mphE</i> <i>msrE</i>

Продолжение таблицы 4.5

Генетические детерминанты вирулентности (локусы)							
Адгезин типа 3	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>	<i>mrk</i>
Ген биосинтеза иерсиниабактина	<i>irp</i>	<i>irp</i>	<i>irp</i>	<i>irp</i>	<i>irp</i>	<i>irp</i>	<i>irp</i>
Система иерсиниабактина Ybt	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>	<i>ybt</i>
Рецептор сидерофора иерсиниабактина	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>	<i>fyu</i>
Ген синтеза сидерофора аэробактина	<i>iuc</i>	<i>iuc</i>	<i>iuc</i>	-	<i>iuc</i>	<i>iuc</i>	<i>iuc</i>
Транспорт поглощения железа	<i>iut</i>	<i>iut</i>	<i>iut</i>	-	<i>iut</i>	<i>iut</i>	<i>iut</i>
Плазмиды, системы рестрикции-модификации и системы CRISPR-Cas							
Плаزمида	ColRNAI IncC IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncA/C2 IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncA/C2 IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncC IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncC IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncA/C2 IncFIB IncFII IncHI1B	ColRNAI IncC IncFIB IncFII IncHI1B
Ферменты рестрикции I типа	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II	M.Kpn928I S.Kpn1420II
Ферменты рестрикции II типа	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm
CRISPR-Cas система	Type I	Type I, TypeU	Type I	Type I	Type I, TypeU	Type I, TypeU	Type I

В геномах идентифицированы генетические детерминанты вирулентности: ген адгезина 3 типа, гены оперона иерсиниобактина и оперона аэробактина. В каждом изоляте идентифицированы по пять групп несовместимости плазмид, по две системы рестрикции-модификации I типа и по одной системе рестрикции-модификации II типа, а также CRISPR-Cas-системы типов I и U (таблица 4.5).

Изучение стабильности уникального резистоста *K. pneumoniae* $bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}+bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1}+intl1$. Сложный резистом, включающий гены четырех бета-лактамаз $bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}+bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1}$ и двух интегронов класса 1, не описанный ранее, был идентифицирован в четырех изолятах *K. pneumoniae*, выделенных от четырех пациентов (а именно, 3, 11, 12 и 20) из ректальных и трахеальных мазков в период с 18.10.2019 г. по 29.11.2019 г. Изучение стабильности этого резистоста было проведено на примере клинического изолята *K. pneumoniae* 11PKP/19a, выделенного 18.10.2019 г из ректального мазка пациента 11. Дизайн исследования включал в себя следующие этапы: 1) культивирование на плотной питательной среде LB без селективного давления антибиотиков; 2) культивирование на плотной питательной среде LB с 10 мг/л меропенема; 3) три пассажа культивирования на плотной питательной среде LB без селективного давления антибиотиков. На каждом этапе оценивали наличие генов bla_{NDM-1} , bla_{KPC-2} , bla_{OXA-48} , $bla_{CTX-M-15}$ и $intl1$ в клетках бактерий. Показано, что данный клинический изолят стабильно наследовал все пять названных генов антибиотикорезистентности как в отсутствии селективного давления меропенема, так и в присутствии меропенема в концентрации 10 мг/л (рисунок 4.15).

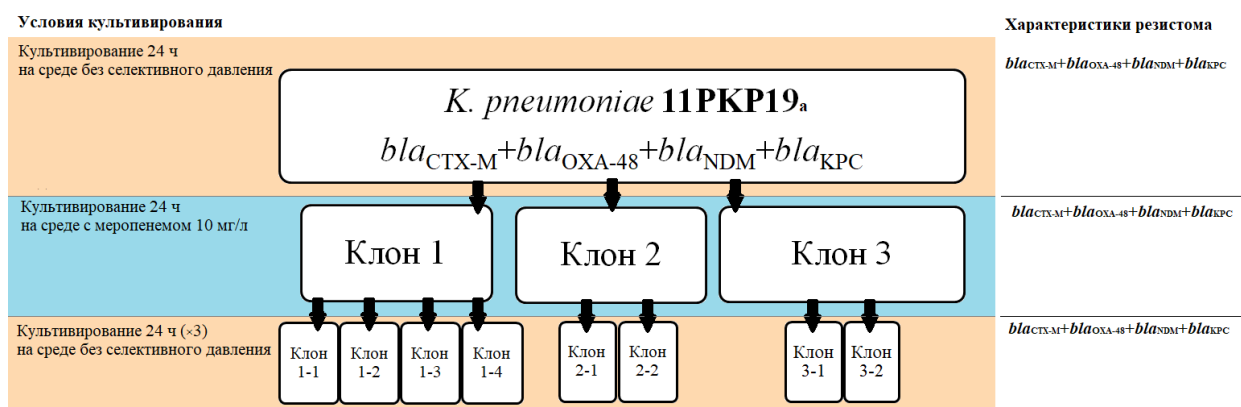


Рисунок 4.15 – Схема эксперимента по оценке стабильного наследования генов bla_{NDM-1} , bla_{KPC-2} , bla_{OXA-48} , $bla_{CTX-M-15}$ и $intl1$ в клетках бактерий клинического изолята *K. pneumoniae* 11PKP/19a в селективных и неселективных условиях культивирования

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей изолятов *K. pneumoniae*. Определено филогенетическое родство полных геномов изучаемых изолятов с последовательностями изолятов *K. pneumoniae*, представленными в международной базе данных GenBank (рисунок 4.16). Показана кластеризация изучаемых изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC-2}* и *bla_{NDM-1}*, в отдельную группу, наиболее близким к которой был изолят *K. pneumoniae* ST39^{K2} E50-2 [JALJUW01], несущий хромосомные гены бета-лактамазы *bla_{SHV-1}*, поринового белка *ompK36* и эффлюксных систем *marA1* и *marR3*, выделенный из госпитальной среды в республике Гана в 2021 г. Далее следует *K. pneumoniae* TH12852 ST2643^{K23} [CP087122], несущий гены *bla_{SHV-61}* и *bla_{CTX-M-55}*, ген устойчивости к серебру *silR106*, к хинолонам *gyrA4* *gyrB1*, *parC2* и *parE1*, эффлюксных систем *acrA45*, *acrB188*, *acrR64*, *marA1*, *marR1*, *soxS28*, *soxR12*, *ramA2*, *ramR2*, *rob3*, *sdiA1*, *fis1*, *envR2*, *oqxA168*, *oqxB199*, *oqxR3* и *rarA45* и кластер генов вирулентности *mrkABCDHFIIJ*, выделенный из крови пациента Чангенгского госпиталя в Китае в 2021 г. Остальные 13 полногеномных последовательностей, представленные на дендрограмме, показывают разнообразие филогенетических групп изолятов *K. pneumoniae*.

Характеристика структуры хромосом изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC-2}* и *bla_{NDM-1}*. Анализ нуклеотидных последовательностей хромосом четырех клинических изолятов *K. pneumoniae* 11PKP/19a, 12PKP/19c, 20PKp/19c и 3TKP/19g показал высокую степень их гомологии (99,96-99,99 %). Размеры хромосом варьировали от 5350432 до 5351820 п.н., количество генов – от 5902 до 6091, количество кодирующих генов – от 5626 до 5801 (таблица 4.6).

В хромосомах всех четырех изолятов 11PKP/19a (В-8912), 12PKP/19c (В-8919), 20PKp/19c (В-8922) и 3TKP/19g (В-8923) идентифицированы одинаковые наборы генов антибиотикорезистентности: БЛРС *bla_{SHV-40}*, кластера эффлюксного насоса *oqxAB* и устойчивости к фосфомицину *fosA(3)*.

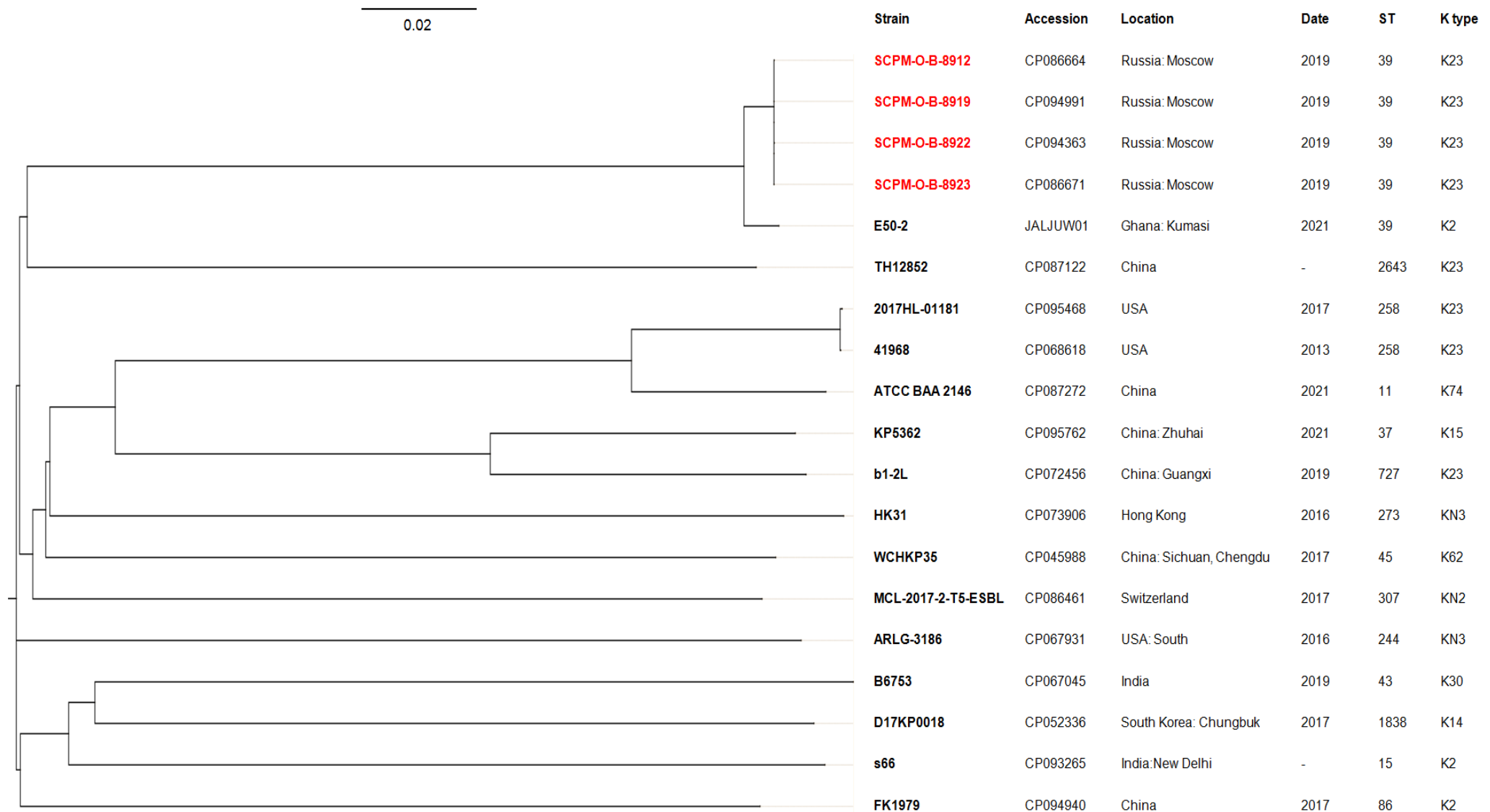


Рисунок 4.16 – Филогенетическое дерево изолятов *K. pneumoniae*, построенное на основе полных последовательностей хромосом

Таблица 4.6 – Характеристика хромосом изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз

Номер изолята	11PKP/19a	12PKP/19c	20PKp/19c	3TKP/19g
Номер в коллекции «ГКПМ-Оболенск»	SCPM-O-B-8912	SCPM-O-B-8919	SCPM-O-B-8922	SCPM-O-B-8923
Номер в БД GenBank	CP086664	CP094991	CP094363	CP086671
Размер хромосомы, п.н.	5351360	5350432	5348898	5351820
Количество генов, всего	6079	5902	6079	6091
Количество кодирующих генов	5788	5626	5790	5801
Количество генов РНК	126	126	126	126
Количество генов рРНК (5S, 16S, 23S)	9, 8, 8	9, 8, 8	9, 8, 8	9, 8, 8
Количество генов тРНК	88	88	88	88
Количество псевдогенов, всего	165	150	163	164
- сдвинутых по рамке	67 of 165	61 of 150	65 of 163	66 of 164
- неполных	102 of 165	88 of 150	101 of 163	102 of 164
- со стоп-кодонами	25 of 165	22 of 150	25 of 163	26 of 164
- с множественными мутациями	24 of 165	18 of 150	23 of 163	25 of 164
Тип CRISPR-Cas системы	TypeIE	TypeIE	TypeIE	TypeIE

Кроме того, в хромосомах идентифицированы одинаковые наборы генов вирулентности: ген рецептора сидерофора иерсиниабактина *fyuA20*, гены биосинтеза иерсиниабактина *irp1*(62) и *irp2*(69), гены кластера синтеза сидерофора аэробактера *iucA*(46)*B*(1)*C*(1)*D*(1), ген транспортера поглощения железа *iutA*(1), гены кластера адгезина 3 типа *mrkA*(17)*B*(22)*C*(160)*C*(302)*D*(28)*F*(8)*I*(7)*J*(6), гены системы иерсиниабактина *ybtA*(1)*A*(39)*E*(4)*P*(4)*Q*(5)*S*(4)*T*(4)*T*(42)*U*(2)*X*(4). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей хромосом изучаемых изолятов выявил десять структурных различий между ними: восемь инсерций IS-подобных элементов, один повтор и одна инверсия в области локализации профага (таблица 4.7).

Таблица 4.7 – Структурные различия хромосом изолятов

	Изолят	Различие	Описание
1	SCPM-O-B-8912 SCPM-O-B-8919 SCPM-O-B-8923	нарушение работы гена белка семейства лизофосфолипидных ацилтрансфераз	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26
2	SCPM-O-B-8922	нарушение работы гена белка семейства О-антигенной лигазы	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26
3	SCPM-O-B-8923	нарушение работы гена <i>glpT</i> (глицерол-3-фосфатный транспортер)	вставка IS4-подобных элементов транспозазы семейства ISVsa5
4	SCPM-O-B-8922	инсерция между генами фосфатазы белка семейства PAP2 и гипотетического белка	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26

Продолжение таблицы 4.7

5	SCPM-O-B-8922	удаление 4 генов в кластере <i>rfb</i> , гомологов генов <i>gmlABC</i> (кодирует структурную модификацию D-галактана I) и <i>kfoC</i> (функция неизвестна)	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26
6	SCPM-O-B-8912	нарушение одного гена IV белка системы секреции	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26
7	SCPM-O-B-8912 SCPM-O-B-8919 SCPM-O-B-8923	нарушение работы гена белка семейства аспартат/глутамат рацемазы	вставка IS1-подобных элементов транспозазы семейства transposase
8	SCPM-O-B-8922	нарушение одного гена регуляторного мембранного белка MgrB двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ	вставка IS5-подобных элементов транспозазы семейства ISKpn26
9	SCPM-O-B-8919	изменение направлений трех генов (гипотетических белков) и длин двух из них	инверсия в области профага
10	SCPM-O-B-8912	делеция между генами <i>rPHK-Ser</i> и белка семейства DsbA	повтор

Таким образом, анализ хромосом изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC-2} и *bla*_{NDM-1}, указывает на микроэволюционные процессы внутри близкородственных изолятов сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23.

Характеристика плазмидного состава изолятов *K. pneumoniae*. В геномах изучаемых изолятов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1 и гены карбапенемаз, идентифицированы три разных набора плазмид:

(1) набор из четырех высокомолекулярных плазмид групп несовместимости IncHI1B(*bla*_{OXA-48}+*bla*_{OXA-1}+*bla*_{CTX-M-15}), IncC(*bla*_{NDM-1}+*bla*_{OXA-10}+*bla*_{OXA-1}), IncFIB(K)/IncFII(K)(*ars*ABCD+*pco*ABCD+*sil*ABCEFGPRS) и IncFIB(pQil)(*bla*_{KPC-2}), и двух низкомолекулярных плазмид pColRNAI и pUN1 – в двух изолятах *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912) и 3TKP/19g (B-8923);

(2) набор из четырех высокомолекулярных плазмид групп несовместимости IncHI1B(*bla*_{OXA-48}+*bla*_{OXA-1}+*bla*_{CTX-M-15}), IncC(*bla*_{CTX-M-55}), IncFIB(K)/IncFII(K)(*ars*ABCD+*pco*ABCD+*sil*ABCEFGPRS) и IncFIB(pQil)(*bla*_{KPC-2}), и двух низкомолекулярных плазмид pColRNAI и pUN1 – в изоляте *K. pneumoniae* 20PKP/19c (B-8922);

(3) набор из трех высокомолекулярных плазмид групп несовместимости IncHI1B(*bla*_{OXA-48}+*bla*_{OXA-1}+*bla*_{CTX-M-15}), IncC(*bla*_{NDM-1}+*bla*_{OXA-10}+*bla*_{OXA-1}) и

IncFIB(pQil)(*bla*_{KPC-2}), и двух низкомолекулярных плазмид pColRNAI и pUN1 – в изоляте *K. pneumoniae* 12РКР/19с (В-8919) (рисунок 4.17).

Репликон	IncHI1B	IncC	IncC	IncFIB(K)/IncFII(K)	IncFIB(pQil)	ColRNAI	pUN1
Гены БЛ	<i>bla</i> OXA-48 <i>bla</i> OXA-1 <i>bla</i> CTX-M-15	<i>bla</i> CTX-M-55	<i>bla</i> NDM-1 <i>bla</i> OXA-10 <i>bla</i> OXA-1		<i>bla</i> KPC-2		
11РКР/19а (В-8912)	 323074 bp		 174841 bp	 171935 bp	 102252 bp	 9294 bp	 4352 bp
12РКР/19с (В-8919)	 326663 bp		 174840 bp		 102252 bp	 9294 bp	 4352 bp
20РКр/19с (В-8922)	 327418 bp	 169151 bp		 172063 bp	 102252 bp	 9294 bp	 4352 bp
3ТКР/19g (В-8923)	 327685 bp		 174841 bp	 173263 bp	 102252 bp	 9294 bp	 4352 bp

БЛ – бета-лактамазы, Inc – группа несовместимости плазмид

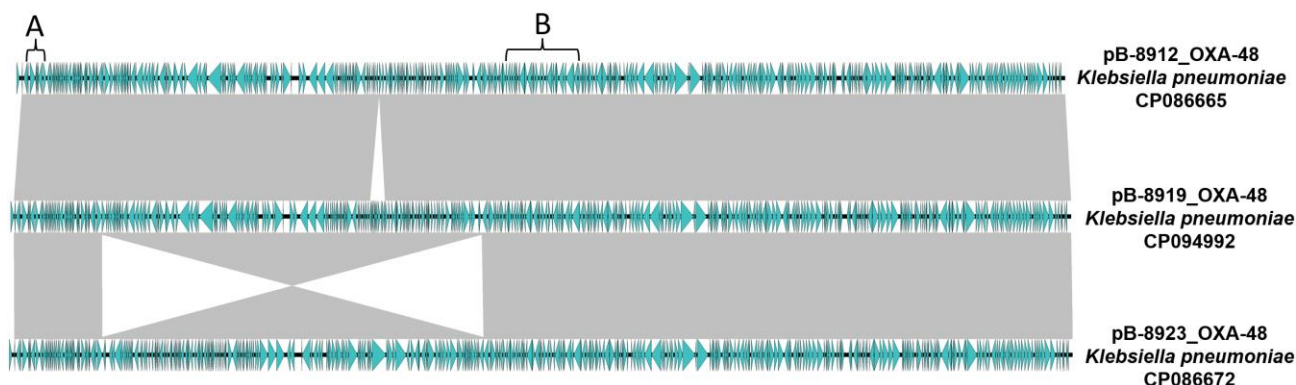
Рисунок 4.17 – Наборы плазмид в изолятах *K. pneumoniae* 11РКР/19а (В-8912), 12РКР/19с (В-8919), 20РКр/19с (В-8922) и 3ТКР/19g (В-8923)

Полученные гибридные сборки последовательностей плазмид были размещены в международную базу данных GenBank (таблица 4.8, Приложение В).

Таблица 4.8 – Номера последовательностей плазмид, размещенных в базе данных GenBank

Изолят / Плазмида	IncHI1B	IncC	IncFIB(K)/ IncFII(K)	IncFIB(pQil)	ColRNAI	pUN1
11РКР/19а (В-8912)	CP086665	CP086666	CP086667	CP086668	CP086669	CP086670
12РКР/19с (В-8919)	CP094992	CP094993	-	CP094994	CP094995	CP094996
20РКр/19с (В-8922)	CP094364- CP094368	CP094370	-	CP094371	CP094372	CP094373
3ТКР/19g (В-8923)	CP086672	CP086673	CP086674	CP086675	CP086676	CP086677

Плазмиды группы несовместимости IncHI1B. Величина плазмид группы несовместимости IncHI1B в изолятах *K. pneumoniae* 11РКР/19а (В-8912), 12РКР/19с (В-8919), 20РКР/19с (В-8922) и 3ТКР/19g (В-8923) составляла от 323074 до 327685 п.н. Различия между их последовательностями составляли менее 1 %. В составе плазмид группы несовместимости IncHI1B идентифицированы эпидемически значимые гены антибиотикорезистентности: БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{TEM-1}, карбапенемазы *bla*_{OXA-48} и цефалоспорины *bla*_{CTX-M-15}, а также интегрон In822 класса 1 с набором генных кассет *aadB-aadA1*, определяющих устойчивость к аминогликозидам. Ген интегразы содержит делецию, не затрагивающую область промотора генной кассеты. Кроме того, идентифицированы гены вирулентности: аэробактин-продуцирующей системы *iucC*; рецептора, улавливающего железо *iutA*; белка устойчивости к ионам теллура *terC*. Показано, что плазмиды группы несовместимости IncHI1B в изучаемых изолятах *K. pneumoniae* 11РКР/19а (В-8912), 12РКР/19с (В-8919), и 3ТКР/19g (В-8923) при сравнении между собой различны: в плазмиде рOXA-48 выявлена делеция размером 46 п.н., по сравнению с плазмидой рВ-8919_OXA-48, а в плазмиде рВ-8923_OXA-48 – инверсия размером ~110 т.п.н. (рисунок 4.18).



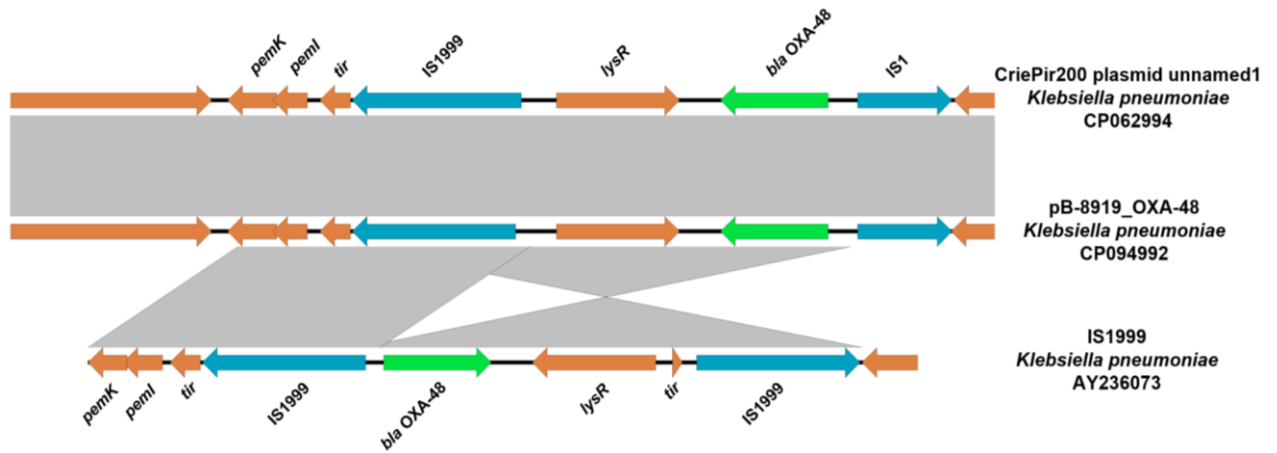
А – регион локализации гена *bla*_{OXA-48}

В – регион локализации генов бета-лактамаз *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{OXA-1} и интегрона класса 1

Рисунок 4.18 – Сравнение структурной организации плазмид рOXA-48 [CP086665], рВ-8919_OXA-48 [CP094992] и рВ-8923_OXA-48 [CP086672] в изолятах *K. pneumoniae* 11РКР/19а (В-8912), 12РКР/19с (В-8919) и 3ТКР/19g (В-8923), соответственно

Сравнение структуры генетического окружения гена *bla*_{OXA-48} в изучаемом изоляте *K. pneumoniae* 12РКР/19с (В-8919) с таковым в плазмиде [CP062994] штамма *K. pneumoniae* CriePir200, выделенного из мокроты пациента ФГБУ «Национального медико-хирургического Центра им. Н.И.Пирогова» Минздрава РФ, г. Москва, в 2018 г., описанного в работе Shelenkov et al., 2020 [196] показало

идентичность данных регионов, но в другом клиническом штамме *K. pneumoniae* 11978 [AY236073], выделенном в Турции в 2001 г. [167], размещенном в базе данных GenBank, выявлена инверсия данного региона (рисунок 4.19).



голубой цвет - мобильные генетические элементы; зеленый цвет - гены бета-лактамаз;
оранжевый цвет - другие гены

Рисунок 4.19 – Сравнение генетического окружения гена *bla*_{OXA-48} в плазмиде pB-8919_OXA-48 [CP094992] изолята *K. pneumoniae* 12PKP/19c (B-8919) (Регион А на рисунке 4.18) с таковым в плазмидах штамма *K. pneumoniae* CriePir200 [CP062994] и штамма *K. pneumoniae* 11978 [AY236073]. Стрелками показаны открытые рамки считывания (*orf*), их протяженность и ориентация

Сравнение структуры генетического окружения гена *bla*_{CTX-M-15} в изоляте *K. pneumoniae* 12PKP/19c (B-8919) с аналогичным участком в плазмиде [CP062994] штамма *K. pneumoniae* CriePir200, описанного Shelenkov et al., 2020 [196], показало наличие делеции протяженного участка, включающего гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{OXA-1} и интегрона класса 1 в плазмиде сравнения (рисунок 4.20).

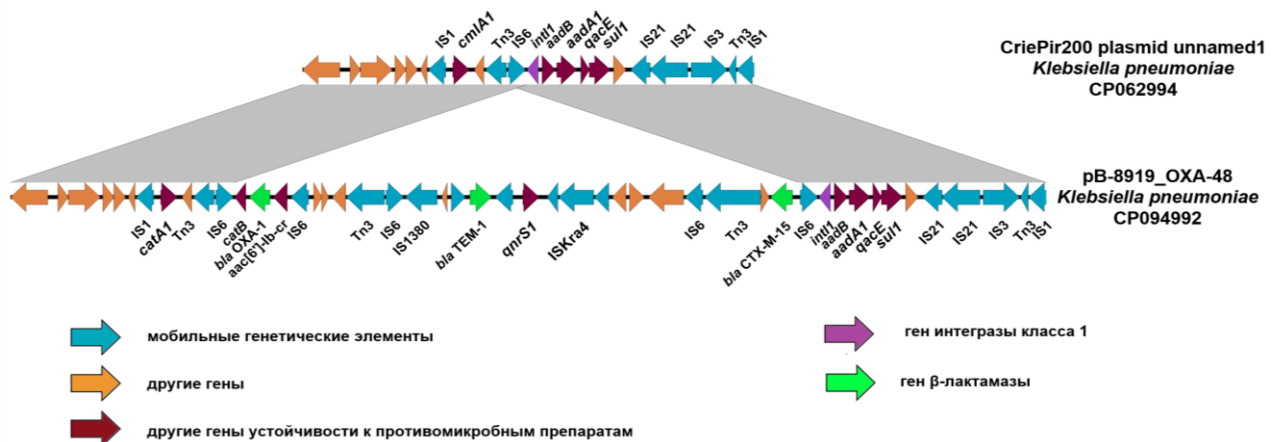


Рисунок 4.20 – Локализация генов *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} и *bla*_{OXA-1} и интегрона класса 1 на участке плазмиды pB-8919_OXA-48 [CP094992] (регион В на рисунке 4.18) в изоляте *K. pneumoniae* 12PKP/19c (B-8919); сравнение с плазмидой из штамма *K. pneumoniae* CriePir200 [CP062994]. Стрелками показаны открытые рамки считывания (*orf*), их протяженность и ориентация

Плазмиды группы несовместимости IncC(*bla*_{NDM-1}). Величина плазмид группы несовместимости IncC(*bla*_{NDM-1}) в изолятах *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 12PKP/19c (B-8919), и 3TKP/19g (B-8923) варьировала незначительно – от 174840 до 174841 п.н. На этих плазмидах локализованы эпидемически значимые гены БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{OXA-10}, карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и двух интегронов класса 1, несущих наборы генных кассет *arr3-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1* и *dfrA12-orfF-aadA1*.

В составе первого интегрона присутствуют четыре генных кассеты: *arr3*, определяющая устойчивость к рифампицину; *cmlA5* - устойчивость к хлорамфениколу; *bla*_{OXA-10} – устойчивость к бета-лактамам расширенного спектра; *aadA1* – устойчивость к аминогликозидам (Приложение Г). Интегрон такой же структуры был описан ранее в изоляте *Providencia rettgeri*, вызвавшем раневую инфекцию пациента ОРИТ в Мадагаскаре [214].

В составе второго интегрона присутствует три генные кассеты: *dfrA12*, обеспечивающая устойчивость к триметоприму; *orfF*, кодирующая гипотетический белок с неизвестной функцией; *aadA1*, обеспечивающая устойчивость к аминогликозидам (Приложение Г). Интегроны такого состава имеют идентификационный номер In27 в специализированной базе данных INTEGRALL, являются широко распространенными в геномах ГОБ, в том числе нами In27 были описаны в клинических изолятах *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. aeruginosa*, выделенных в 2005 – 2019 гг. [5].

Сравнение плазмид группы несовместимости IncC(*bla*_{NDM-1}) в изучаемых изолятах *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 12PKP/19c (B-8919), и 3TKP/19g (B-8923) с ближайшими аналогами из базы данных GenBank выявило наличие у изучаемых нами изолятов дополнительного интегрона класса 1 с набором генных кассет *arr3-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1* и транслокацию интегрона In27 по сравнению с локализацией в плазмидах NC_018994 и AP018143 (рисунок 4.21).

Плазмида группы несовместимости IncC(*bla*_{CTX-M-55}). В изоляте 20PKp/19c (B-8922) плазмида группы несовместимости IncC имеет размер 169151 п.н. несет ген цефалоспорины *bla*_{CTX-M-55}. Ближайшим аналогом (82 % перекрытия, 99 % идентичности) в базе данных GenBank является плазмида pECO-dclb из штамма *E. coli*, выделенного из больничного водопровода в США в 2015 г., однако, эта плазмида не несла гена *bla*_{CTX-M-55}. В то же время, поиск в базе данных NCBI показал,

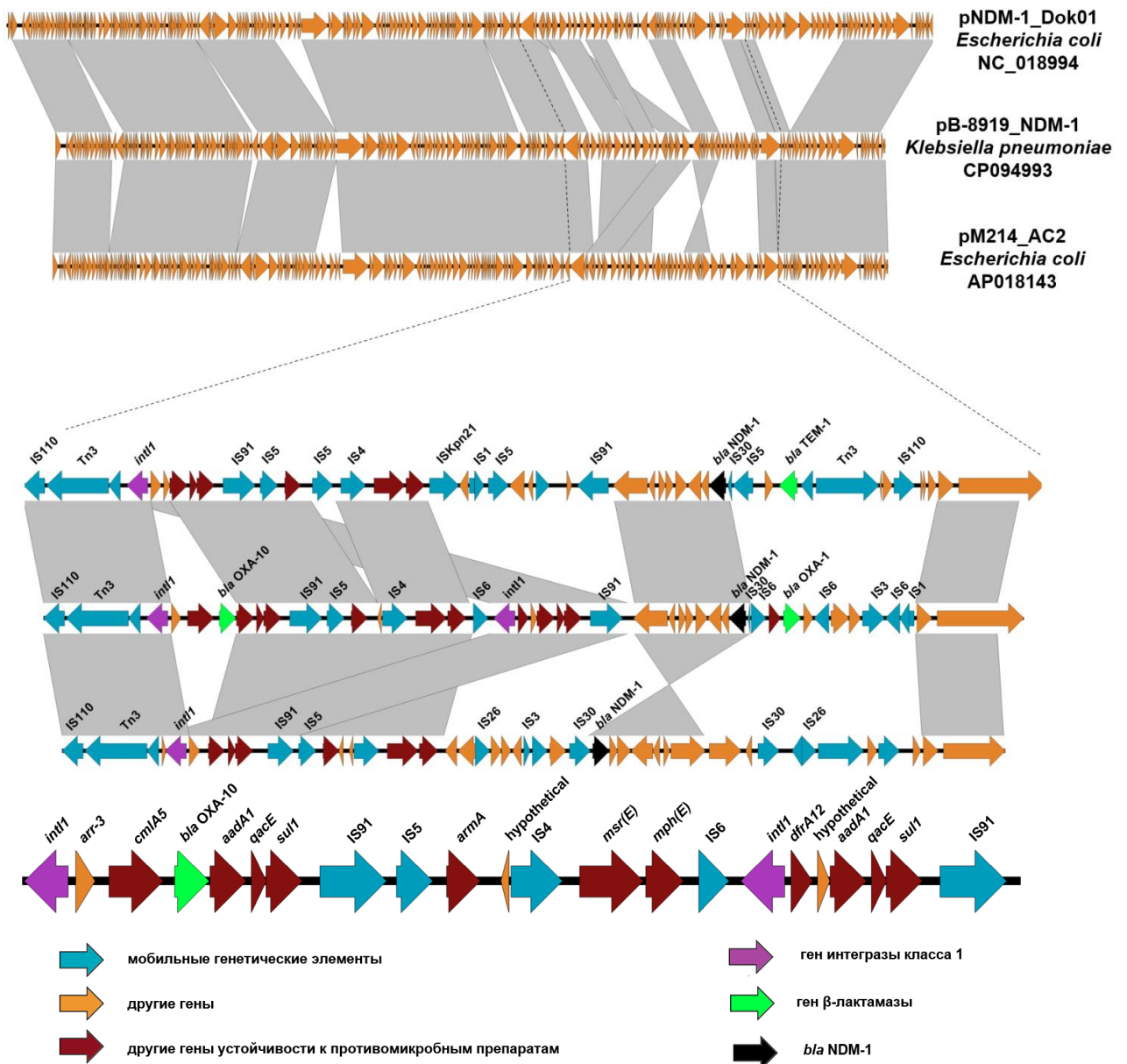


Рисунок 4.21 – Сравнение локализации генов бета-лактамазы и двух интегронов классов 1 на последовательностях плазмид NC_018994 и AP018143 с CP094993, детектированной в изоляте *K. pneumoniae* 12PKP/19c (B-8919)

что ген *bla*_{CTX-M-55}, впервые описанный в клинических изолятах *E. coli* и *K. pneumoniae* в Таиланде в 2006 г. [119], распространен на плазмидах, таких как IncI2 из *Salmonella enterica*, выделенной из фекалий человека в Китае в 2008 [226] и pTREC9 из *E. coli*, выделенной из водно-болотных отложений в США в 2016 г. [MN158992]. Генетическое окружение гена *bla*_{CTX-M-55} – мобильные генетические элементы *ISEcp1-bla*_{CTX-M-55}-*orf477*, которое было описано ранее в плазмидах pHN1122-1 и p1081-CTXM [48]. Между *ISEcp1* и *bla*_{CTX-M-55} находится спейсер 45 п.н., что подтверждает событие мобилизации гена *bla*_{CTX-M-55} мобильным элементом *SEcp1* в плазмиду группы несовместимости IncA/IncC.

Плазмиды гибридной группы несовместимости IncFIB(K)/IncFII(K).

Последовательности плазмид группы несовместимости IncFIB(K)/IncFII(K) в трех исследуемых геномах изолятов *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 20PKp/19c (B-8922) и 3TKP/19g (B-8923) имели размеры от 171,9 до 173,3 т.п.н. На этих плазмидах локализованы опероны, определяющие устойчивость к тяжелым металлам *arsABCDS*, *pcoABCDS* и *silABCEFGPRS*.

Плазмиды группы несовместимости IncFIB(pQil). Последовательности плазмид группы несовместимости IncFIB(pQil) во всех исследуемых четырех геномах изолятов *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 12PKP/19c (B-8919), 20PKp/19c (B-8922) и 3TKP/19g (B-8923) были идентичны на 100 %, их размер составил 102252 п.н. На этих плазмидах локализован эпидемически значимый ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2} в составе транспозона Tn4401. Сравнение плазмид группы несовместимости IncFIB(pQil) в изучаемых нами изолятах с ближайшим аналогом из базы данных GenBank, плазмидой pKpQIL [MT809701] из *K. pneumoniae*, выделенной в Италии в 2021 г., показало, что они гомологичны на 99,6 %. В плазмидах группы несовместимости IncFIB(pQil) в изучаемых нами изолятах, помимо транспозона Tn4401, выявлены генетические компоненты системы конъюгативного переноса IV типа, токсин-антитоксиновой системы RelE/ParE, системы рестрикции-модификации III типа, фосфолипазы и белки с неизвестными функциями (рисунок 4.22).

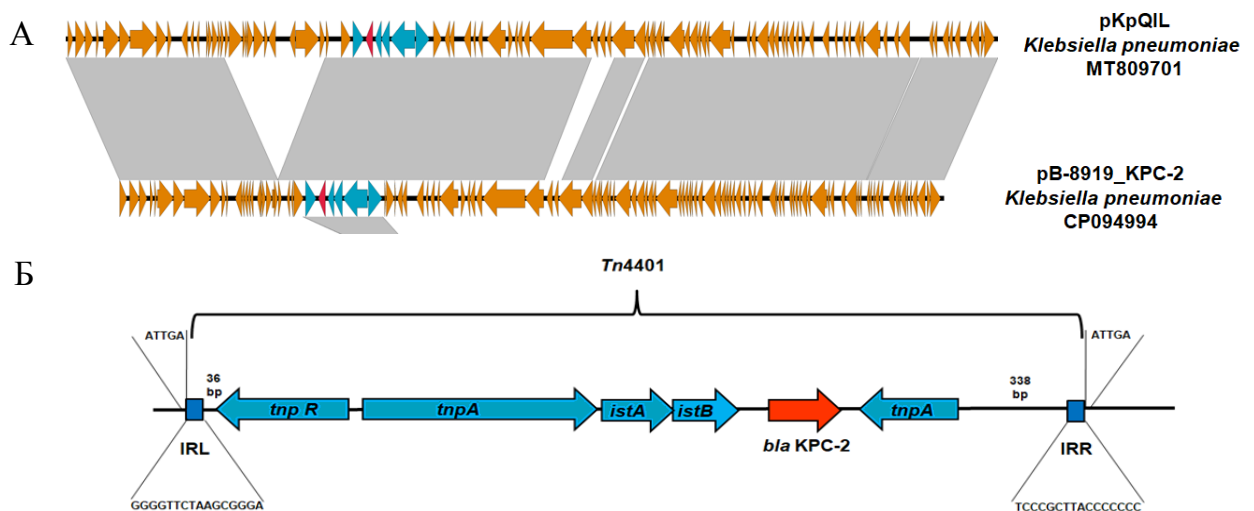


Рисунок 4.22 – Сравнение локализации гена карбапенемазы *bla*_{KPC-2} на последовательности плазмиды pB-8919_KPC-2 [CP094994] в изоляте *K. pneumoniae* 12PKP/19c (B-8919) с таковым в плазмиде pKpQIL [MT809701] в штамме *K. pneumoniae* (A); структура транспозона Tn4401, несущего ген *bla*_{KPC-2} (Б)

Низкомолекулярные плазмиды pColRNAI. Плазмиды pColRNAI, описанные в геномах изолятов *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 12PKP/19c (B-8919), 20PKp/19c (B-8922) и 3TKP/19g (B-8923), составляли 9294 п.н. и были полностью идентичны. Эти плазмиды несли гены, кодирующие колицин, клоацин и токсин-антитоксиновую систему RelE/ParE. Сравнение изучаемых плазмид с ближайшим аналогом из базы данных GenBank с плазмидой Kpn-WC17-012-04 [CP094916] *K. pneumoniae* из прямой кишки пациента госпиталя в США в 2021 г., показало 99,98 % гомологии.

Низкомолекулярные плазмиды pUN1. Величина плазмид pUN1, детектированных в геномах изолятов *K. pneumoniae* 11PKP/19a (B-8912), 12PKP/19c (B-8919), 20PKp/19c (B-8922) и 3TKP/19g (B-8923), составляла 4352 п.н. Последовательности этих плазмид при сравнении были полностью гомологичны и несли гены, которые кодируют синтез белков, обеспечивающих конъюгативную мобилизацию данных плазмид между бактериальными клетками. Ближайшим аналогом (95 % перекрытия, 89,85 % идентичности) в базе данных GenBank является криптическая плазида P2 [OW967880] *S. marcescens*, выделенной в госпитале Испании в 2022 г.

4.6. Заключение по главе 4

Носительство грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей внутрибольничных инфекций, у пациентов высокотехнологичных хирургических стационаров может быть расценено как скрытый резервуар патогенов и генов антибиотикорезистентности. В данном исследовании уровень такого носительства составил 78 % пациентов. Особую опасность в этом плане представляют генетические детерминанты, обеспечивающие устойчивость патогенов к бета-лактамам, в том числе, карбапенемам, которые относятся к числу резервных антимикробных препаратов. Среди возбудителей госпитальных инфекций особое положение занимает группа ESKAPE патогенов, в которую входят представители грамотрицательных бактерий *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* и представители порядка *Enterobacterales*. Клинические изоляты названных видов бактерий, выделенные от пациентов нейро-ОРИТ, несли в своих геномах подавляющее большинство генов антибиотикорезистентности,

идентифицированных в данном исследовании, в том числе все выявленные гены карбапенемаз *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{KPC-2} и 72 % интегронов классов 1 и 2.

Высокий уровень присутствия интегронов в геномах грамотрицательных бактерий возбудителей нозокомиальных инфекций представляет большую угрозу для здравоохранения, поскольку связан с формированием фенотипов множественной лекарственной устойчивости у патогенов. Значительная часть интегронов локализуется на конъюгативных плазмидах, несущих другие детерминанты антибиотикорезистентности, в том числе гены карбапенемаз разных классов: класса А (*bla*_{KPC-2}), класса В (*bla*_{VIM-2} и *bla*_{NDM-1}) и класса D (*bla*_{OXA-48}). Показано, что такие плазмиды могут стабильно наследоваться в клетках *K. pneumoniae* и других патогенов не только в условиях селективного давления антибиотиков, но и в отсутствии такового. Данный факт продемонстрирован на примере мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* сиквенс типа ST39 капсульного типа K23, несущего гены трех карбапенемаз (*bla*_{NDM-1}+*bla*_{KPC-2}+*bla*_{OXA-48}), цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} и двух интегронов класса 1.

Изучены геномы четырех изолятов *K. pneumoniae* ST39^{K23}, показана высокая степень гомологии их хромосом, в которых выявлено семь структурных различий, обусловленных инсерциями IS-подобных элементов и одной инверсией в области локализации профага, что может свидетельствовать о продолжающейся микроэволюции *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23. Анализ плазмидного состава изучаемых изолятов показал, что все они содержат по три-четыре высокомолекулярные плазмиды и по две низкомолекулярные плазмиды.

На плазмидах группы несовместимости IncHI1B (~328 т.п.н.) локализованы гены БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{TEM-1}, карбапенемазы *bla*_{OXA-48} и цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15}, а также интегрон класса 1 с набором генных кассет *aadB-aadA1*. Плазмиды группы несовместимости IncC (~175 т.п.н.) в трех изолятах несли гены БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{OXA-10}, карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и двух интегронов класса 1 с наборами генных кассет *arr3-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1* и *dfrA12-orfF-aadA1*. Плазмида группы несовместимости IncC (~170 т.п.н.) в одном изоляте содержала ген цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-55}. В составе плазмид группы несовместимости IncFIB(pQil) (~102 т.п.н.) идентифицирован ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2}.

Низкомолекулярная плазмида pColRNAI (~9 т.п.н.) в геномах всех четырех изолятов являлась носителем генов, кодирующих колицин, клоацин и токсин-антитоксिनую систему RelE/ParE. Самая низкомолекулярная плазмида pUN1 (~4 т.п.н.), присутствующая во всех изолятах, была криптоической.

Поиск в базе данных NCBI продемонстрировал уникальность описанных в данном исследовании плазмид, наличие в их структуре разной степени гетерогенности по сравнению с референсными последовательностями. Данный факт указывает на постоянно идущий процесс эволюции плазмид антибиотикорезистентности в геномах грамотрицательных возбудителей госпитальных инфекций. Полученные данные представляют интерес для клинической микробиологии и эпидемиологии, поскольку должны учитываться при оценке эпидемической ситуации, прогнозе её развития и выборе оптимальных стратегий антибиотикотерапии.

Глава 5. РЕЗИСТОМЫ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ

Цель данного раздела исследования – изучение носительства генов антибиотикорезистентности, характерных для грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей нозокомиальных инфекций, у здоровых людей – сотрудников микробиологической лаборатории.

5.1. Формирование группы участников исследования

Бактериологическое обследование сотрудников микробиологической лаборатории проводили на основании одобрения Межвузовского комитета по этике ФГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России № 11-18 от 20.12.2018 г., на базе ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, с января по апрель 2019 г. Всего в исследовании приняли участие 30 здоровых сотрудников микробиологической лаборатории (таблица 5.1).

Таблица 5.1. – Анализ состава участников исследования

	Количество	Возраст	Средний возраст
Мужчины	8	28-79	41,6
Женщины	22	24-68	25,4
Всего	30	24-79	33,5

Дизайн исследования включал в себя этапы подписания информированных согласий, взятия клинического материала, выделения чистых бактериальных культур, их видовую идентификацию и хранение, определение фенотипических и генотипических характеристик, выявление в резистомах детерминант антибиотикорезистентности, секвенирование наиболее эпидемиологически значимых последовательностей генов и полных геномов и их биоинформатический анализ (рисунок 5.1). Особенностью данного исследования являлась оценка возможности носительства детерминант антибиотикорезистентности и антибиотикорезистентных бактерий у здоровых людей, поэтому высеивание клинического материала осуществляли на питательные среды с 50 мг/л ампициллина.

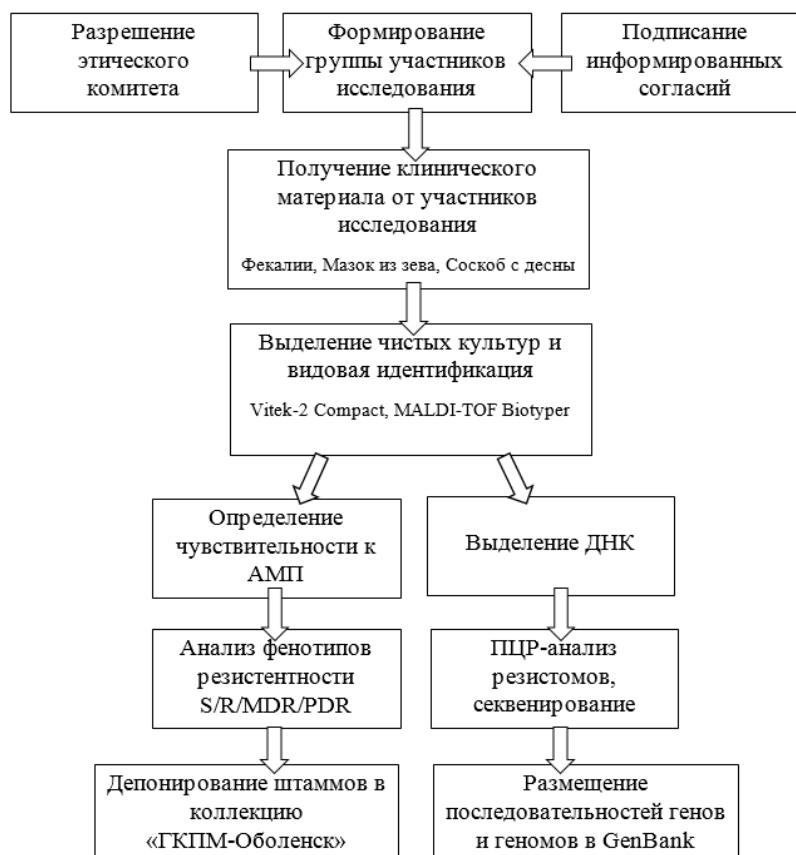
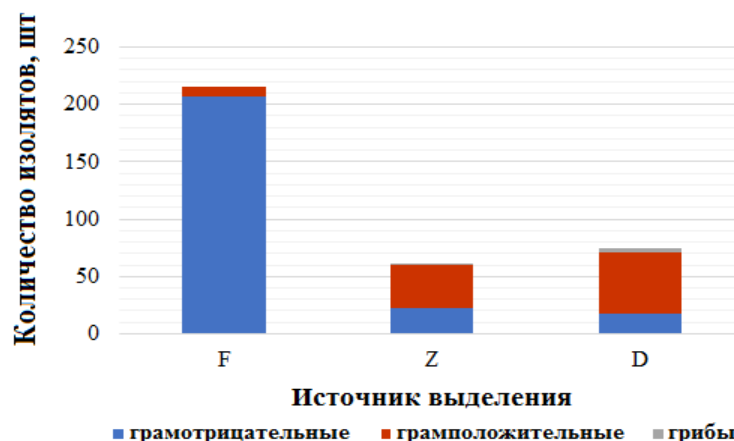


Рисунок 5.1 – Дизайн исследования носительства грамотрицательных бактерий и детерминант антибиотикорезистентности у здоровых сотрудников микробиологической лаборатории

От каждого участника исследования получено по одному мазку из зева, из десневого кармана и образцу фекалий. Всего собрано 79 клинических образцов, из которых выделены 353 клинических изолята бактерий.

5.2. Анализ видового разнообразия клинических изолятов бактерий

Из 353 клинических изолятов бактерий большая часть отнесена к грамотрицательным бактериям ($n=246$), меньшая – к грамположительным бактериям ($n=101$), а также к дрожжевым и плесневым грибам ($n=6$) (рисунок 5.2). Из фекалий выделено 216 изолятов, в том числе 207 изолятов грамотрицательных бактерий и 9 изолятов грамположительных бактерий (таблица 5.2). Из зева изолирован 61 изолят, в том числе 22 изолята грамотрицательных бактерий, 38 изолятов грамположительных бактерий и 1 изолят дрожжевого гриба (таблица 5.3). Из десневого кармана выделено 76 изолятов, в том числе 22 изолята грамотрицательных бактерий, 49 изолятов грамположительных бактерий и 5 изолятов грибов (таблица 5.4).



F – фекалии, Z – мазок из зева, D – мазок из десневого состава

Рисунок 5.2 – Представленность изолятов (n=353) исследуемой коллекции микроорганизмов, полученных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории, по источникам выделения

Таблица 5.2 – Изоляты микроорганизмов, выделенные из фекалий

№ п/п	Вид	Количество изолятов
Грамотрицательные бактерии		
1.	<i>Escherichia coli</i>	159
2.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
3.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	6
4.	<i>Citrobacter sedlakii</i>	5
5.	<i>Enterobacter cloacae</i>	4
6.	<i>Klebsiella variicola</i>	3
7.	<i>Citrobacter braakii</i>	3
8.	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
9.	<i>Escherichia hermannii</i>	1
10.	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1
11.	<i>Comamonas kerstersii</i>	1
12.	<i>Aeromonas eucrenophila</i>	1
13.	<i>Proteus mirabilis</i>	1
14.	<i>Providencia rettgeri</i>	1
15.	<i>Enterobacter kobei</i>	1
16.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Грамположительные бактерии		
1.	<i>Enterococcus faecium</i>	6
2.	<i>Micrococcus luteus</i>	2
3.	<i>Bacillus cereus</i>	1

Таблица 5.3 – Изоляты микроорганизмов, выделенные из зева

№ п/п	Вид	Количество изолятов
Грамотрицательные бактерии		
1.	<i>Neisseria subflava</i>	4
2.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	4
3.	<i>Enterobacter cloacae</i>	3

Продолжение таблицы 5.3

№ п/п	Вид	Количество изолятов
4.	<i>Acinetobacter junii</i>	2
5.	<i>Neisseria flavescens</i>	2
6.	<i>Neisseria mucosa</i>	2
7.	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
8.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1
9.	<i>Pseudomonas monteilii</i>	1
10.	<i>Pseudomonas congelans</i>	1
11.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
Грамположительные бактерии		
1.	<i>Streptococcus salivarius</i>	11
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	5
3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
4.	<i>Streptococcus vestibularis</i>	4
5.	<i>Bacillus thuringiensis</i>	3
6.	<i>Staphylococcus warneri</i>	2
7.	<i>Rothia mucilaginosa</i>	2
8.	<i>Rothia dentacariosa</i>	2
9.	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	2
10.	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	1
11.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1
Грибы		
1.	<i>Candida kefyr</i>	1

Таблица 5.4 – Изоляты микроорганизмов, выделенные из десневого кармана

№ п/п	Вид	Количество изолятов
Грамотрицательные бактерии		
1.	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	5
2.	<i>Fusobacterium</i> spp.	4
3.	<i>Klebsiella</i> spp.	4
4.	<i>Enterobacter</i> spp.	3
5.	<i>Neisseriae</i> spp.	3
6.	<i>Haemophilus</i> spp.	2
7.	<i>Veillonella</i> spp.	1
Грамположительные бактерии		
1.	<i>Streptococcus sanguinis</i>	20
2.	<i>Prevotella intermedia</i>	7
3.	<i>Staphylococcus aureus</i>	7
4.	<i>Enterococcus faecium</i>	5
5.	<i>Corynebacterium</i> spp.	5
6.	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	3
7.	<i>Actinomyces</i> spp.	2
Грибы		
1.	<i>Candida</i> spp.	4
2.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	1

В ходе исследования из фекалий выделено 16 видов грамотрицательных бактерий, среди которых наиболее представленными были *E. coli* и *K. pneumoniae*, и 3 вида грамположительных бактерий. Из зева было выделено 11 видов грамотрицательных бактерий, 11 видов грамположительных, среди которых наиболее представленным был *Streptococcus salivarius*, а также 1 вид грибов рода *Candida*. Из десневого кармана было выделено 7 видов грамотрицательных бактерий, 7 видов грамположительных, среди которых наиболее представленным был *Streptococcus sanguinis*, а также 2 вида грибов.

Таким образом, наибольшее количество представленных изолятов были выделены из фекалий, при этом 96 % из них относились к ГОБ. Менее представлены в исследовании грамположительные бактерии: их наибольшая доля была выявлена в мазках из десневого кармана (54/76) и зева (38/61). Наименьшей представленностью характеризовались культуры грибов, которые составляли 5/76 изолятов из десневого кармана и 1/61 изолятов – из зева.

5.2.1 Характеристика штаммов грамотрицательных бактерий

Из всей полученной коллекции бактериальных изолятов, согласно критериям исключения (выделение от разных участников исследования, из разных клинических образцов и наличие различающихся наборов генетических детерминант) были отобраны для дальнейшего исследования 107 изолятов грамотрицательных бактерий, в том числе относящиеся к порядку *Enterobacterales* (n=100) и НГОБ (n=7). Изоляты были выделены из фекалий (n=84), мазков из зева (n=16) и мазков из десневого кармана (n=7). Преобладающими видами среди них были *Escherichia* spp. (n=48) и *Klebsiella* spp. (n=29), которые в целом составили 72 % коллекции. В меньшей степени были представлены *Enterobacter* spp. – 8 %, *Citrobacter* spp. – 4 %, *Pseudomonas* spp. – 3 % и *Acinetobacter junii* – 2 %. Ещё реже встречались виды *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *R. ornithinolytica* и *S. maltophilia* – по 1% (рисунок 5.3). Важно отметить, что изоляты *Klebsiella* spp. были выделены от 11 из 30 участников эксперимента, *Escherichia* spp. – от 27 из 30, а изоляты других ГОБ – от 14 из 30 участников.

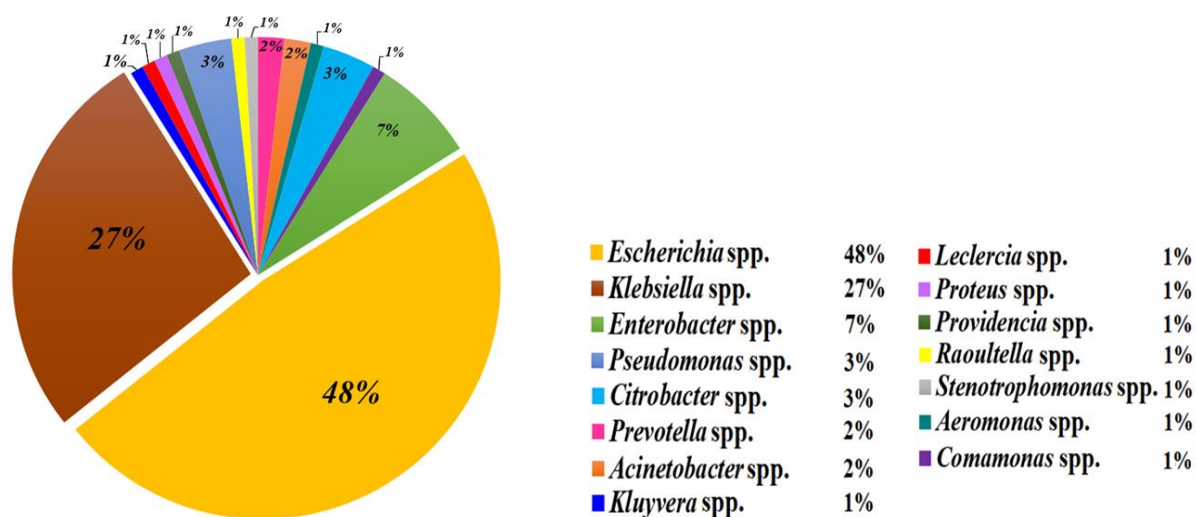


Рисунок 5.3 – Представленность видов грамотрицательных бактерий в изучаемой коллекции штаммов (n=107)

5.3. Фенотипы и генотипы изолятов грамотрицательных бактерий

Анализ чувствительности к антимикробным препаратам показал преобладание изолятов, устойчивых к бета-лактамам (79 % изолятов), в том числе к пенициллинам (72 % изолятов), цефалоспорином (17 %) и карбапенемам (11 %); к фторхинолонам (24 %), сульфаниламидам (13 %), к аминогликозидам (11 %), к тетрациклинам (12 % изолятов) и к фосфомицину (9 %).

Среди изолятов *Klebsiella* spp. устойчивость к ампициллину (AMP) составила 100 %, к амоксициллину/клавулановой кислоте (AMC) – 14 %, к цефотаксиму (CTX) – 10 %, к цефтазидиму (CAZ) – 17 %, к имипенему (IPM) – 14 %, к меропенему (MEM) – 7 %; к гентамицину (GEN) – 10 %, к ципрофлоксацину (CIP) – 21 %, к фосфомицину (PHO) – 28 %, к тетрациклину (TET) – 41 % и к триметоприму-сульфометаксозолу (SXT) – 7 %. Среди *Klebsiella* spp. 27 % изолятов обладали множественной лекарственной устойчивостью. Среди изолятов *Escherichia* spp. устойчивость к AMP составила 60 %, к AMC – 31 %, к CAZ – 17 %, к MEM – 10 %; к GEN – 13 %, к CIP – 35 %, и к SXT – 23 %. Среди *Escherichia* spp. 21 % изолятов обладали множественной лекарственной устойчивостью. Среди других видов ГОБ устойчивость к AMP составила 43 %, к AMC – 9 %, к CTX – 4 %, к CAZ – 9 %, к MEM – 13 %; к GEN – 13 %, к CIP – 13 %, к TET – 4 %, к PHO – 4 % и к SXT – 4 %. Среди этой группы ГОБ два изолята (9 %) обладали МЛУ-фенотипами, а именно *Kluyvera cryocrescens* и *Proteus mirabilis* (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Характеристика изолятов *Klebsiella* spp., выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории в 2019 г.

Вид	Изолят	Дата	Устойчивость к АП	Резистом
<i>K. pneumoniae</i>	F8-10RKp/19	31.01.2019	AMP, CIP, SXT	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>), <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F8-12RKp/19	31.01.2019	AMP, AMC, CIP	<i>bla</i> _{SHV}
	F12-5Kp/19	13.02.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F17-2Kp/19	29.03.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV}
	F18R-1Kp/19 [#]	11.04.2019	AMP, IPM, PHO	<i>bla</i> _{SHV}
	F19-1Kp/19	12.04.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F19-1RKp/19	12.04.2019	AMP, IPM, PHO	<i>bla</i> _{SHV}
	F19R-5Kp/19	12.04.2019	AMP, TET, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F19-6RKp/19	12.04.2019	AMP, GEN, CIP, SXT	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	Z19Kp/19	12.04.2019	AMP, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV}
	Z19RKp/19 [#]	12.04.2019	AMP, PHO	<i>bla</i> _{SHV}
	F21-1Kp/19*	29.03.2019	AMP, CAZ, GEN, TET	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F27-2Kp/19	12.04.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV}
	F27-3Kp/19**	12.04.2019	AMP, AMC, CTX, IPM, MEM, CIP, PHO	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM}
	Z27Kp/19 [#]	12.04.2019	AMP, AMC, CTX, IPM, MEM, CIP, PHO	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{NDM}
	F28-3Kp/19	11.04.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}
	Z29/19		AMP	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}
	F33R-3Kp/19	29.03.2019	AMP, AMC, CTX, CAZ, PHO	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}
	F33R-5Kp/19	29.03.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F33-3Kp/19	29.03.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{SHV} , <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
<i>K. oxytoca</i>	F2-3Ko/19		AMP, GEN, TET	-
	F12-4Ko/19 [#]	13.02.2019	AMP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	Z12Ko/19 [#]	13.02.2019	AMP	<i>bla</i> _{CTX-M}
	F18R-1Ko/19		AMP, PHO	-
	Z18Ko/19 [#]		AMP, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M}
	F28-1Ko/19	11.04.2019	AMP, PHO	-
	F28-4Ko/19 [#]		AMP	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>K. variicola</i>	F12-3Kv/19**	13.02.2019	AMP, TET, CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{NDM}
	F13-1Kv/19 [#]	16.04.2019	AMP, TET	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>E. coli</i>	F1-1REc/19		AMP, AMC, SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F2-2Ec/19		AMP, CAZ, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F3-1REc/19		AMP, AMC, CIP	<i>bla</i> _{TEM}
	F4-1Ec/19		CIP	-

Продолжение таблицы 5.5

<i>E. coli</i>	F5-1Ec/19		AMP, CAZ, GEN, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F5-5Ec/19		AMP, CAZ, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F5-6REc/19		(2) AMP, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F6-1REc/19		(1) AMP, AMC	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM}
	F6-2REc/19		(1) AMP	<i>bla</i> _{TEM}
	F7-1Ec/19		(1) AMP, AMC	<i>bla</i> _{TEM}
	F8-4Ec/19		(3) AMP, CAZ, GEN, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F8-7REc/19		(3) AMP, AMC, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F8-8REc/19		(2) AMP, CAZ, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F9-1Ec/19		-	<i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F9-7Ec/19		(2) AMP, AMC, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int1</i> (<i>dfrA21</i>), <i>Int1</i> (<i>dfrA7</i>)
	F9-13REc/19		(4) AMP, AMC, GEN, CIP, SXT	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int1</i> (<i>dfrA7</i>)
	F10R-1Ec/19		(3) AMP, AMC, CIP, SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F12-2Ec/19	13.02.2019	(2) AMP, MEM	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F12-5Ec/19	13.02.2019	(2) AMP, MEM	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F12-6Ec/19	13.02.2019	(1) AMP, CAZ, MEM	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F13-2Ec/19		-	<i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F14R-1Ec/19		(1) AMP, AMC	-
	F14R-2Ec/19		(1) AMP, CAZ	<i>bla</i> _{TEM}
	F15R-1Ec/19		(2) AMP, AMC, SXT	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F15-1Ec/19		-	-
	F16-6Ec/19		(2) AMP, CIP	-
	F17R-1Ec/19		-	-
	F17-5Ec/19		-	-
	F19-1Ec/19		(1) AMP	<i>bla</i> _{TEM}
	F19R-2Ec/19		(2) AMP, AMC, SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F20-2Ec/19		(1) AMP	<i>Int1</i> (<i>aadA1-dfrA1-orfC</i>)
	F22-1Ec/19		(1) AMC	-
	F23R-1Ec/19		(1) AMP, AMC	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F23R-2Ec/19		(2) AMP, GEN	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F23R-3Ec/19		(3) AMP, SXT, SXT	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F24-3Ec/19*		(1) AMP, MEM	<i>bla</i> _{NDM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F25-3Ec/19		(2) AMP, SXT	<i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
	F25R-1Ec/19		(3) AMP, AMC, CIP, SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F25R-2Ec/19		(2) AMP, MEM, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{NDM}
	F25R-3Ec/19*		(2) AMP, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)

Продолжение таблицы 5.5

<i>E. coli</i>	F25R-4Ec/19		(3) AMP, CIP, SXT	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F26R-1Ec/19		(1) AMP	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F26R-2Ec/19		(1) AMP, CIP	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F27-1Ec/19	12.04.2019	(1) CAZ	<i>bla</i> _{CTX-M}
	F27-3Ec/19	12.04.2019	-	-
	F28-2Ec/19	11.04.2019	(1) AMP	-
	F33R-1Ec/19	29.03.2019	(3) AMP, AMC, NIT, SXT	-
<i>E. hermannii</i>	F2-5Eh/19		AMP	-
<i>Pseudomonas monteilii</i>	Z12Pm/19 [#]	13.02.2019	MEM	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F19-4Pa/19 [#]	12.04.2019	MEM	<i>bla</i> _{CTX-M}
	Z19Pa/19	12.04.2019	-	-
<i>Acinetobacter junii</i>	Z4/19	24.04.2019	-	-
	Z12/19	13.02.2019	-	-
<i>Providencia rettgeri</i>	F12-8Pr/19	13.02.2019	SXT	<i>int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
<i>Citrobacter sedlakii</i>	F20R-1Cs/19	29.03.2019	AMC	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F20-4Cs/19	29.03.2019	AMP	-
<i>Citrobacter braakii</i>	F24-1Cb/19 [#]	19.04.2019	AMP	-
	F29-3Cb/19	24.04.2019	AMP	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
<i>Comamonas kerstersii</i>	F9-3Ck/19	31.01.2019	AMP, CAZ, GEN	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	F2-1Kc/19	15.01.2019	MEM, GEN, CIP, TET	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	F2-6Ro/19	15.01.2019	AMP	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Z12/19	13.02.2019	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	F11-1P/19	13.02.2019	AMP, AMC, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>Int2</i> (<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>)
<i>Enterobacter kobei</i>	F13-4Ek/19	16.04.2019	AMP	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
<i>Enterobacter cloacae</i>	F2-4Ecl/19	15.01.2019	AMP, CIP	<i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	F8-2Ecl/19	31.01.2019	-	<i>bla</i> _{TEM} , <i>Int1</i> (<i>dfrA17-aadA5</i>)
	Z12/19	13.02.2019	(1) CTX	<i>bla</i> _{CTX-M}
	Z15/19	27.03.2019	(1) AMP	<i>bla</i> _{CTX-M}
	F18-1/19	11.04.2019	AMP, CAZ	-
	F18-3/19	11.04.2019	-	-
	F33R-4Ec/19	29.03.2019	PHO	-

Примечание: AMP - ампициллин; AMC - амоксициллин/клавулановая кислота; CTX - цефотаксим; CAZ - цефтазидим; IPM - имипенем; MEM – меропенем; GEN - гентамицин; CIP – ципрофлоксацин; PHO – фосфомицина; TET – тетрациклин; SXT- триметоприм-сульфометаксозол; NIT – нитрофурантоин; * - ген *bla*_{NDM} размещен в базе данных GenBank; [#] - полный геном размещен в базе данных GenBank (Приложение В)

В целом, 18 % изучаемых изолятов ГОБ были чувствительны ко всем использованным антимикробным препаратам; 36 % из них были устойчивы к препаратам одного функционального класса; 33 % - двух функциональных классов. Фенотип МЛУ, устойчивость к препаратам трех и четырех функциональных классов, был выявлен у 20 % (18+2 %) изолятов (рисунок 5.4).

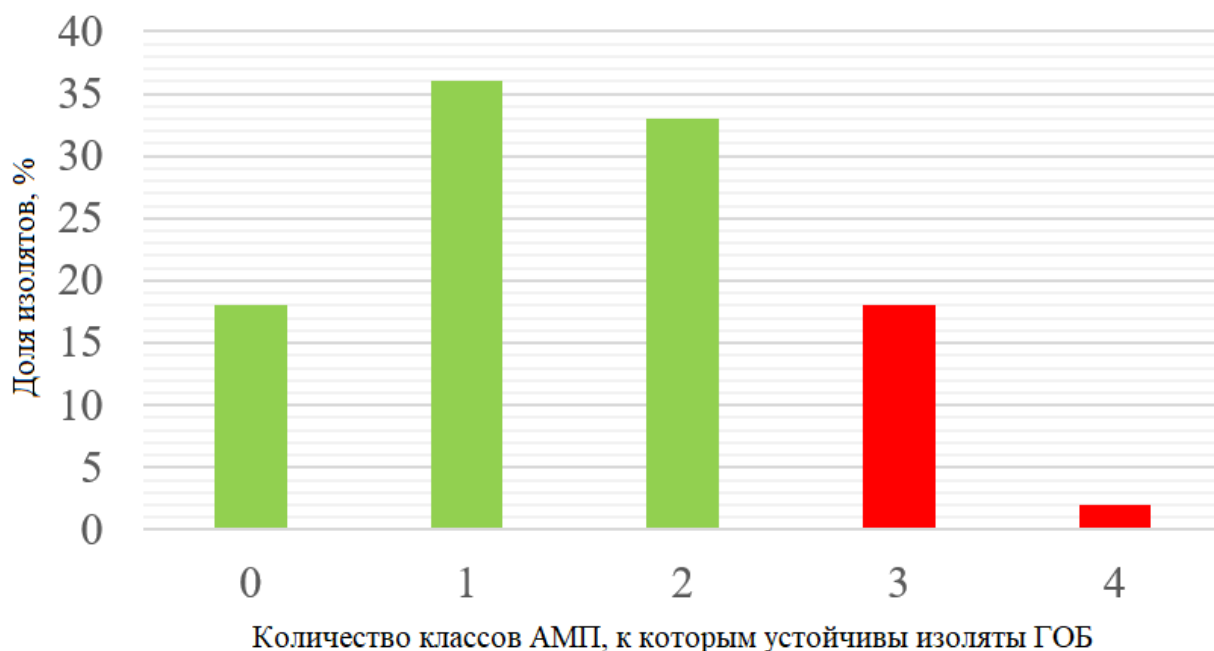


Рисунок 5.4 – Доля изолятов ГОБ, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории в 2019 г., устойчивых к 1-4 антимикробным функциональным классам: бета-лактамам, тетрациклинам, хинолонам, фениколам, фосфомицинам, аминогликозидам и сульфаниламидам

Коллекция изолятов ГОБ, выделенных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории, была охарактеризована по наличию у них генов бета-лактамаз *bla*_{CTX-M}-, *bla*_{TEM}-, *bla*_{SHV}-, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}- и *bla*_{NDM}-типов, и интегронов классов 1 и 2. Гены бета-лактамаз: *bla*_{TEM} были выявлены у 21 % изолятов, *bla*_{SHV} – у 18 % изолятов, *bla*_{CTX-M} – у 29 % изолятов, *bla*_{NDM} – у 8 % изолятов, интегроны класса 1 – у 36 %, интегроны класса 2 – у 7 %, одновременно интегроны классов 1 и 2 – у 1 % изолятов, гены *bla*_{VIM} и *bla*_{OXA-48}– обнаружены не были.

В изолятах *K. pneumoniae* наиболее представленными были гены *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M}; достаточно представленными – гены *bla*_{NDM} и интегроны класса 1, у этих бактерий один изолят нес одновременно два интегрона – классов 1 и 2. В изолятах *E. coli* наиболее представленными генетическими детерминантами были гены *bla*_{TEM}

и интегроны класса 1, а также достаточно представленными – гены *bla*_{CTX-M}, *bla*_{NDM} и интегроны класса 2. Другие виды ГОБ имели гены *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} и интегроны классов 1 и 2 (рисунок 5.5).

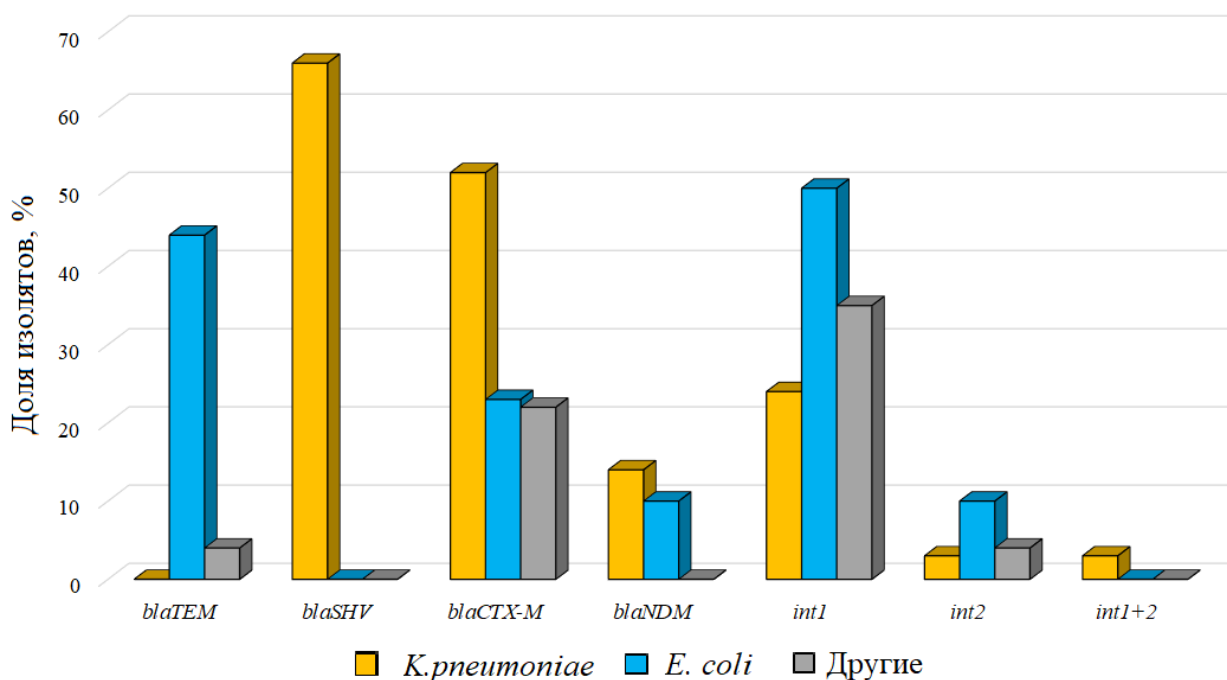


Рисунок 5.5 – Представленность генов бета-лактамаз и интегров в резистомах изолятов *K. pneumoniae*, *E. coli* и других грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых сотрудников микробиологической лаборатории

Гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M} были идентифицированы в клинических образцах 19 участников эксперимента, гены *bla*_{TEM} – 11 участников, *bla*_{SHV} – 10 участников, *bla*_{NDM} – 5 участников, интегроны класса 1 – 18 участников, интегроны класса 2 – 2 участников, одновременно интегроны классов 1 и 2 – одного участника.

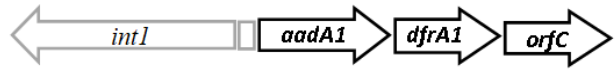
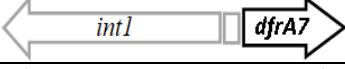
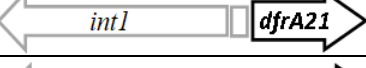
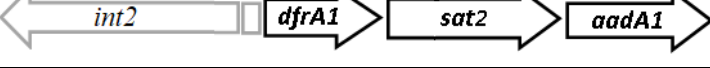
Обращает на себя внимание тот факт, что наибольшее количество интегров было идентифицировано в изолятах ГОБ из группы ESKAPE-патогенов: у 52 % изолятов *E. coli* и 28 % *K. pneumoniae*.

Изоляты, несущие интегроны класса 1 принадлежали к семи видам ГОБ: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Comamonas kerstersii*, *Kluyvera cryocrescens*, *Enterobacter kobei* и *Enterobacter cloacae*; изоляты, несущие интегроны класса 2 - к четырем видам ГОБ: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* и *Providencia rettgeri* (таблица 5.3).

5.4. Структура интегров классов 1 и 2, идентифицированных в геномах ГОБ, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории

В ходе исследования идентифицированы 4 набора генных кассет в интегронах класса 1 и один набор генных кассет – в интегронах класса 2. Самым распространенным набором генных кассет был *dfrA17-aadA5* в интегронах класса 1, выявленный у 15 участников исследования. Кроме того, были достаточно распространены набор генных кассет интегровов класса 1 *aadA1-dfrA1-orfC* (у 6 людей) и интегровов класса 2 *dfrA1-sat2-aadA* (у 7 людей). Редко встречаемыми наборами генных кассет интегровов класса 1 были *dfrA7* и *dfrA21*, идентифицированные у одного участника исследования (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Представленность наборов генных кассет в изолятах ГОБ, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории

Структура интегрона	Количество изолятов	Количество людей
	9	6
	28	15
	1	1
	1	1
	9	7

5.5. Носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1 у сотрудников микробиологической лаборатории

Из клинических образцов (фекалий и мазков из зева) от трех участников эксперимента были выделены три изолята *K. pneumoniae* капсульного типа K1, сиквенс-типа ST23, имеющих гипермукоидный фенотип, что характерно для гипервирулентных *K. pneumoniae* (hvKp). Изоляты были чувствительны к цефалоспорином, карбапенемам, аминогликозидам, ципрофлоксацину и сульфаниламидам и устойчивы к ампициллину (МПК >32 мг/л) и фосфомицину (МПК >256 мг/л). Данные фенотипы резистентности были ассоциированы с наличием генетических детерминант: хромосомного гена бета-лактамазы *bla_{SHV-190}* и генов эффлюксных насосов *fosA3*, *oqxA1* и *oqxB1*.

Полногеномное секвенирование данных изолятов выявило наличие в геномах этих штаммов генетических детерминант характерных для гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*: гена *rmpA*, ассоциированного с гипермукоидностью, оперона *iro*, детерминирующего рецептор синтеза сидерофора сальмохелина, гена *kfu*, кодирующего транспортер поглощения железа, и генов оперона *all*, обеспечивающего способность метаболизировать аллантин. Размеры полных геномов варьировали от 5,55 до 5,56 Mb, GC-состав – от 57,24 до 57,25 %, количество контигов – от 72 до 83, количество генов – от 5355 до 5370. Каждый изолят имел две плазмиды, отнесенные к группам несовместимости IncHI1B и IncFIB, системы рестрикции-модификации II и III типов и CRISPR-Cas системы типа IE (таблица 5.7).

Сравнение последовательностей геномов изучаемых изолятов *K. pneumoniae* ST23^{K1} с опубликованными ранее последовательностями штаммов *K. pneumoniae* данного сиквенс-типа и капсульного типа, выделенных в Индии в 2016 г. и в США в 2019 г., показало их высокую степень гомологии (рисунок 5.6).

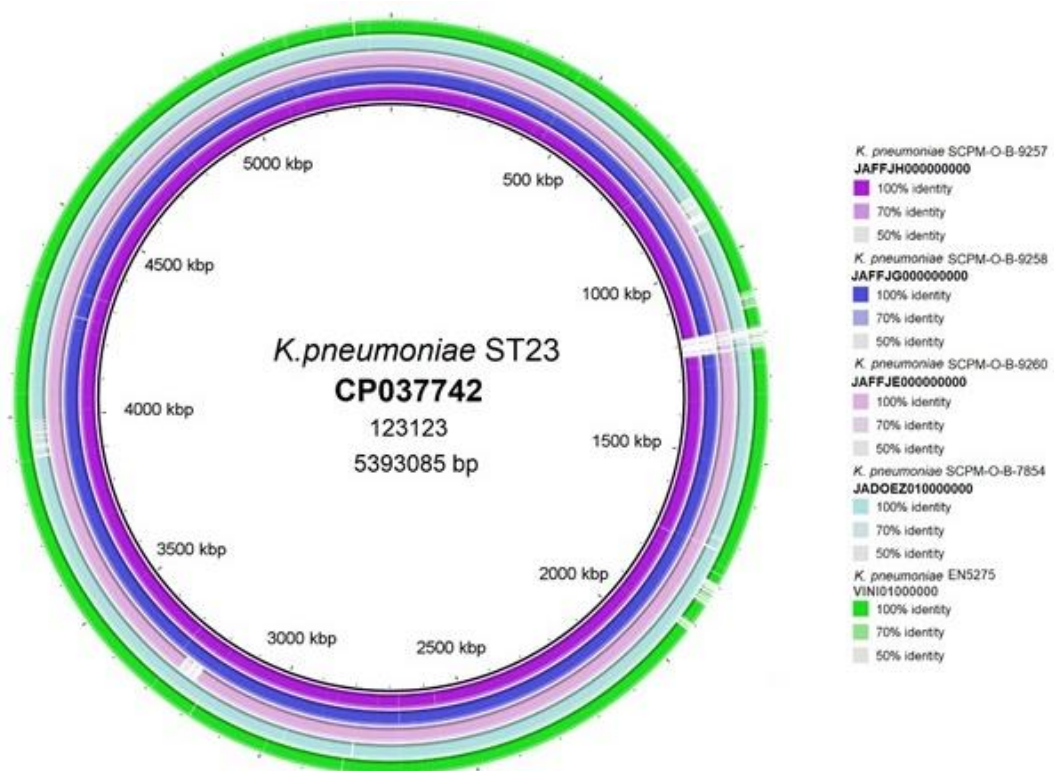


Рисунок 5.6 – BRIG-сравнение геномов штаммов *K. pneumoniae* SCPM-O-B-9257, SCPM-O-B-9258 и SCPM-O-B-9260 с референс-последовательностью CP037742.1 (США, 2019) и последовательностями штаммов сиквенс-типа ST23 и капсульного типа K1 из базы данных GenBank: JAD0EZ010000000.1 (Россия, 2014) и VINI01000000.1 (Индия, 2016)

Таблица 5.7 – Характеристики полногеномных последовательностей штаммов *K. pneumoniae* и основная статистика по сборкам и аннотациям

	Штаммы <i>K. pneumoniae</i>		
	F18R-1Kp/19	F19R-1RKp/19	Z27-Kp/19
Сиквенс-тип	ST23	ST23	ST23
Капсульный тип	K1	K1	K1
Источник выделения	фекалии	фекалии	зев
SCPM ID ^a	SCPM-O-B-9257	SCPM-O-B-9258	SCPM-O-B-9260
BioSample ID	SAMN17807608	SAMN17807609	SAMN17807611
SRR ID	SRR13638374	SRR13638373	SRR13638371
GenBank	JAFFJH000000000	JAFFJG000000000	JAFFJE000000000
Характеристики полногеномных последовательностей			
GC-состав, %	57.25	57.24	57.25
Размер генома, п.н.	5560322	5560734	5552064
Количество прочтений	1054272	1380544	1387698
Значение N50	273411	208822	203441
Количество контигов	74	72	83
Количество генов	5355	5361	5370
Генетические детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам			
Устойчивость к бета-лактамам	<i>bla_{SHV}-190</i>	<i>bla_{SHV}-190</i>	<i>bla_{SHV}-190</i>
Устойчивость к фосфомицину	<i>fosA3</i>	<i>fosA3</i>	<i>fosA3</i>
Гены эффлюксных насосов	<i>oqxA1, oqxB1</i>	<i>oqxA1, oqxB1</i>	<i>oqxA1, oqxB1</i>
Генетические детерминанты вирулентности (локусы)			
Адгезин типа 3	<i>mrkABCDHFHJ</i>	<i>mrkABCDHFHJ</i>	<i>mrkABCDHJ</i>
Рецептор / синтез сидерофора сальмохелина	<i>iroBCDN</i>	<i>iroBCDN</i>	<i>iroBCDN</i>
Регулятор мукоидного фенотипа	<i>rmpA2</i>	<i>rmpA2</i>	-
Транспортер поглощения железа	<i>kfuABC</i>	<i>kfuABC</i>	<i>kfuABC</i>
Аллантоиновый регулон	<i>allABCDRS</i>	<i>allABCDRS</i>	<i>allABCDRS</i>
Карбамат-киназа	<i>arcC</i>	<i>arcC</i>	<i>arcC</i>
Колибаكتиновый регулон	<i>clbABCDEFGHIJKLMNOPQR</i>	<i>clbABCDEFGHIJKLMNOPQR</i>	<i>clbABCDEFGHIJKLMNOPQR</i>
Мембранный белок FdrA	<i>fdrA</i>	<i>fdrA</i>	<i>fdrA</i>
Рецептор сидерофора иерсиниабактина	<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i>	<i>fyuA</i>
Фермент глицератного пути	<i>gcl</i>	<i>gcl</i>	<i>gcl</i>
Глицерат киназа Glx	<i>glxKR</i>	<i>glxKR</i>	<i>glxKR</i>
Гидроксипируват изомераза	<i>hyi</i>	<i>hyi</i>	<i>hyi</i>
Биосинтез иерсиниабактина	<i>irp1,2</i>	<i>irp1,2</i>	<i>irp1,2</i>
Синтез сидерофора аэробактина	<i>iucABCD</i>	<i>iucABCD</i>	<i>iucABCD</i>
Микроцин	<i>mceABCDEFGHIJ</i>	<i>mceABCDEFGHIJ</i>	<i>mceABCDEFGHIJ</i>
Аллантоин пермеаза	<i>ybbWY</i>	<i>ybbWY</i>	<i>ybbW</i>
Система иерсиниабактина Ybt	<i>ybtAEPQSTUX</i>	<i>ybtAEPQSTUX</i>	<i>ybtAEPQSTUX</i>
Предполагаемый цитоплазматический белок	<i>ylbEF</i>	<i>ylbEF</i>	<i>ylbEF</i>
Транспорт поглощения железа	<i>iutA</i>	<i>iutA</i>	-
Плазмиды, системы рестрикции-модификации и системы CRISPR-Cas			
Плаزمида	IncHI1B, IncFIB	IncHI1B, IncFIB	IncHI1B, IncFIB
Ферменты рестрикции I типа	-	-	-
Ферменты рестрикции II типа	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm	M.Kpn34618Dcm
Ферменты рестрикции типа III	M.Sen16III	M.Sen16III	M.Sen16III
CRISPR-Cas система	CAS-TypeIE	CAS-TypeIE	CAS-TypeIE

^aSCPM, Государственная коллекция патогенных микроорганизмов «Оболонск»; ID, идентификатор.

Таким образом, впервые задокументировано носительство hvKp ST23^{K1} у здоровых людей в России. Полученные данные показывают важность мониторинга hvKp, поскольку колонизация людей штаммами *K. pneumoniae* капсульного типа K1 сиквенс-типа 23 (ST23) была зарегистрирована в Южной Корее и США и была связана с абсцессами печени [57, 102, 113]. В Европе была описана колонизация здоровых людей штаммами *K. pneumoniae* разных генетических линий и была ассоциирована с высоким уровнем заболевания тяжелыми инфекциями [123].

5.6. Заключение по главе 5

Изучено носительство генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей инфекций у человека, у сотрудников микробиологической лаборатории. От 30 человек выделено 107 изолятов ГОВ, основными видами среди которых были *E. coli* (48 %) и *K. pneumoniae* (27 %), в том числе гипервирулентные *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1. Доля мультирезистентных бактерий составила 20 %. В геномах изолятов выявлены гены бета-лактамаз, в том числе эпидемически значимых цефалоспориназы CTX-M-15 и карбапенемазы NDM-1. Гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M} были идентифицированы в клинических образцах 19 чел., гены *bla*_{TEM} – 11 чел., *bla*_{SHV} – 10 чел., *bla*_{NDM} – 5 чел., интегроны класса 1 – у 18 чел., интегроны класса 2 – у 2 чел., одновременно интегроны классов 1 и 2 – у 1 чел. Это подтверждает тенденцию, отмеченную исследователями во всем мире, о том, что множественная лекарственная устойчивость, присущая ранее только патогенам, циркулирующим в госпитальной среде и ассоциированным с оказанием медицинской помощи, уже вышла за пределы лечебных учреждений. Показано, что некоторые из исследованных нами штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых людей, относятся к мультирезистентным микроорганизмам. Молекулярным механизмом этого феномена является наличие у них генов бета-лактамаз, а также аккумуляция генетических детерминант антибиотикорезистентности в составе интегронов классов 1 и 2. Представленность генных кассет интегронов классов 1 и 2 преимущественно коррелировала с типами генных кассет, распространенными в госпитальной среде клиник г. Москвы, детектированных в штаммах от пациентов, которые были изучены нами ранее. Но

детектировались и генные кассеты, не встречаемые ранее у изолятов, выделенных из госпитальной среды и от пациентов клиник г. Москвы, что может показывать растущий потенциал распространения генов устойчивости, свойственных возбудителям внутрибольничных инфекций, во внегоспитальной среде.

Полученные данные вносят вклад в понимание роли интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций; вклада носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов и здоровых людей.

Полученные данные по выявленным характеристикам генетических линий показывают необходимость постоянного мониторинга грамотрицательных бактерий с повышенной вирулентностью, в том числе гипервирулентных *K. pneumoniae* и указывают на важность клинической осведомленности об этом патотипе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования оценена распространенность и разнообразие интегронов классов 1 и 2 в геномах мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от людей в Российской Федерации в 2003-2019 гг. Показано, что клинические штаммы, выделенные в лечебных учреждениях г. Москвы в период с 2013 по 2015 гг., получены от пациентов с инфекциями разной степени тяжести: от очень серьезных инфекций дыхательной и нервной систем до бессимптомного носительства в трахее, мочевыводящих путях и кишечнике. В штаммах с множественной лекарственной устойчивостью были идентифицированы 842 интегона и охарактеризованы их структуры. Показано, что интегоны классов 1 присутствовали в геномах 31 % изолятов, а интегоны класса 2 – в геномах 13 % грамотрицательных бактерий, выделенных от пациентов и из госпитальной среды в 2003-2015 гг.

В ходе исследования выявлено 22 варианта наборов генных кассет в интегонах 1 класса и 4 варианта – в интегонах 2 класса. К числу наиболее распространенных отнесены наборы генных кассет: *dfrA17-aadA5*; *dfrA12-orfF-aadA2*; *aadA1*; *aacC1-orfX-orfY-aadA1*; *dfrA1-orfC*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA6-orfD*; *aadB-aadA1y* и *dfrA1-aadA1* интегронов класса 1 и один набор генных кассет *dfrA1-sat2-aadA1* интегронов класса 2. В базе данных GenBank наиболее представленными были интегоны классов 1: *aadB*; *aadB-aadA1y*; *blaOXA30-aadA1*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadA2*; *estX* и *dfrA17-aadA5*, и интегоны класса 2 *dfrA1-sat2*. Пять наборов генных кассет отнесены к наиболее представленным как в нашей коллекции, так и в базе данных GenBank: *dfrA17-aadA5*; *aadA1*; *aacA4*; *aacA4-cmlA1j*; *aadB-aadA1y*.

Нами идентифицированы 31 генная кассета, наиболее распространенными среди которых были *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *orfF*, *sat1*, *aacA4* и *orfC*. Девять генных кассет, отнесенных к наиболее распространенным в нашей коллекции, также были широко представлены в базе данных GenBank: *aadA1*, *dfrA7*, *aadA5*, *dfrA1*, *aadA2*, *dfrA12*, *sat1*, *aacA4* и *orfC*.

В данной работе описаны новые интегоны: четыре новых интегона класса 1: In1249, In1379, In1360 и In1375 в госпитальных штаммах *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. А также интегон класса 2 In2-IS911 в госпитальном

штамме *Shigella flexneri*. Описанные новые модификации генных кассет *dfrA12s* и *dfrA1-IS911*, генная кассета *aadA6* с ISPa21e элементом, генная кассета *gsu87*, генная кассета *aphA15d* и генная кассета *bla_{PBL-1}*, кодирующая не описанную ранее бета-лактамазу класса А, могут служить полезными молекулярно-генетическими маркерами для отслеживания распространенности кассет, эволюции наборов генных кассет и при эпидемиологическом анализе.

Разработан лабораторный образец ПЦР тест-системы в реальном времени: мультиплексная тест-система для детекции генов интегронов классов 1 и 2 (интеграз классов 1 и 2, аминогликозид-модифицирующих ферментов *aacA4*, *aadA1*, *aadA5*, дигидрофолат-редуктаз *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12* и стрептотрицинацетилтрансферазы *sat2*), которая позволяет изучать механизмы формирования фенотипов множественной антибиотикорезистентности.

Показано, что клинические изоляты грамотрицательных представителей группы ESKAPE *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa* несли в своих геномах подавляющее большинство генов антибиотикорезистентности, идентифицированных в данном исследовании, в том числе, 72 % интегронов классов 1 и 2 и все гены карбапенемаз *bla_{NDM-1}*, *bla_{OXA-48}* и *bla_{KPC-2}*. Носительство генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных патогенов было выявлено у 78 % пациентов. Стоит подчеркнуть, что высокий уровень присутствия интегронов в геномах грамотрицательных бактерий возбудителей нозокомиальных инфекций представляет большую угрозу для здравоохранения, поскольку связан с формированием фенотипов множественной лекарственной устойчивости у патогенов.

Показано, что значительная часть интегронов локализуется на конъюгативных плазмидах, несущих другие детерминанты антибиотикорезистентности, в том числе гены карбапенемаз разных классов: класса А (*bla_{KPC-2}*), класса В (*bla_{VIM-2}* и *bla_{NDM-1}*) и класса D (*bla_{OXA-48}*). Показано, что такие плазмиды могут стабильно наследоваться в клетках *K. pneumoniae* и других патогенов не только в условиях селективного давления антибиотиков, но и в отсутствии такового. Данный факт продемонстрирован на примере мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* сиквенс типа ST39 капсульного типа K23, несущего гены трех карбапенемаз (*bla_{NDM-1}*+*bla_{KPC-2}*+*bla_{OXA-48}*),

цефалоспориназы *bla*_{CTX-M-15} и двух интегронов класса 1. Изучены геномы четырех изолятов *K. pneumoniae* ST39^{K23}, показана высокая степень гомологии их хромосом, в которых выявлено семь структурных различий, обусловленных инсерциями IS-подобных элементов и одной инверсией в области локализации профага, что может свидетельствовать о продолжающейся микроэволюции *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23. Описаны три варианта наборов плазмид в четырех изолятах *K. pneumoniae* ST39^{K23}. На плазмидах группы несовместимости IncHI1B (~328 т.п.н.) локализованы гены БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{TEM-1}, карбапенемазы *bla*_{OXA-48} и цефалоспориназы *bla*_{CTX-M-15}, а также интегрон класса 1 с набором генных кассет *aadB-aadA1*. Плазмиды группы несовместимости IncC (~175 т.п.н.) в трех изолятах несли гены БЛРС *bla*_{OXA-1} и *bla*_{OXA-10}, карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и двух интегронов класса 1 с наборами генных кассет *arr3-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1* и *dfrA12-orfF-aadA1*. Плазмида группы несовместимости IncC (~170 т.п.н.) в одном изоляте содержала ген цефалоспориназы *bla*_{CTX-M-55}. В составе плазмид группы несовместимости IncFIB(pQil) (~102 т.п.н.) идентифицирован ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2}. Низкомолекулярная плазмида pColRNAI (~9 т.п.н.) в геномах всех четырех изолятов являлась носителем генов, кодирующих колицин, клоацин и токсин-антитоксиновую систему RelE/ParE. Самая низкомолекулярная плазмида pUN1 (~4 т.п.н.), присутствующая во всех изолятах, была криптической.

Изучено носительство генов антибиотикорезистентности и грамтрицательных бактерий, потенциальных возбудителей инфекций у человека, у сотрудников микробиологической лаборатории. От 30 человек выделено 107 изолятов ГОБ, основными видами среди которых были *E. coli* (48 %) и *K. pneumoniae* (27 %), в том числе гипервирулентные *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1. Доля мультирезистентных бактерий составила 20 %. В геномах изолятов выявлены гены бета-лактамаз, в том числе эпидемически значимых цефалоспориназы CTX-M-15 и карбапенемазы NDM-1. Гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M} были идентифицированы в клинических образцах 19 чел., гены *bla*_{TEM} – 11 чел., *bla*_{SHV} – 10 чел., *bla*_{NDM} – 5 чел., интегроны класса 1 – у 18 чел., интегроны класса 2 – у 2 чел., одновременно интегроны классов 1 и 2 – у 1 чел. Это подтверждает тенденцию, отмеченную исследователями во всем мире, о том, что множественная лекарственная устойчивость, присущая ранее только патогенам,

циркулирующим в госпитальной среде и ассоциированным с оказанием медицинской помощи, уже вышла за пределы лечебных учреждений. Показано, что некоторые из исследованных нами штаммов грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых людей, относятся к мультирезистентным микроорганизмам. Молекулярным механизмом этого феномена является наличие у них генов бета-лактамаз, а также аккумуляция генетических детерминант антибиотикорезистентности в составе интегронов классов 1 и 2.

Полученные данные вносят вклад в понимание роли интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у грамотрицательных бактерий, возбудителей госпитальных инфекций; вклада носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у госпитализированных пациентов и здоровых людей.

ВЫВОДЫ

1. Созданы коллекция мультирезистентных изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в Российской Федерации в 2003-2019 гг. (n=2065), и электронный каталог. Большинство (84 %) изучаемых изолятов грамотрицательных бактерий характеризовались фенотипом множественной лекарственной устойчивости (MDR). Интегроны классов 1 присутствовали в геномах 31 % изолятов, а интегроны класса 2 – в геномах 13 % грамотрицательных бактерий. Помимо интегров, в геномах бактерий идентифицированы гены бета-лактамаз *bla_{OXA}* (41 %), *bla_{CTX-M}* (38 %), *bla_{TEM}* (35 %), *bla_{SHV}* (25 %), *bla_{VIM}* (3 %), *bla_{NDM}* (2 %) и *bla_{KPC-2}* (1 %).

2. В резистомах изолятов грамотрицательных бактерий выявлено 1247 генных кассет 19 типов, наиболее представленными среди которых являлись *aadB* (10 %), *aacA4* (8 %), *aacC1* (7 %), *aadA1* (7 %), *aadA2* (7 %), *aadA5* (6 %), *bla_{VIM-2}* (4 %), *dfrA1* (4 %), *dfrA7* (3 %), *dfrA12* (3 %), *orfC* (3 %), *orfE* (2 %), *orfY* (2 %) и *sat1* (2 %), а менее представленными – *aacA1* (0,4 %), *aadA6* (0,2 %), *aadA7* (0,2 %), *bla_{PSE-1}* (0,1 %), *dfrB4* (0,1 %), *ereA2* (0,1 %) и *smr2* (0,1 %), что согласуется с уровнями представленности данных кассет в международной базе данных GenBank.

3. Идентифицированы и депонированы в международные базы данных GenBank и INTEGRALL 121 известных и 5 новых наборов генетических кассет, в том числе 4 новых интегрона класса 1: In1249_*dfrA12s-orfF-aadA2* [KT316808]; In1360_*gcu87-aadB-aphA15d-aadA1a* [KX218442]; In1375_*bla_{PBL-1}-aacA4* [KY171972]; In1379_*aadA6:ISPa21-orfD* [KX870013] и один интегрон класса 2: non-Identified_*dfrA1Δ3:IS911-sat1-aadA1* [HM592262].

4. Показано, что интегроны классов 1 и 2 присутствовали в 63 % клинических изолятов ГОБ, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г., в том числе в 69 % *K. pneumoniae*, в 34 % *E. coli*, в 68 % *A. baumannii* и в 76 % *P. aeruginosa*. Уровень носительства генов антибиотикорезистентности составил 78 %. Впервые в мире описан резистом мультирезистентного клинического изолята *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23, несущий одновременно интегроны класса 1, ген цефалоспорины *bla_{CTX-M-15}* и гены карбапенемаз трех

классов: класса А – *bla*_{KPC-2}, класса В – *bla*_{NDM-1} и класса D – *bla*_{OXA-48} на трех плазмидах групп несовместимости IncC, IncFIB(pQil)/IncFII(K) и IncHI1B.

5. В резистомах грамотрицательных бактерий, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории, идентифицированы гены бета-лактамаз *bla*_{TEM}- (21 % изолятов), *bla*_{SHV}- (18 %), *bla*_{CTX-M}- (29 %), *bla*_{NDM}- (8 %) типов, интегроны класса 1 (36 %), интегроны класса 2 (7 %). Наибольшее количество интегронов было идентифицировано в изолятах грамотрицательных бактерий из группы ESKAPE-патогенов - у 52 % изолятов *E. coli* и 28 % *K. pneumoniae*. Впервые в России описано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1, несущих гены *rmpA*, *iro*, *kfu*, и оперона *all*, у сотрудника микробиологической лаборатории.

6. В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 149 референс-штаммов грамотрицательных бактерий, охарактеризованных на наличие генетических детерминант антибиотикорезистентности, в базу данных GenBank размещены 220 нуклеотидных последовательности генов антибиотикорезистентности и 30 полногеномных последовательностей штаммов мультирезистентных грамотрицательных бактерий. Создана и зарегистрирована в Госреестре База данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» (Свидетельство №2020621657 от 31.07.2020 г.).

7. Разработан и испытан лабораторный образец мультиплексной ПЦР тест-системы для детекции интегронных структур: интеграз классов 1 и 2, аминогликозид-модифицирующих ферментов *aacA4*, *aadA1*, *aadA5*, дигидрофолат-редуктаз *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA12* и стрептотрицинацетилтрансферазы *sat2* в геномах грамотрицательных бактерий.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИИ

1. Созданная коллекция мультирезистентных штаммов грамотрицательных бактерий, электронный каталог и база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» могут быть использованы для

анализа фенотипических и генетических характеристик штаммов, выделяемых на территории Российской Федерации.

2. Нуклеотидные последовательности генов антибиотикорезистентности, полные геномы штаммов мультirezистентных грамотрицательных бактерий и информация о клинических изолятах, размещенные в базы данных GenBank и bigsdb.pasteur.fr, могут быть использованы исследователям во всем мире.

3. Лабораторный образец ПЦР тест-системы в режиме реального времени может быть использованы для детекции генов антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий и определения уровней представленности их транскриптов.

4. Материалы диссертационной работы могут быть использованы в учебной программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенность» при ФБУН ГНЦ ПМБ.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АГМФ	- аминогликозидомодифицирующий фермент
АП	- антимикробные препараты
БЛРС	- бета-лактамаза расширенного спектра
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ГКПМ	- Государственная коллекция патогенных микроорганизмов
ГОВ	- грамотрицательные бактерии
ДГФР	- фермент дигидрофолат редуктаза
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
ЕЦКПЗ/ECDC	- European Centre for Disease Prevention and Control - Европейский Центр по контролю и профилактике заболеваний
ИСМП	- инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КОЕ	- колониеобразующая единица
МГЭ	- мобильные генетические элементы
МЛУ	- MDR - Multi Drug Resistent - множественная лекарственная устойчивость
МПК	- минимальная подавляющая концентрация
НГОВ	- неферментирующие грамотрицательные бактерии
нейро-ОРИТ	- отделение реанимации и интенсивной терапии нейрохирургии
ОРИТ	- отделение реанимации и интенсивной терапии
п.н.	- пара нуклеотидов
ПАБК	- парааминобензойная кислота
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
РНК	- рибонуклеиновая кислота
т.п.н.	- тысяча пар нуклеотидов
ЦКПЗ/CDC	- Centers for Disease Control - Центр по контролю и профилактике заболеваний США
<i>bla</i>	- ген бета-лактамазы
<i>hvkP</i>	- гипервирулентные <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>ins1</i>	- генетические кассеты интегрона класса 1
<i>ins2</i>	- генетические кассеты интегрона класса 2
<i>int1</i>	- ген интегразы 1 класса
<i>int2</i>	- ген интегразы 2 класса
<i>intl1</i>	- интегрон 1 класса
<i>intl2</i>	- интегрон 2 класса
IS	- Insertion sequence - инсерционная последовательность
NCBI	- National Center for Biotechnology Information - Национальный центр биотехнологической информации
ORF	- open reading frame - открытая рамка считывания
SNP	- Single Nucleotide Polymorphism - единичный нуклеотидный полиморфизм
ST	- сиквенс-тип
XDR	- Extremely Drug Resistent - экстремальная устойчивость

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акимкин, В.Г. Актуальные направления научных исследований в области инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, на современном этапе / В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян // Здор. Нас. Ср. Обит. ЗНиСО. – 2018. – Т. 4. – С. 46-50.
2. Акимкин, В.Г. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень за 2018 г. / В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, О.А. Орлова, А.А. Голубкова, О.А. Квасова, Н.В. Сычева., Скачкова Т.С. // - М. : ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. – С. 51.
3. Асташкин, Е.И. Три новых интегрона класса 1, обнаруженных в полирезистентных госпитальных штаммах / Е.И. Асташкин, А.И. Лев, О.Н. Ершова, Т.С. Новикова, Е.Н. Агеева, Г.Н. Федюкина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 9-16.
4. Белобородов, В.Б. Проблема нозокомиальных инфекций и роль инфекционной службы в ее решении / В.Б. Белобородов // Узловые вопросы борьбы с инфекцией: материалы Российской научно-практической конференции. - СПб. – 2004. - С. 24.
5. Кузина, Е.С. Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. / Е.С. Кузина, Е.И. Асташкин, А.И. Лев, Е.Н. Агеева, Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 17-24.
6. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж.Сэмбрук.: Л.: Мир, –1984. – 480 с.
7. Найговзина, Н.Б. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в российской федерации ОРГЗДРАВ: новости, мнения, обучения / Н.Б. Найговзина, А.Ю. Попова, Е.Е. Бирюкова, Е.Б. Ежлова, Е.П. Игонина, В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, Н.В. Шестопалов, С.А. Краевой, Н.А. Костенко, Н.И. Брико, Е.Б. Брусиная, Л.П. Зуева, И.В. Фельдблюм, В.В. Шкарин, Р.С. Козлов, В.Л. Стасенко, А.А.

Голубкова, Г.Т. Сухих // ОРГЗДРАВ Вестник ВШОУЗ. – 2018. – Т. 11, № 1. – С. 17-26.

8. Самойлова, А.А. Фенотипическая и генотипическая оценка резистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева, Н.В. Михайлов, С.А. Егорова, Е.А. Шилинг // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2022. – Т. 1. – С. 25-31.

9. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014 / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Скленова, Н.В. Иванчик, А.В. Микотина, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клин. Микробиол. и Антимикробн. Химиотер. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 49-56.

10. Фролов, В.К. Современная эпидемиологическая и этиологическая характеристика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Монография. / В.К. Фролов, Э.С. Куракин.: М.: МЦНС «Наука и Просвещение», – 2018. – С. 124.

11. Хайруллина, А.Р. Генетические маркеры резистентности к карбапенемам грамотрицательных бактерий, выделенных в многопрофильных стационарах г. Санкт-Петербурга / А.Р. Хайруллина, Л.А. Краева, Н.С. Козлова, К.А. Дмитриев, А.А. Самойлова, Д.П. Гладин // Бактериол. – 2021. – Т. 6, № 3. – С. 74-75.

12. Чеботарь, И.В. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция / И.В. Чеботарь, Ю.А. Бочарова, Н.А. Маянский // Клин. Микробиол. Антимикробн. Химиотер. – 2017. – Т. 19, № 4. – С. 308-319.

13. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014 / М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Скленова, Н.В. Иванчик, А.В. Микотина, Е.А. Шек, А.В. Дехнич, И.С. Азизов, Р.С. Козлов // Клин. Микробиол. и Антимикробн. Химиотер. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 37-41.

14. Abbassi, M.S. Genetic characterisation of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains isolated from stem cell transplant patients in

Tunisia / M.S. Abbassi, C. Torres, W. Achour, L. Vinué, Y. Sáenz, D. Costa, O. Bouchami, Ben A. Hassen // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2008. – Vol. 32, N. 4. – P. 308–314.

15. Abella, J. Integron diversity in marine environments / J. Abella, A. Bielen, L. Huang, T.O. Delmont, D. Vujaklija, R. Duran, C. Cagnon // Environ. Sci. Pollut. Res. – 2015. – Vol. 22, N 20. – P. 15360–15369.

16. Ageevets, V. Genetic environment of the *blaKPC-2* gene in a *Klebsiella pneumoniae* isolate that may have been imported to Russia from Southeast Asia / V. Ageevets, J. Sopova, I. Lazareva, M. Malakhova, E. Ilina, E. Kostyukova, V. Babenko, A. Carattoli, Y. Lobzin, A. Uskov, S. Sidorenko // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2017. – Vol. 61, N 2. – P. e01856-16.

17. Ageevets, V.A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint-Petersburg, Russia / V.A. Ageevets, I.V. Partina, E.S. Lisitsyna, E.N. Ilina, Y.V. Lobzin, S.A. Shlyapnikov, S.V. Sidorenko // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2014. – Vol. 44, N 2. – P. 152–155.

18. Agersø, Y. The tetracycline resistance determinant Tet 39 and the sulphonamide resistance gene *sulIII* are common among resistant *Acinetobacter* spp. isolated from integrated fish farms in Thailand / Y. Agersø, A. Petersen // J. Antimicrob. Chemother. – 2007. – Vol. 59, N 1. – P. 23–27.

19. Ahmed, A.M. Molecular characterization of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis in Egypt / A.M. Ahmed, T. Shimamoto // Microbiology and immunology. – 2011. – Vol. 55, N 5. – P. 318–327.

20. Akrami, F. Resistance integrons: a mini review / F. Akrami, M. Rajabnia, A. Pournajaf // Caspian J. Intern. Med. – 2019. – Vol. 10, N 4. – P. 370–376.

21. Alekseeva, A.E. The mobilome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates / A.E. Alekseeva, N.F. Brusnigina, N.A. Gordinskaya // Russ. J. Genet. – 2020. – Vol. 56, N 3. – P. 280–288.

22. Alhanout, K.M. Squalamine as an example of a new potent antimicrobial agents class: a critical review / K.M. Alhanout, J.M. Rolain, J. Brunel // Curr. Med. Chem. – 2010. – Vol. 17, N 32. – P. 3909–3917.

23. 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, N. Al-

Saryi, S.N. Aziz, A. Besinis, H.F. Hetta // *Microb. Drug Resist.* – 2020. – Vol. 26, N 6. – P. 616–622.

24. Almuzara, M. Genetic analysis of a PER-2-producing *Shewanella* sp. strain harbouring a variety of mobile genetic elements and antibiotic resistance determinants / M. Almuzara, S. Montaña, T. Lazzaro, S. Uong, G. Parmeciano Di Noto, G. Traglia, R. Bakai, D. Centrón, A. Iriarte, C. Quiroga, M.S. Ramirez // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* Taibah University. – 2017. – Vol. 11. – P. 81–86.

25. Aminov, R.I. A brief history of the antibiotic era: Lessons learned and challenges for the future / R.I. Aminov // *Front. Microbiol.* – 2010. – Vol. 1. – P. 134.

26. Aranke, M. Disinfectants in interventional practices / M. Aranke, R. Moheimani, M. Phuphanich, A. D. Kaye, A. L. Ngo, O. Viswanath, J. Herman // *Curr. Pain. Headache. Rep.* – 2021. – Vol. 25, N 4. – P. 21.

27. Azizi, O. Class 1 integrons in non-clonal multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from Iran, description of the new *bla*_{IMP-55} allele in In1243 / O. Azizi, M. R. Shakibaie, F. Badmasti, F. Modarresi, R. Ramazanzadeh, S. Mansouri, F. Shahcheraghi // *J. Med. Microbiol.* – 2016. – Vol. 65, N 9. – P. 928–936.

28. Bagheri-Nesami, M. Multidrug and co-resistance patterns of non-fermenting Gram-negative bacilli involved in ventilator-associated pneumonia carrying class 1 integron in the North of Iran / M. Bagheri-Nesami, M.S. Rezai, F. Ahangarkani, A. Rafiei, A. Nikkhah, G. Eslami, K. Shafahi, A. Hajalibeig, R. Khajavi // *Germs.* – 2017. – Vol. 7, N 3. – P. 123–131.

29. Ballaben, A.S. Extensively drug-resistant IMP-16-producing *Pseudomonas monteilii* isolated from cerebrospinal fluid / A.S. Ballaben, R. Galetti, L.N. Andrade, J.C. Ferreira, D. de Oliveira Garcia, Y. Doi, A. Darini // *Infect. Genet. Evol.* – 2021. – Vol. 87. – P. 104658.

30. Baquero, F. The 2010 Garrod Lecture: The dimensions of evolution in antibiotic resistance: Ex unibus plurum et ex pluribus unum / F. Baquero // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2011. – Vol. 66, N 8. – P. 1659–1672.

31. Barraud, O. Integrons, a predictive biomarker for antibiotic resistance in acute sepsis: the IRIS study / O. Barraud, E. Guichard, D. Chainier, D. Postil, L. Chimot, E. Mercier, J. P. Frat, A. Desachy, J. C. Lacherade, A. Mathonnet, F. Bellec, B. Giraudeau, M. C. Ploy, B. François // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2021. – Vol. 77, N 1. – P. 213–217.

32. Barraud, O. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons / O. Barraud, M. C. Baclet, F. Denis, M. C. Ploy // J. Antimicrob. Chemother. – 2010. – Vol. 65, N 8. – P. 1642–1645.
33. Barraud, O. Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicemia / O. Barraud, B. François, D. Chainier, J. Vignaud, M.C. Ploy // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2014. – Vol. 44, N 4. – P. 351-353.
34. Baughn, A.D. Biofilm matrix proteins / A.D. Baughn, K.Y. Rhee // Microbiol. Spectr. – 2014. – Vol. 2, N 3. P. 1–16.
35. Belaynehe, K. M. Interrelationship between tetracycline resistance determinants, phylogenetic group affiliation and carriage of class 1 integrons in commensal *Escherichia coli* isolates from cattle farms / K.M. Belaynehe, S.W. Shin, H.S. Yoo // BMC Vet. Res. – 2018. – Vol. 14, N 1. – P. 340.
36. Belotti, P.T. Description of an original integron encompassing *bla*_{VIM-2}, *qnrVC1* and genes encoding bacterial group II intron proteins in *Pseudomonas aeruginosa* / P.T. Belotti, L. Thabet, A. Laffargue, C. André, L. Coulange-Mayonnove, C. Arpin, A. Messadi, F. M'Zali, C. Quentin, V. Dubois // J. Antimicrob. Chemother. – 2015. – Vol. 70, N 8. – P. 2237–2240.
37. Berendonk, T.U. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework / T.U. Berendonk, C.M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, F. Walsh, H. Bürgmann, H. Sørum, M. Norström, M.N. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero, J.L. Martinez // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 13, N 5. – P. 310–317.
38. Biskri, I. Integration of sequence of computational modules dedicated to text analysis: A combinatory typed approach / I. Biskri, M. Anastacio, A. Joly, B.A. Bensaber // FLAIRS Conference. – 2015.
39. Bocharova, Y. Genotypes, carbapenemase carriage, integron diversity and *oprD* alterations among carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Russia / Y. Bocharova, T. Savinova, A. Lazareva, S. Polikarpova, N. Gordinskaya, N. Mayanskiy, I. Chebotar // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2020. – Vol. 55, N 4. – P. 310-317.
40. Boev, C. Hospital-acquired infections: current trends and prevention / C. Boev, E. Kiss // Crit. Care Nurs. Clin. North Am. – 2017. – Vol. 29, N 1. – P. 51-65.

41. Botelho, J. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - mechanisms, epidemiology and evolution / J. Botelho, F. Grosso, L. Peixe // Drug. Resist. Updat. – 2019. – Vol. 44. – P. 100640.
42. Brink, A.J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally / A.J. Brink // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2019. – Vol. 32, N 6. – P. 609–616.
43. Bugarel, M. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium / M. Bugarel, S.A. Granier, F.X. Weill, P. Fach, A. Brisabois // BMC Microbiol. – 2011. – Vol. 11. – P. 151.
44. Burki, T.K. Development of new antibacterial agents: a sense of urgency needed / T.K. Burki // Lancet Respir. Med. – 2021. – Vol. 9, N 6. – P. e54.
45. Bush, K. Updated functional classification of β -lactamases / K. Bush, G.A. Jacoby // Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – Vol. 54, N 3. – P. 969–976.
46. Cambray, G. Integrins / G. Cambray, A.-M. Guerout, D. Mazel // Annu. Rev. Genet. – 2010. – Vol. 44, N 1. – P. 141–166.
47. Cantón, R. Determining the burden of infectious diseases caused by carbapenem-resistant gram-negative bacteria in Spain / R. Cantón, R. Huarte, L. Morata, J.L. Trillo-Mata, R. Muñoz, J. González, M. Tort, X. Badia // Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. (Engl Ed). – 2021. – Vol. 39, N 4. – P.179–183.
48. Carattoli, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae / A. Carattoli // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N. 6. – P. 2227–2238.
49. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. – 2019.
50. Celejewski–Marciniak, P. Molecular characterization of class 1, 2 and 3 integrons in *Serratia* spp. clinical isolates in Poland – isolation of a new plasmid and identification of a gene for a novel fusion protein / P. Celejewski–Marciniak, R. Wolinowska, M. Wróblewska, // Infect. Drug Res. – 2021. – Vol. 14. – P. 4601–4610.
51. Chairat, S. High prevalence of imipenem-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Burns Hospital in Tunisia: detection of a novel class 1 integron / S. Chairat, H. Ben Yahia, B. Rojo-Bezares, Y. Sáenz, C. Torres, K. Ben Slama // J. Chemother. – 2019. –Vol. 31, N 3. – P. 120–126.

52. Chen, C.M. Colonization dynamics of *Klebsiella pneumoniae* in the pet animals and human owners in a single household / C.M Chen, H.L. Tang, C.S. Chiou, K.C. Tung, M. C. Lu, Y.C. Lai // Vet. Microbiol. – 2021. – Vol. 256. – P. 117.
53. Chen, J. Prevalence and characterization of integrons in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in Eastern China: a multiple–hospital study / J. Chen, H. Li, J. Yang, R. Zhan, A. Chen, Y. Yan // Int. J. Environ. Res. Public. Health. – 2015. – Vol. 12, N 8. – P. 1093–1105.
54. Chen, P.L. Salvage therapy with tigecycline for recurrent infection caused by ertapenem-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* / P.L. Chen, J.J. Yan, C.J. Wu, H.C. Lee, C.M. Chang, N.Y. Lee, N.Y. Ko, L.R. Wang, H.I. Shih, C.C. Lee, W.C. Ko // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 68, N 3. – P. 312–314.
55. Cheng, Y.S. Repurposing screen identifies unconventional drugs with activity against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* / Y.S. Cheng, W. Sun, M. Xu, M. Shen, M. Khraiweh, R.J. Sciotti, W. Zheng // Front. Cell. Infect. Microbiol. – 2019. – Vol. 4, N. 8. – P. 438.
56. Chowdhury, G. Emergence of azithromycin resistance mediated by phosphotransferase-encoding *mph(A)* in diarrheagenic *Vibrio fluvialis* / G. Chowdhury, T. Ramamurthy, A. Ghosh, S. Dutta, E. Takahashi, A.K. Mukhopadhyay // mSphere. – 2015. – Vol. 4, N 3. – P. e00215–19.
57. Chung, D.R. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea / D.R. Chung, H. Lee, M.H. Park, S.I. Jung, H.H. Chang, Y.S. Kim, J.S. Son, C. Moon, K.T. Kwon, S.Y. Ryu, S.Y. Shin, K.S. Ko, C.I. Kang, K.R. Peck, J.H. Song // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012. – Vol. 31, N. 4. – P. 481–486.
58. Collis, C.M. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines / C.M. Collis, M.J. Kim, S.R. Partridge, H.W. Stokes, R.M. Hall // J. Bacteriol. – 2002. – Vol. 184, N 11. – P. 3017–3026.
59. Concha, C. Characterization of a novel variant of the quinolone–resistance gene *qnrB* (*qnrB89*) carried by a multi–drug resistant *Citrobacter gillenii* strain isolated from farmed salmon in Chile / C. Concha, C.D. Miranda, R. Rojas, F.A. Godoy, J. Romero // Antibiotics (Basel). – 2021. – Vol. 26, N. 10. – P. 236.

60. Cury, J. Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes / J. Cury, T. Jové, M. Touchon, B. Néron, E.P. Rocha // *Nucleic acids research*. – 2016. – Vol. 44, N 10. – P. 4539–4550.
61. da Fonseca, E.L. Detection of new *arr-4* and *arr-5* gene cassettes in clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains from Brazil Freitas / E.L.F. da Fonseca, J.C. de Amorim, A.C. Vicente // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2016. – Vol. 52, N 5. – P. 1865–1867.
62. Da Silva, G.J. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal / G.J. Da Silva, M. Correia, C. Vital, G. Ribeiro, J.C. Sousa, R. Leitão, L. Peixe, A. Duarte, // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – Vol. 215, N 1. – P. 33–39.
63. Dawes, F.E. Distribution of class 1 integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-conserved segments in *Escherichia coli* of human and animal origin / F.E. Dawes, A. Kuzevski, K.A. Bettelheim, M.A. Hornitzky, S.P. Djordjevic, M.J. Walker // *PloS one*. – 2020. – Vol. 5, N 9. – P. e12754.
64. Deng, Y. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons / Y. Deng, X. Bao, L. Ji, L. Chen, J. Liu, J. Miao, D. Chen, H. Bian, Y. Li, G. Yu // *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* – 2010. – Vol. 14, N 3. – P. 45.
65. Diarra, M.S. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus counts*, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* / M.S. Diarra, F.G. Silversides, F. Diarrassouba, J. Pritchard, L. Masson, R. Brousseau, C. Bonnet, P. Delaquis, S. Bach, B.J. Skura, E. Topp // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – Vol. 73, N 20. – P. 6566–6576.
66. Dias, M.F. Exploring antibiotic resistance in environmental integron-cassettes through *intI-attC* amplicons deep sequencing / M.F. Dias, G.M. de Castro, M.C. de Paiva, M. de Paula Reis, S. Facchin, A.O. do Carmo, M.S. Alves, M.L. Suhadolnik, A. de Moraes Motta, I. Henriques, E. Kalapothakis, F.P. Lobo, A. Nascimento // *Braz. J. Microbiol.* – 2021. – Vol. 52, N 1. – P. 363–372.
67. Ebrahimi, F. Asymptomatic faecal carriage of ESBL producing enterobacteriaceae in Hungarian healthy individuals and in long-term care applicants: a shift towards CTX-M producers in the community / F. Ebrahimi, J. Mózes, J. Mészáros,

Á. Juhász, L. Majoros, K. Szarka, G. Kardos // Infect. Dis. – 2016. – Vol. 48, N 7. – P. 557–559.

68. Ebrahimi, F. Carriage rates and characteristics of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in healthy individuals: comparison of applicants for long-term care and individuals screened for employment purposes / F. Ebrahimi, J. Mózes, J. Mészáros, Á. Juhász, G. Kardos // Chemotherapy. – 2014. – Vol. 60, N 4. – P. 239-249.

69. Eckert, C. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes / C. Eckert, V. Gautier, G. Arlet // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 57, N 1. – P. 14–23.

70. Edelstein, M.V. Spread of extensively resistant VIM-2-positive ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Belarus, Kazakhstan, and Russia: a longitudinal epidemiological and clinical study / M.V. Edelstein, E.N. Skleenova, O.V. Shevchenko, J.W. D'souza, D.V. Tapalski, I.S. Azizov, M.V. Sukhorukova, R.A. Pavlukov, R.S. Kozlov, M.A. Toleman, T.R. Walsh // Lancet. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 13, N 10. – P. 867–876.

71. Ellington, M.J. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee / M.J. Ellington, O. Ekelund, F.M. Aarestrup, R. Canton, M. Doumith, C. Giske, H. Grundman, H. Hasman, M. Holden, K.L. Hopkins, J. Iredell, G. Kahlmeter, C.U. Köser, A. MacGowan, D. Mevius, M. Mulvey, T. Naas, T. Peto, J.M. Rolain, Ø. Samuelsen // Clin. Microbiol. Infect. – 2017. – Vol. 23, N 1. – P. 2–22.

72. Ershova, K. Implementing an infection control and prevention program decreases the incidence of healthcare-associated infections and antibiotic resistance in a Russian neuro-ICU / K. Ershova, I. Savin, N. Kurdyumova, D. Wong, G. Danilov, M. Shifrin, I. Alexandrova, E. Sokolova, N. Fursova, V. Zelman // Antimicrob. Res. Inf. Control. – 2018. – Vol. 7, N 94. – P. 10 –19.

73. Escudero, J.A. The integron: adaptation on demand / J.A. Escudero, C. Loot, A. Nivina, D. Maze, // Microbiol. Spectr. – 2015. – Vol. 3, N 2. – P. 113–118.

74. Fernández Rivas, C. The high prevalence and factors associated with the distribution of the integron *intI1* and *intI2* genes in scottish cattle herds / C. Fernández Rivas, T. Porphyre, M.E. Chase-Topping, C.W. Knapp, H. Williamson, O. Barraud, S.C.

Tongue, N. Silva, C. Currie, D.T. Elsby, D.V. Hoyle // Front. Vet. Sci. – 2021. – Vol. 7, N 2. – P. 716–726.

75. Fernández, J. The challenges of multi-drug-resistance in hepatology / J. Fernández, F. Bert, M.H. Nicolas-Chanoine // J. Hepatol. –2016. –Vol. 65, N 5. – P. 1043–1054.

76. Fernández-Fuentes, M.A. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods / M.A. Fernández-Fuentes, H. Abriouel, E. Ortega Morente, R. Pérez Pulido, A. Gálvez // Int. J. Food Microbiol. – 2000. – Vol. 142, P. 49–56.

77. Fernández-Verdugo, A. Prospective multicentre study of rectal carriage of multidrug-resistant Enterobacteriaceae among health-care workers in Spain / A. Fernández-Verdugo, L. Forcelledo, J. Rodríguez-Lozano, C. Rodríguez-Lucas, L. Barreiro-Hurlé, A. Canut, P. de la Iglesia, D. Escudero, J. Calvo, J.A. Boga, M. Margolles, M.R. Rodicio, J. Fernández // Clin. Microbiol. Infect. – 2020. – Vol. 26, N 5. – P. 649 – 673.

78. Fluit, A.C. Resistance integrons and super-integrons / A.C. Fluit, F.J. Schmitz // Clin. Microbiol. Infect. – 2004. – Vol. 10, N 4. – P. 272 – 288.

79. Fursova, N.K. Emergence of five genetic lines ST395NDM-1, ST13OXA-48, ST3346OXA-48, ST39CTX-M-14, and novel ST3551OXA-48 of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, N.I. Gabrielyan, T.S. Novikova, G.N. Fedyukina, M.K. Kubanova, N.M. Esenova, S.O. Sharapchenko, N.V. Volozhantsev // Microbial. Drug Resist. – 2020. – Vol. 26, N 8. – P. 924–933.

80. Fursova, N.K. Genetic environments of *bla*CTX-M genes located on conjugative plasmids of Enterobacteriaceae nosocomial isolates collected in Russia within 2003-2007 / N.K. Fursova, S.D. Pryamchuk, I.V. Abaev, Yu.N. Kovalev, N.A. Shishkova, E.I. Pecherskikh, O.V. Korobova, E.I. Astashkin, D.M. Pachkunov, E.A. Svetoch, S.V. Sidorenko // Antibiot. i Khimioterapiya. – 2010. – Vol. 55, N 11-12. – P. 3–10.

81. 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, N.N. Kartsev, E.S. Leonova, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.V. Kurdyumova, S.Y. Sazikina, N.V.

Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2015. – Vol. 14, N 1. – P. 46.

82. Gassama, A. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp. isolates / A. Gassama, A. Sow, A. Aïdara-Kane, O. Barraud, M. Gatet, F. Denis, M.C. Ploy // J. Infect. Dev. Ctries. – 2010. – Vol. 4, N 4. – P. 207.

83. Ghaly, T.M. Evolution of class 1 integrons: mobilization and dispersal via food-borne bacteria / T.M. Ghaly, L. Chow, A.J. Asher, L.S. Waldron, M.R. Gillings // PLoS One. – 2017. – V. 12, N 6. – P. 1–11.

84. Ghaly, T.M. The natural history of integrons / T.M. Ghaly, M.R. Gillings, A. Penesyan, Q. Qi, V. Rajabal, S.G. Tetu // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9, N 11. – P. 2212.

85. Gharieb, R.M. Non-Typhoidal *Salmonella* in poultry meat and diarrhoeic patients: prevalence, antibiogram, virulotyping, molecular detection and sequencing of class I integrons in multidrug resistant strains / R.M. Gharieb, Y.H. Tartor, M.H. Khedr // Gut. pathogens. – 2015. – Vol. 7. – P. 34.

86. Gilbert, P. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance / P. Gilbert, A.J. McBain // Clin. Microbiol. Rev. – 2015. – Vol. 16, N 2. – P. 189–208.

87. Gillings, M.R. Genomics and the evolution of antibiotic resistance / M.R. Gillings, I.T. Paulsen, S.G. Tetu // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 2017. – Vol. 1388, N 1. – P. 92–107.

88. Gillings, M.R. Integrons: Past, Present, and Future / M.R. Gillings // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2014. – Vol. 78, N 2. – P. 257–277.

89. Gillings, M.R. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples / M.R. Gillings, S. Krishnan, P.J. Worden, S.A. Hardwick // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 287, N 1. – P. 56–62.

90. Gillings, M.R. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution / M.R. Gillings, W.H. Gaze, A. Pruden, K. Smalla, J.M. Tiedje, Y.G. Zhu // ISME J. – 2015. – Vol. 9, N 6. – P. 1269–1279.

91. Goldstein, C. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics / C. Goldstein, M.D. Lee, S.

Sanchez, C. Hudson, B. Phillips, B. Register, M. Grady, C. Liebert, A.O. Summers, D.G. White, J.J. Maurer // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2001. – Vol. 45, N 3. – P. 723–726.

92. Gomes, C. Macrolide resistance mechanisms in Enterobacteriaceae: Focus on azithromycin / C. Gomes, S. Martínez–Puchol, N. Palma, G. Horna, L. Ruiz–Roldán, M.J. Pons, J. Ruiz // *Crit. Rev. Microbiol.* – 2017. – Vol. 43, N. 1. – P. 1–30.

93. Grieb, M.S. Dynamic stepwise opening of integron *attC* DNA hairpins by SSB prevents toxicity and ensures functionality / M.S. Grieb, A. Nivina, B.L. Cheeseman, A. Hartmann, D. Mazel, M. Schlierf // *Nucleic. Acids. Res.* – 2017. – Vol. 45, N 18. – P. 10555–10563.

94. Guenther, S. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms / S. Guenther, L. Falgenhauer, T. Semmler, C. Imirzalioglu, T. Chakraborty, U. Roesler, N. Roschanski // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2017. – Vol. 72, N 5. – P. 1289–1292.

95. Guenther, S. Is fecal carriage of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in urban rats a risk for public health / S. Guenther, J. Wuttke, A. Bethe, J. Vojtech, K. Schaufler, T. Semmler, R.G. Ulrich, L.H. Wieler, C. Ewers // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57, N 5. – P. 2424–2425.

96. Guérin, E. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons / E. Guérin, T. Jové, A. Tabesse, D. Mazel, M.C. Ploy // *J. Bacteriol.* – 2020. – Vol. 193, N. 20. – P. 5675–5682.

97. Guerin, E. The SOS response controls integron recombination / E. Guerin, G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbé, M.C. Ploy, D. Mazel, // *Science.* – 2009. – Vol. 324, N 5930. – P. 1034.

98. Haldorsen, B.C. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of *aac(3)-II* and *aac(6')-Ib* / B.C. Haldorsen, G.S. Simonsen, A. Sundsfjord, O. Samuelsen // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 78, N 1. – P. 66–69.

99. Hall, R.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination / R.M. Hall, C.M. Collis // *Mol. Microbiol.* – 1995. – Vol. 15, N 4. – P. 593–600.

100. Hall, R.M. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point / R.M. Hall, D.E. Brookes, H.W. Stokes // *Mol. Microbiol.* – 1991. – Vol. 5, N 8. – P. 1941–1959.
101. Harding, C.M. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence / C.M. Harding, S.W. Hennon, M.F. Feldman // *Nature Reviews Microbiology.* – 2018. – Vol. 16, N 2. – P. 91–102.
102. Hartantyo, S.H.P. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety / S.H.P. Hartantyo, M.L. Chau, T.H. Koh, M. Yap, T. Yi, D.Y.H. Cao, R.A. Gutiérrez, L.C. Ng // *J. Food Prot.* – 2020. – Vol. 83, N 7. – P. 1096–1103.
103. Heir, E. Prevalence and characterization of integrons in blood culture *Enterobacteriaceae* and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron–located lincosamide resistance gene / E. Heir, B.A. Lindstedt, T.M. Leegaard, E. Gjernes, G. Kapperud // *Annals of clinical microbiology and antimicrobials.* – 2004. – Vol. 3. – P. 12.
104. Huang, L.Y. Dissemination of multidrug-resistant, class 1 integron-carrying *Acinetobacter baumannii* isolates in Taiwan / L.Y. Huang, T.L. Chen, P.L. Lu, C.A. Tsai, W.L. Cho, F.Y. Chang, C.P. Fung, L.K. Siu // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2008. – Vol. 14, N 11. – P. 1010–1019.
105. Hujer, K.M. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center / K.M. Hujer, A.M. Hujer, E.A. Hulten, S. Bajaksouzian, J.M. Adams, C.J. Donskey, D.J. Ecker, C. Massire, M.W. Eshoo, R. Sampath // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50, N 12. – P. 4114–4123.
106. Ibrahim, M.E. Emergence of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA} genes in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia / M.E. Ibrahim, T.B. Algak, M. Abbas, B.K. Elamin // *Exp. Ther. Med.* – 2021. – Vol. 22, N 6. – P. 1450.
107. Jackson, N. Discovery and development of new antibacterial drugs: learning from experience? / N. Jackson, L. Czaplewski, L. Piddock // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2018. – Vol. 73, N 6. – P. 1452–1459.

108. Jahan, M.I. Draft genome sequence of a carbapenem-resistant clinical *Acinetobacter baumannii* revealing co-existence of four classes of β -lactamases Rahaman / M.I. Jahan, M.A. Hossain, M. Sultana // J. Glob. Antimicrob. Res. – 2021. – Vol. 27, N 12. – P. 329–331.
109. Jamshidi, Y. SCCmec genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in nasal carriage of multiple sclerosis patients in Iran / Y. Jamshidi, M.R. Pourmand, Z. Pakbaz, A. Pourmand, A. RahimiForoushani, M.A. Sahraian // Iran. J. Public. Health. – 2019. – Vol. 48, N 12. – P. 2270–2276.
110. Kamalbeik, S. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in intensive care unit patients in a hospital with building construction: is there an association / S. Kamalbeik, H. Talaie, A. Mahdavinejad, A. Karimi, A. Salimi // Korean. J. Anesthesiol. – 2014. – Vol. 66, N 4. – P. 295–299.
111. Karami, N. Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota / N. Karami, F. Nowrouzian, I. Adlerberth, A.E Wold // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50, N. 1. – P. 156–161.
112. Karisik, E. Molecular characterization of plasmids encoding CTX-M-15 beta-lactamases from *Escherichia coli* strains in the United Kingdom / E. Karisik, M.J. Ellington, R. Pike, R.E. Warren, D.M. Livermore, N. Woodford // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 58, N. 3. – P. 665–668.
113. Karlsson, M. Identification of a carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate in the United States / M. Karlsson, R.A. Stanton, U. Ansari, G. McAllister, M.Y. Chan, E. Sula, J.E. Grass, N. Duffy, M.L. Anacker, M.L. Witwer, Kamile J. Rasheed, C.A. Elkins, A.L. Halpin // Antimicrob. Agents Chemother. – 2019. – Vol. 63, N. 7, P. e00519-19.
114. Kaushik, M. Integrins and antibiotic resistance genes in water-borne pathogens: threat detection and risk assessment / M. Kaushik, S. Kumar, R. K. Kapoor, P. Gulati // J. Med. Microbiol. – 2019. – Vol. 68, N 5. – P. 679–692.
115. Kaushik, M. Integrins in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology / M. Kaushik, S. Kumar, R.K. Kapoor, J.S. Viridi, P. Gulati // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2018. – Vol. 51, N 2. – P. 167–176.

116. Kim, Y.H. Influence of erythromycin A on the microbial populations in aquaculture sediment microcosms / Y.H. Kim, C.E. Cerniglia // *Aquat. Toxicol.* – 2005. – Vol. 73, N. 3. – P. 230–241.
117. Kim, Y.H. Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* spp. / Y.H. Kim, C.J. Cha, C.E. Cerniglia // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2002. – Vol. 210, N. 2. – P. 239–244.
118. Kim, Y.K. Prolonged carriage of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical risk factors and the influence of carbapenemase and organism types / Y.K. Kim, I.B. Chang, H.S. Kim, W. Song, S.S. Lee // *J. Clin. Med.* – 2021. – Vol. 5, N. 10. – P. 310.
119. Kiratisin, P. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX–M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand / P. Kiratisin, A. Apisarnthanarak, P. Saifon C. Laesripa, R. Kitphati, L.M. Mundy // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2004. – Vol. 58, N. 3. – P. 349–355.
120. Koo, D.H. Rapid divergence of repetitive DNAs in Brassica relatives / D.H. Koo, C.P. Hong, J. Batley, Y.S. Chung, D. Edwards, J.W. Bang, Y. Hur, Y.P. Lim // *Genomics.* – 2011. – Vol. 97, N. 3. – P. 173–185.
121. Kuzina, E.S. Carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains in healthy microbiology laboratory staff, Russia / E.S. Kuzina, T.S. Novikova, V.I. Solomentsev, A.A. Sizova, E.I. Astashkin, N.K. Fursova // *Microbiol. Res. Announc.* – 2021. – Vol. 10, N 19. – P. e00349-21.
122. Lee, K. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea / K. Lee, J.H. Yum, D. Yong, H.M. Lee, H.D. Kim, J.D. Docquier, G.M. Rossolini, Y. Chong // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, N 11. – P. 4485–4491.
123. Lepuschitz, S. Fecal *Klebsiella pneumoniae* carriage is intermittent and of high clonal diversity / S. Lepuschitz, K. Hauser, A. Schriebl, C. Schlagenhaufen, A. Stöger, A. Chakeri, K. Vötsch, S. Pekard-Amenitsch, B. Springer, F. Allerberger, W. Ruppitsch // *Front. Microbiol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 581081.
124. Leungtongkam, U. Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii* / U.

Leungtongkam, R. Thummeepak, K. Tasanapak, S. Sitthisak // PLoS One. – 2018. – Vol. 13, N 12. – P. e0208468.

125. Leverstein-van Hall, M.A. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin / M.A. Leverstein-van Hall, H.E. M Blok, A.R. T Donders, A. Paauw, A.C. Fluit, J. Verhoef // J. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 187, N 2. – P. 251–259.

126. Liu, J.Y. Nosocomial infections: a history of hospital-acquired infections / J.Y. Liu, J.K. Dickter // Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. – 2020. – Vol. 30, N 4. – P. 637–652.

127. Liu, S.Y. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan / S.Y. Liu, J.Y. Lin, C. Chu, L.H. Su, T.Y. Lin, C.H. Chiu // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2006. – Vol. 27, N 1. – P. 81–84.

128. Lucassen, R. Strong correlation of total phenotypic resistance of samples from household environments and the prevalence of class 1 integrons suggests for the use of the relative prevalence of *intI1* as a screening tool for multi-resistance / R. Lucassen, L. Rehberg, M. Heyden, D. Bockmühl // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, N 6. – P. e0218277.

129. Luvsansharav, U.O. Fecal carriage of CTX-M β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in nursing homes in the Kinki region of Japan / U.O. Luvsansharav, I. Hirai, M. Niki, A. Nakata, A. Yoshinaga, A. Yamamoto, M. Yamamoto, H. Toyoshima, F. Kawakami, N. Matsuura, Y. Yamamoto // Infect. Drug. Resist. – 2013. – Vol. 6. – P. 67–70.

130. Luvsansharav, U.O. Prevalence of fecal carriage of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae among healthy adult people in Japan / U.O. Luvsansharav, I. Hirai, M. Niki, A. Nakata, A. Yoshinaga, T. Moriyama, Y. Yamamoto // J. Infect. Chemother. – 2011. – Vol. 17, N 5. – P. 722–725.

131. Machado, E. Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain / E. Machado, R. Cantón, F. Baquero, J.-C. Galán, A. Rollán, L. Peixe, T.M. Coque // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, N 5. – P. 1823–1829.

132. Maciucă, I.E. High prevalence of *Escherichia coli*-producing CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in poultry and human clinical isolates in Romania / I.E.

Maciuca, N.J. Williams, C. Tuchilus, O. Dorneanu, E. Guguianu, C. Carp–Carare, C. Rimbu, D. Timofte // *Microbial. Drug Res.* – 2015. – Vol. 21, N 6. – P. 651–662.

133. Magiorakos, A.P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18, N 3. – P. 268–281.

134. Majtan, T. Oligonucleotide microarray for molecular characterization and genotyping of *Salmonella* spp. strains / T. Majtan, L. Majtanova, J. Timko, V. Majtan // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2007. – Vol. 60, N 5. – P. 937–946.

135. Manchanda, V. Multidrug resistant *Acinetobacter* / V. Manchanda, S. Sinha, N. Singh // *J. Glob. Infect. Dis.* – 2010. – Vol. 2, N 3. – P. 291.

136. Mancilla-Rojano, J. Whole-genome sequences of five *Acinetobacter baumannii* strains from a child with leukemia M2 / J. Mancilla-Rojano, S. Castro-Jaimes, S.A. Ochoa, M. Bobadilla Del Valle, V.M. Luna-Pineda, P. Bustos, A. Laris-González, J. Arellano-Galindo, I. Parra-Ortega, R. Hernández-Castro, M.A. Cevallos, J. Xicohtencatl-Cortes, A. Cruz-Córdova // *Front. Microbiol.* – 2019. – Vol. 10. – P. 132.

137. Marchisio, M. Susceptibility to β -lactams and quinolones of enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections in outpatients / M. Marchisio, A. Porto, R. Joris, M. Rico, M.R. Baroni, J. Di Conza // *Brazilian J. Microbiol.* – 2015. – Vol. 46, N 4. – P. 1155–1159.

138. Martins, N. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates / N. Martins, N. Martins, R.C. Picão, S. Adams-Sapper, L.W. Riley, B.M. Moreira // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59, N 1. – P. 698–701.

139. Masters, P.A. Trimethoprim–sulfamethoxazole revisited / P.A. Masters, T.A. O'Bryan, J. Zurlo, D.Q. Miller, N. Joshi // *Arch. Intern. Med.* – 2003. – Vol. 163, N 4. – P. 402–410.

140. Mazel, D. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome / D.A. Mazel, B. Dychinco, V.A. Webb, J. Davies // *Science.* – 1998. – Vol. 280, N 5363. – P. 605–608.

141. Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution / D. Mazel // Nat. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 4, N 8. – P. 608–620.
142. Mendes Moreira, A. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? / A. Mendes Moreira, E. Couvé–Deacon, P. Bousquet, D. Chainier, T. Jové, M. C. Ploy, O. Barraud // J. Antimicrob. Chemother. – 2019. – Vol. 74, N 6. – P. 1560–1562.
143. Mindlin, S. Ubiquitous conjugative mega-plasmids of *Acinetobacter* species and their role in horizontal transfer of multi-drug resistance / S. Mindlin, O. Maslova, A. Beletsky, V. Nurmukanova, Z. Zong, A. Mardanov, M. Petrova // Front. Microbiol. – 2021. – V. 12. – P. 728644.
144. Miró, E. Surveillance of extended–spectrum beta–lactamases from clinical samples and faecal carriers in Barcelona, Spain / E. Miró, B. Mirelis, F. Navarro, A. Rivera, R. J. Mesa, M. C. Roig, L. Gómez, P. Coll // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 56, N 6. – P. 1152–1155.
145. Moghaddam, M. Prevalence of class 1 integrons and extended spectrum beta lactamases among multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran // Iran. Biomed. J. – 2015. – Vol. 19, N 4. – P. 233–239.
146. Mohammadi, M. The occurrence of type I, II, and III integrons in multi–drug resistance and methicillin–resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Iran / M. Mohammadi, N. Bahrami, M. Khajavian, J. Faghri. // Curr. Microbiol. – 2020. – Vol. 77, N 8. – P. 1653–1659.
147. Morris, C.P. Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing against multidrug-resistant gram-negative bacilli: a comparison of disk diffusion to broth microdilution / C.P. Morris, Y. Bergman, T. Tekle, J.A. Fissel, P.D. Tamma, P.J. Simner // J. Clin. Microbiol. – 2020. – Vol. 59, N 1. – P. e01649-20.
148. Murphy, B.P. Investigation of a global collection of nontyphoidal *Salmonella* of various serotypes cultured between 1953 and 2004 for the presence of class 1 integrons / B.P. Murphy, R. O'Mahony, J.F. Buckley, P. Shine, E.F. Boyd, D. Gilroy, S. Fanning // FEMS Microbiol. Lett. – 2007. – Vol. 26, N 2. – P. 170–176.
149. Nakamura, A. Macrolide esterase–producing *Escherichia coli* clinically isolated in Japan / A. Nakamura, K. Nakazawa, I. Miyakozawa, S. Mizukoshi, K. Tsurubuchi, M. Nakagawa, K. O'Hara, T. Sawai // J. Antibiot. (Tokyo). – 2000. – Vol. 53, N 5. – P. 516–524.

150. Nakamura, Y. Prediction of Horizontally and Widely Transferred Genes in Prokaryotes / Y. Nakamura // *Evol. Bioinform. Online.* – 2018. – Vol. 14. – P. 1176934318810785.
151. Nguyen, L. Multidrug-resistant *Pseudomonas* infections: hard to treat, but hope on the horizon? / L. Nguyen, J. Garcia, K. Gruenberg, C. MacDougall // *Curr. Infect. Dis. Rep.* – 2018. – Vol. 20, N 8. – P. 23.
152. Nijssen, S. Unnoticed spread of integron-carrying Enterobacteriaceae in intensive care units / S. Nijssen, A. Florijn, J. Top, R. Willems, A. Fluit, M. Bonten // *Clin. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 41, N 1. – P. 1–9.
153. Nikolayevskyy, V.V. Molecular epidemiology and prevalence of mutations conferring rifampicin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* strains from the southern Ukraine / V.V. Nikolayevskyy, T.J. Brown, Y.I. Bazhora, A.A., Asmolov, Y.M. Balabanova, F.A. Drobniewski // *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* – 2016. – Vol. 13, N 2. – P. 129–138.
154. Nonaka, L. Novel macrolide–resistance genes, *mef(C)* and *mph(G)*, carried by plasmids from *Vibrio* and *Photobacterium* isolated from sediment and seawater of a coastal aquaculture site / L. Nonaka, F. Maruyama, S. Suzuki, M. Masuda // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2015. – Vol. 61, N 1. – P. 1–6.
155. Novovic, K.D. *PsrA* regulator connects cell physiology and class 1 integron integrase gene expression through the regulation of *lexA* gene expression in *Pseudomonas* spp. / K.D. Novovic, M.J. Malesevic, B.V. Filipic, N.L. Mirkovic, M.S. Miljkovic, M.O. Kojic, B.U. Jovčić // *Curr. Microbiol.* – 2019. – Vol. 76, N 3. – P. 320–328.
156. O'Neill J, Chair. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. London, UK: Review on Antimicrobial Resistance; 2016; P. 1-84.
157. Partridge, S.R. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons / S.R. Partridge, G. Tsafnat, E. Coiera, J.R. Iredell // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2009. – Vol. 33, N 4. – P. 757–784.
158. Partridge, S.R. Gene cassettes potentially encoding fosfomycin resistance determinants / S.R. Partridge, R.M. Hall // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, N 2. – P. 860–861.

159. Partridge, S.R. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance / S.R. Partridge, S.M. Kwong, N. Firth, S.O. Jensen // Clin. Microbiol. Rev. – 2018. – Vol. 31, N 4. – P. e00088-17.
160. Partridge, S.R. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins / S.R. Partridge, H.J. Brown, H.W. Stokes, R.M. Hall // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 45, N 4. – P. 1263–1270.
161. Petersen, A. Class I integrons containing a *dhfrI* trimethoprim resistance gene cassette in aquatic *Acinetobacter* spp. / A. Petersen, L. Guardabassi, A. Dalsgaard, J.E. Olsen // FEMS Microbiol. Lett. – 2000. – Vol. 182, N. 1. – P. 73–76.
162. Peterson, E. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens / E. Peterson, P. Kaur // Front. Microbiol. – 2018. – Vol. 9, N 11. – P. 1–21.
163. Peymani, A. Prevalence of class 1 integron among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Tabriz, Northwest of Iran / A. Peymani, S. Farajnia, M.R. Nahaei, N. Sohrabi, L. Abbasi, K. Ansarin, F. Azhari // Pol. J. Microbiol. – 2012. – Vol. 61, N 1. – P. 57–60.
164. Pfeifer, Y. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens / Y. Pfeifer, A. Cullik, W. Witte // Int. J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 300, N 6. – P. 371–379.
165. Poehlsgaard, J. The bacterial ribosome as a target for antibiotics / J. Poehlsgaard, S. Douthwaite // Nat. Rev. Microbiol. – 2005. – Vol. 3, N 11. – P. 870–881.
166. Poirel, L. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* / L. Poirel, J.Y. Madec, A. Lupo, A.K. Schink, N. Kieffer, P. Nordmann, S. Schwarz // Microbiol. Spectr. – 2018. – Vol. 6, N 4. – P. 289–316.
167. Poirel, L. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamases from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated in Australia / L. Poirel, J.N. Pham, L. Cabanne, B.J. Gatus, S.M. Bell, P. Nordmann // Pathology. – 2004. – Vol. 36, N 4. – P. 366–367.
168. Poirel, L. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48 / L. Poirel, R.A. Bonnin, P. Nordmann // Antimicrob. Agents Chemother. – 2012. – Vol. 56, N 1. – P. 559–562.

169. Pormohammad, A. Prevalence of integron classes in Gram-negative clinical isolated bacteria in Iran: a systematic review and meta-analysis / A. Pormohammad, R. Pouriran, H. Azimi, M. Goudarzi // Iran. J. Basic. Med. Sci. – 2019. – Vol. 22, N 2. – P. 118–127.
170. Potron, A. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology / A. Potron, L. Poirel, P. Nordmann // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2015. – Vol. 45, N 6. – P 568–585.
171. Power, P. Description of In116, the first blaCTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina / P. Power, M. Galleni, J. Di Conza, J.A. Ayala, G. Gutkind / J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 55, N. 4. – P. 461–465.
172. Preena, P.G. Unravelling the menace: detection of antimicrobial resistance in aquaculture / P.G. Preena, T.R. Swaminathan, V.J., Rejish Kumar, I.S. Bright Singh // Lett. Appl. Microbiol. – 2020. – Vol. 71, N. 1. – P. 26–38.
173. Priamchuk, S.D. Genetic determinants of antibacterial resistance among nosocomial *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter* spp. isolates collected in Russia within 2003-2007 / S.D. Priamchuk, N.K. Fursova, I.V. Abaev, I. Kovalev, N.A. Shishkova, E.I. Pecherskikh, O.V. Korobova, E.I. Astashkin, D.M. Pachkunov, A.N. Kruglov, D.V. Ivanov, S.V. Sidorenko, E.A. Svetoch, I.A. Diatlov // Antibiot. Khimioter. – 2010. – Vol. 55, N. 9–10. – P. 3–10.
174. Quinlivan, E.P. Mechanism of the antimicrobial drug trimethoprim revisited / E.P. Quinlivan, J. McPartlin, D.G. Weir, J. Scott // FASEB J. – 2000. – Vol. 14, N. 15. – P. 2519–2524.
175. Ramírez, M.S. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii* / M.S. Ramírez, C. Quiroga, D. Centrón // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49, N. 12. – P. 5179–5181.
176. Raro, O. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit / O. Raro, S.W. Gallo, C. Ferreira, S.D. Oliveira // Rev. Soc. Bras. Med. Trop. – 2017. – Vol. 50, N. 2. – P. 167–172.
177. Rasheed, J.K. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid / J.K. Rasheed, J.W. Biddle, K.F. Anderson, L.

Washer, C. Chenoweth, J. Perrin, D.W. Newton, J.B. Patel // J. Clin. Microbiol. – 2008. – Vol. 46, N. 6. – P. 2066–2069.

178. Recchia, G.D. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons / G.D. Recchia, R.M. Hall // Trends Microbiol. – 1997. – Vol. 5, N. 10. – P. 389–394.

179. Rizk, D.E. Emergence of class 1 to 3 integrons among members of Enterobacteriaceae in Egypt / D.E. Rizk, A.M. El-Mahdy // Microb. Pathog. – 2017. – Vol. 112, N. 11. – P. 50–56.

180. Roberts M.C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes / M.C. Roberts // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 282, N. 2. – P. 147–159.

181. Roberts, M.C. Tetracycline and phenicol resistance genes and mechanisms: importance for agriculture, the environment, and humans / M.C. Roberts, S. Schwarz // J. Environ. Qual. – 2016. – Vol. 45, N. 2. – P. 576–592.

182. Rodríguez–Martínez, J.M. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on / J.M. Rodríguez–Martínez, J. Machuca, M.E. Cano, J. Calvo, L. Martínez–Martínez, A. Pascual // Drug. Resist. Updat. – 2016. – Vol. 29, N. 11. – P. 13–29.

183. Rodulfo, H. Virulence factors and integrons are associated with MDR and XDR phenotypes in nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in a venezuelan university hospital / H. Rodulfo, A. Arcia, A. Hernández, E. Michelli, D. Martinez, M. Guzman, A. Sharma, M. Donato // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. – 2019. – Vol. 61. – P. e20.

184. Rolain, J.M. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): Towards a new pandemic? / J.M. Rolain, P. Parola, G. Cornaglia // Clin. Microbiol. Infect. – 2010. – Vol. 16, N. 12. – P. 1699–1701.

185. Rolland, T. Insertion of horizontally transferred genes within conserved syntenic regions of yeast genomes / T. Rolland, C. Neuvéglise, C. Sacerdot, B. Dujon // PloS ONE. – 2009. – Vol. 4, N. 8. – P. e6515.

186. Rowe-Magnus, D.A. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons / D.A. Rowe-Magnus, A.M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies, D. Mazel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – Vol. 98, N. 2. – P. 652–657.

187. Ruiz-Garbajosa, P. Epidemiology of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Implications for empiric and definitive therapy / P. Ruiz-Garbajosa, R. Cantón // Rev. Esp. Quimioter. – 2017. – Vol. 30, N. 1. – P. 8–12.
188. Sabbagh, P. Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens / P. Sabbagh, M. Rajabnia, A. Maali, E. Ferdosi-Shahandashti // Iran. J. Basic Med. Sci. – 2021. – Vol. 24, N 2. – P. 136–142.
189. Sacristán, C. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain / C. Sacristán, F. Esperón, S. Herrera-León, I. Iglesias, E. Neves, V. Nogal, M.J. Muñoz, A. De la Torre // Avian. Pathol. – 2014. – Vol. 43, N 2. – P. 172–175.
190. Salem Ben, Y. Extended-spectrum-lactamase in a neonatal unit in nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype livingstone producing CTX-M-27 extended-spectrum beta-lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia / Y. Ben Salem, M. Demartin // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 43, N 3. – P. 1037–1044.
191. Sánchez-Osuna, M. Exploration into the origins and mobilization of dihydrofolate reductase genes and the emergence of clinical resistance to trimethoprim Cortés / M. Sánchez-Osuna, P. Llagostera, M. Barbé, I. Erill // Microbial. Genomics. – 2015. – Vol. 6, N 11. – P. mgen000440.
192. Savinova, T.A. Genotypes and metallo-beta-lactamases carriage in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children in Moscow / T.A. Savinova, A.V. Lazareva, O.V. Shamina, O.A. Kryzhanovskaya, I.V. Chebotar, N.A. Mayanskiy // Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother. – 2018. – Vol. 20, N 4. – P. 370–374.
193. Schmitz, F.J. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals / F.J. Schmitz, R. Sadurski, A. Kray, M. Boos, R. Geisel, K. Köhrer, J. Verhoef, A.C. Fluit // J. Antimicrob. Chemother. – 2000. – Vol. 45, N 6. – P. 891–894.
194. Šeputienė, V. Prevalence of trimethoprim resistance genes in *Escherichia coli* isolates of human and animal origin in Lithuania / V. Šeputienė, J. Povilonis, M. Ružauskas, A. Pavilonis, E. Sužiedėlienė // J. Med. Microbiol. – 2010. – Vol. 59, N 3. – P. 315–322.

195. Shaheli, M. The influence of integrons on multidrug resistant *Acinetobacter* spp. isolated from environment and clinical samples / M. Shaheli, M. BaseriSalehi, N. Bahador // Trop. Biomed. – 2018. – Vol. 35, N 2. – P. 354–364.
196. Shelenkov, A. Molecular Typing, Characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates / A. Shelenkov, Y. Mikhaylova, Y. Yanushevich, A. Samoilov, L. Petrova, V. Fomina, V. Gusarov, M. Zamyatin, D. Shagin, V. Akimkin // Antibiotics (Basel, Switzerland). – 2004. – Vol. 9, N 5. – P. 261.
197. Shin, H.W. Characterization of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance genes and their relatedness to class 1 integron and insertion sequence common region in gram-negative bacilli / H.W. Shin, J. Lim, S. Kim, J. Kim, G.C. Kwon, S.H. Koo // J. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 25, N 1. – P. 137–142.
198. Shon, A.S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P.S. Bajwa, T.A. Russo // Virulence. – 2013. – Vol. 4, N 2. – P. 107–118.
199. Skurnik, D. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure / D. Skurnik, A. Le Menac'h, D. Zurakowski, D. Mazel, P. Courvalin, E. Denamur, A. Andremont, R. Ruimy // Antimicrob. Agents Chemother. – 2005. Vol. 49, N 7. – P. 3062–3065.
200. Smet, A. Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health / A. Smet, A. Martel, D. Persoons, J. Dewulf, M. Heyndrickx, L. Herman, F. Haesebrouck, P. Butaye // FEMS Microbiol. Rev. – 2010. – Vol. 34, N 3. – P. 295–316.
201. Soge, O.O. New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae* / O.O. Soge, B.A. Adeniyi, M.C. Roberts // J. Antimicrob. Chemother. – 2006. – Vol. 58, N 5. – P. 1048–1053.
202. Sompolinsky, D. Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel / D. Sompolinsky, Y. Nitzan, S. Tetry, M. Wolk, I. Vulikh, M.B. Kern, D. Sandvang, G. HersHKovits, D.J. Katcoff. // J. Antimicrob. Chemother. – 2005. – Vol. 55, N 1. – P. 119–122.

203. Sørum, H. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* / H. Sørum, T.M. L'Abée-Lund, A. Solberg, A. Wold // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003 – Vol. 47, N 4. – P. 1285–1290.
204. Starikova, I. A Trade-off between the fitness cost of functional integrases and long-term stability of integrons / I. Starikova, K. Harms, P. Haugen, T.T. Lunde, R. Primicerio, Ø. Samuelsen, K.M. Nielsen, P.J. Johnsen // *PLoS Pathog.* – 2012. – Vol. 8, N 11. – P. e1003043.
205. Stokes H.W. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons / H.W. Stokes, R.M. Hall // *Mol. Microbiol.* – 1989. – Vol. 3, N 12. – P. 1669–1683.
206. Stokes, H.W. Class 1 integron-associated spread of resistance regions in *Pseudomonas aeruginosa*: plasmid or chromosomal platforms? / H.W. Stokes, E. Martinez, P. Roy Chowdhury, S. Djordjevic // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2012. – Vol. 67, N 7. – P. 1799–1800.
207. Su, W. Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein / W. Su, V. Kumar, Y. Ding, R. Ero, A. Serra, B. Lee, A. Wong, J. Shi, S.K. Sze, L. Yang, Y.G. Gao // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2018. – Vol. 115, N 20. – P. 5157–5162.
208. Sung, J.Y. Epidemiological characterizations of class 1 integrons from multidrug-resistant acinetobacter isolates in Daejeon, Korea / J.Y. Sung, S.H. Koo, S. Kim, K.C. Kwon // *Ann. Lab. Med.* – 2014. – Vol. 34, N 4. – P. 293–299.
209. Svetlov, M.S. Kinetics of drug-ribosome interactions defines the cidalty of macrolide antibiotics / M.S. Svetlov, N. Vázquez-Laslop, A.S. Mankin // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000 – Vol. 114, N 52. – P. 13673–13678.
210. Tacconelli, E. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis / E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outterson, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher // *Lancet Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 18, N 3. – P. 318–327.
211. Tagg, K.A. Novel trimethoprim resistance gene *dfrA34* identified in *Salmonella heidelberg* in the USA Francois / K.A. Tagg, L. Watkins, M.D. Moore, C.

Bennett, Y.J. Joung, J.C. Chen, J.P. Folster // J. Antimicrob. Chemother. – 2019 – Vol. 74, N 1. – P. 38–41.

212. Tatusova, T. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline / T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin, V. Chetvernin, E. P. Nawrocki, L. Zaslavsky, A. Lomsadze, K.D. Pruitt, M. Borodovsky, J. Ostell // Nucleic. Acids Res. – 2016. – Vol. 44, N 14. – P. 6614–6624.

213. Tavío, M.M. *QnrS1* structure-activity relationships / M.M. Tavío, G.A. Jacoby, D.C. Hooper // J. Antimicrob. Chemother. – 2014. – Vol. 69, N 8. – P. 2102–2109.

214. Tchuente, P. Genome-based insights into the resistomes and mobilomes of two *Providencia rettgeri* strains isolated from wound infections in Madagascar / P. Tchuente, M. Rabenandrasana, L. Ramparany, E. Ratsima, V. Enouf, F. Randrianirina, J. M. Collard // J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2020. – Vol. 20, N 3. – P. 178–182.

215. Thungapathra, M. Occurrence of antibiotic resistance gene cassettes *aac(6')-Ib*, *dfrA5*, *dfrA12*, and *ereA2* in class I integrons in non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* strains in India / M. Thungapathra, K.K. Amita, Sinha, S. R. Chaudhuri, P. Garg, T. Ramamurthy, G.B. Nair, A. Ghosh // Antimicrob. Agents Chemother. – 2002. – Vol. 46, N 9. – P. 2948–2955.

216. Tian, S.F. Prevalence of rectal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* among elderly people in community settings in China / S.F. Tian, B.Y. Chen, Y.Z. Chu, S. Wang. // Can. J. Microbiol. – 2008. – Vol. 54, N 9. – P. 781–785.

217. Timsit, J.F. Rationalizing antimicrobial therapy in the ICU: a narrative review / J.F. Timsit, M. Bassetti, O. Cremer, G. Daikos, J. de Waele, A. Kallil, E. Kipnis, M. Kollef, K. Laupland, J.A. Paiva, J. Rodríguez-Baño, É. Ruppé, J. Salluh, F.S. Taccone, E. Weiss // Intensive Care Med. – 2019. – Vol. 45, N 2. – P. 172–189.

218. Toulouse, J.L. Integron-associated *DfrB4*, a previously uncharacterized member of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase B family, is a clinically identified emergent source of antibiotic resistance / J.L. Toulouse, T.J. Edens, L. Alejandre, A.R. Manges, J.N. Pelletier // Antimicrob. Agents Chemother. – 2001. – Vol. 61, N 5. – P. e02665–16.

219. Turton, J.F. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom / J.F. Turton, M.E. Kaufmann, J.

Glover, J.M. Coelho, M. Warner, R. Pike, T.L. Pitt // Society. –2005. – Vol. 43, N 7. – P. 3074–3082.

220. Vit, C. Integron identification in bacterial genomes and cassette recombination assays / C. Vit, C. Loot, J.A. Escudero, A. Nivina, D. Mazel // Methods Mol. Biol. – 2020. – Vol. 2075. – P. 189–208.

221. White, P.A. Current status of the *aadA* and *dfr* gene cassette families / P.A. White, W.D. Rawlinson // J. Antimicrob. Chemother. – 2001. – Vol. 47, N 4. – P. 495–496.

222. Wick, R.R. Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads / R.R. Wick, L.M. Judd, C.L. Gorrie, K.E. Holt // PLoS Comput. Biol. – 2017. – Vol. 13, N 6. – P. e1005595.

223. Wilson, K. Preparation of genomic DNA from bacteria / K. Wilson // Curr. Protoc. Mol. Biol. – 2001. – Vol. 56. – P. 2-4.

224. Wimberly, B.T. Structure of the 30S ribosomal subunit / B.T. Wimberly, D. E. Brodersen, W.M. Clemons, R.J. Jr Morgan–Warren, A.P. Carter, C. Vonnrhein, T. Hartsch, V. Ramakrishnan // Nature. –2000. – Vol. 407, N 6802. – P. 327–339.

225. Woerther, P.L. Trends in human fecal carriage of extended–spectrum β –lactamases in the community: toward the globalization of CTX–M / P.L. Woerther, C. Burdet, E. Chachaty, A. Andremont // Clinical Microbial. Reviews. – 2013. – Vol. 26, N 4. – P. 744–758.

226. Wong, M.H. Dissemination of INCI2 plasmids that harbor the *bla*CTX–M element among clinical *Salmonella* isolates / M.H. Wong, L. Liu, M. Yan, E.W. Chan, S. Chen // Antimicrob. Agents Chemother. – 2004. – Vol. 59, N 8. – P. 5026–5028.

227. World Health Organization. (2011). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. World Health Organization. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80135>

228. World Health Organization. (2019). The 2019 WHO AWaRe classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use. World Health Organization. [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/327957>. License: CC BY-NC-SA 3.0 IGO

229. World Health Organization’s first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health // Saudi Med. J. – 2014. [Электронный

ресурс] Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news/item/30-04-2014-who-s-first-global-report-on-antibiotic-resistance-reveals-serious-worldwide-threat-to-public-health>

230. Wright, G.D. The antibiotic resistome / G.D. Wright // Expert Opin. Drug Discov. – 2010. – Vol. 5, N 8. – P. 779–788.

231. Xie, X. Molecular epidemiology and virulence characteristics of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in medical laboratory staff: Comparison between microbiological and non-microbiological laboratories / X. Xie, X. Dai, L. Ni, B. Chen, Z. Luo, Y. Yao, X. Wu, H. Li, S. Huang // BMC Infect. Dis. – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 1–10.

232. Xing, L. *ErmF* and *ereD* are responsible for erythromycin resistance in *Riemerella anatipestifer* / L. Xing, H. Yu, J. Qi, P. Jiang, B. Sun, J. Cui, C. Ou, W. Chang, Q. Hu // PloS One. – 2015. – V. 10, N 6. – P. e0131078.

233. Yakout, M.A. Multidrug resistance in integron bearing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Alexandria University Hospitals, Egypt / M.A. Yakout, G.H. Ali. // Curr. Microbiol. – 2020. – Vol. 77, N 12. – P. 3897–3902.

234. Yalda, M. Distribution of Class 1-3 Integrons in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from inpatients in Shiraz, south of Iran / M. Yalda, T.Z. Sadat, R. Elham, T.S. Mohammad, M. Neda, M. Mohammad // Ethiop. J. Health Sci. – 2021. – Vol. 31, N 4. – P. 719–724.

235. Yang, J. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China / J. Yang, Y. Chen, X. Jia, , Luo, Y., Q. Song, W. Zhao, Y. Wang, H. Liu, D. Zheng, Y. Xia, R. Yu, X. Han, G. Jiang, Y. Zhou, W. Zhou, X. Hu, L. Liang, L. Han // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – Vol. 18, N 12. – P. 506–513.

236. Yong, D. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India / D. Yong, M.A. Toleman, C.G. Giske, H.S. Cho, K. Sundman, K. Lee, T.R. Walsh // Antimicrob. Agents Chemother. – 2009. – Vol. 53, N 12. – P. 5046–5054.

237. Yu, T. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from cooked meat products / T. Yu, J. Zhang, X. Jiang, J. Wu, Z.

Dai, Z. Wu, Y. Liang, X. Wang // J. Infect. Dev. Ctries. – 2016. – Vol. 10, N 1. – P. 68–73.

238. Yum, J.H. A new integron carrying VIM-2 metallo-beta-lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate / J.H. Yum, D. Yong, K. Lee, H.S. Kim, Y. Chong // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 42, N 3. – P. 217–219.

239. Zhanel, G.G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections / G.G. Zhanel, A.M. Noreddin // Curr. Opin. Pharmacol. – 2001. – Vol. 1, N 5. – P. 459–463.

240. Zhang, A.N. Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection / A.N. Zhang, L.G. Li, L. Ma, M.R. Gillings, J.M. Tiedje, T. Zhang // Microbiome. – 2018. – Vol. 6, N 1. – P. 1–14.

241. Zhao, X. Serotype distribution, antimicrobial resistance, and class 1 integrons profiles of *Salmonella* from animals in Slaughterhouses in Shandong province, China / X. Zhao, C. Ye, W. Chang, S. Sun // Front. Microbiol. – 2017. – Vol. 8, N 6. – P. 1049.

242. Zhu, Y. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China / Y. Zhu, H. Lai, L. Zou, S. Yin, C. Wang, X. Han, X. Xia, K. Hu, L. He, K. Zhou, S. Chen, X. Ao, S. Liu // Int. J. Food Microbiol. – 2017. – Vol. 259, N 10. – P. 43–51.

243. Zou, W. Microarray analysis of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* from preharvest poultry environment / W. Zou, J.G. Frye, C.W. Chang, J. Liu, C.E. Cerniglia, R. Nayak // J. Appl. Microbiol. – 2009. – Vol. 107, N 3. – P. 906–914.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

1. Fursova, N.K. The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Knyazeva, N.N. Kartsev, **E.S. Leonova**, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.V. Kurdyumova, S.Y. Sazikina, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2015. – V. 14, N 1. – P. 46. Scopus, SJR=0,88. Цит. 48.
2. **Кузина, Е.С.** Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. / Е.С. Кузина, Е.И. Асташкин, А.И. Лев, Е.Н. Агеева, Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Мол. Генетика Микробиол. Вирусол. – 2019. – Т. 37, № 1. – С. 17-24. Scopus, SJR=0,25. Цит. 1.
3. **Kuzina, E.S.** Carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains in healthy microbiology laboratory staff, Russia / E.S. Kuzina, T.S. Novikova, V.I. Solomentsev, A.A. Sizova, E.I. Astashkin, N.K. Fursova // Microbiol. Res. Announc. – 2021. – V. 10, N 19. – P. e00349-21. Scopus, SJR = 0,303. Цит. 1.
4. Fursova, N.K. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing severe infections in the Neuro-ICU. / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, I.A. Savin, T. S. Novikova, G.N. Fedyukina, A.A. Kislichkina, M.V. Fursov, **E.S. Kuzina**, S.F. Biketov, I.A. Dyatlov // Antibiotics. – 2021. – V. 10, N 8. – P. 979. Scopus, SJR=0,785. Цит. 6.
5. **Kuzina, E.S.** Rectal and Tracheal Carriage of Carbapenemase Genes and Class 1 and 2 Integrins in Patients in Neurosurgery Intensive Care Unit. / E.S. Kuzina, T.S. Novikova, E.I. Astashkin, G.N. Fedyukina, A.A. Kislichkina, N.V. Kurdyumova, I.A. Savin, O.N. Ershova, N.K. Fursova // Antibiotics. – 2022. – V. 11, N 7. – P. 886. Scopus, SJR=0,785. Цит. 0.

Б. Зарегистрированные базы данных

1. **Кузина, Е.С.** База данных интегров классов 1 и 2 для изучения молекулярных механизмов множественной антибиотикорезистентности грамотрицательных

бактерий / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, И.Г. Говорунов, Е.И. Асташкин, Н.К. Фурсова // База данных № 2020621657 от 31 июля 2020 г.

В. Тезисы всероссийских и международных научных конференций

1. **Леонова, Е.С.** Детекция мобильных генетических элементов интегронов классов 1 и 2 в полирезистентных клинических изолятах *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* / Е.С. Леонова, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, А.И. Князева, Э.А. Светоч, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.К. Фурсова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. - 2015 г. – С. 193.
2. Асташкин, Е.И. Детекция генов антибиотикорезистентности в бактериальных культурах, выделенных из кишечника и трахеи при одномоментном обследовании пациентов нейрохирургического ОРИТ / Е.И. Асташкин, А.И. Князева, О.И. Тазина, **Е.С. Леонова**, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17 - № 2. – Приложение 1. - С. 14.
3. Асташкин, Е.И. Обнаружение гена карбапенемазы ОХА-48 в изоляте *Enterobacter cloacae*, выделенном в нейрохирургическом ОРИТ в Москве / Е.И. Асташкин, А.И. Князева, **Е.С. Леонова**, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17 - № 2. –Приложение 1. - С. 14-15.
4. Карцев, Н.Н. Молекулярно-генетические механизмы антибиотикорезистентности и токсинообразования у внегоспитальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных при спорадических и вспышечных случаях пищевой инфекции / Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч, В.А. Баннов, Е.И. Асташкин, О.И. Тазина, **Е.С. Леонова**, Н.К. Фурсова, И.А. Дятлов // Материалы международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии. – 2015. – С. 235-240.
5. Fursova, N., The Primary Structure of the Novel blaCTX-M-1-type Gene (blaCTX-M-169) Discovered in Escherichia Coli Hospital Isolate in Russia / N. Fursova, E.

- Astashkin, A. Knyazeva, N. Kartsev, **E. Leonova**, V. Malikov, E. Svetoch, I. Dyatlov // 55th Annual ICAAC, San-Diego, CA, USA, September 17-21, 2015. Poster #C-1693.
6. Лев, А.И. Характеристика грамотрицательных антибиотикорезистентных клинических изолятов, выделенных в отделении нейрореанимации / А.И. Лев, Е.И. Асташкин, О.И. Тазина, О.Н. Ершова, Н.В. Курдюмова, Н.Н. Карцев, **Е.С. Леонова**, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2016. – Т. 18. - № 2. –Приложение 1. - С. 29.
 7. **Леонова, Е.С.** Новый интегрон IN1249, идентифицированный в полирезистентном госпитальном штамме *Escherichia coli* / Е.С. Леонова, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, А.И. Лев, Т.С. Андриевская, В.Е. Маликов, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Материалы VIII ежегодного всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием 2016, Москва, 28-30 марта 2016 г. – с.162-163.
 8. **Леонова, Е.С.** Антибиотикорезистентные изоляты *Shigella flexneri*, выделенные во время вспышки дизентерии в Иркутской области в 2016 году / Е.С. Леонова, А.Н. Гусева, Н.Н. Карцев, Е.И. Асташкин, В.С. Петрова, Н.К. Фурсова, Э.А. Светоч // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» Московская обл., Серпуховский район, 1 – 3 ноября, 2016 г. – с. 223.
 9. Фурсова, Н.К. Молекулярно-генетическое типирование изолятов *Acinetobacter baumannii*, выделенных из клинических субстратов и госпитальной среды / Н.К. Фурсова, Н.И. Габриэлян, Е.И. Асташкин, **Е.С. Леонова**, С.О. Шарапченко, Т.Б. Сафонова, М.И. Петрухина // Статья в сборнике трудов конференции – «Молекулярная диагностика 2017» сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 18-20 апреля 2017 г. – с. 220-222.
 10. **Леонова, Е.С.** Интегроны в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в 2003-2015 гг. / Е.С. Леонова, Е.И. Асташкин, А.И. Лев, Е.Н. Агеева, Н.Н. Карцев, О.И. Тазина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Сборник

тезисов 22ой Международной Пушинской школы - конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА». 23-27 апреля 2018 г. – с.298-299.

11. **Леонова, Е.С.** Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии генов устойчивости у грамотрицательных бактерий / Е.С. Леонова, М.В. Фурсов, Н.К. Фурсова // Статья в сборнике трудов конференции – «Молекулярная диагностика 2018» сборник трудов X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 27-28 сентября 2018 г. – с. 66.
12. Асташкин, Е.И. Характеристика и генотипирование антибиотикорезистентных клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, идентификация нового сиквенс-типа ST3492 / Е.И. Асташкин, О.Н. Ершова, Т.С. Новикова, Г.Н. Федюкина, **Е.С. Кузина**, И.А. Александрова, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2019. – Т. 21. –Приложение 1. - С. 10.
13. **Кузина, Е.С.** Разработка и оценка эффективности лабораторного образца ПЦР тест-системы в реальном времени для выявления генов антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий. / Е.С. Кузина, М.В. Фурсов, Н.К. Фурсова // Статья в сборнике трудов конференции – «Проблемы медицинской микологии» сборник трудов XXII Кашкинские чтения. 11-13 июня 2019 г. – с. 89.
14. **Кузина, Е.С.** Детекция бессимптомного носительства грамотрицательных бактерий у сотрудников микробиологической лаборатории / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, К.В. Детушев, Е.Н. Николаева, Е.В. Ипполитов, В.Н. Царёв, Н.К. Фурсова // Материалы V Национального конгресса бактериологов. Москва, 16–17 сентября 2019 г. – с. 47.
15. Fursova N. A Point-Prevalence and Coexistence of NDM, KPC, and OXA-48 Carbapenemase Genes in Neuro-ICU Patients / N. Fursova, **E. Kuzina**, T. Novikova, E. Astashkin, G. Fedyukina, M. Fursov, S. Kurdyumova, O. Ershova // ASM «Microbe 2020» Chicago, June 18-22, 2020. – Poster # 6150.
16. **Кузина, Е.С.** Носительство грамотрицательных бактерий и генов антибиотикорезистентности у сотрудников микробиологической лаборатории / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Н.К. Фурсова // Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020 года». 6–8 октября 2020 г. – с.53.

17. **Кузина, Е.С.** База данных интегронов классов 1 и 2 для изучения молекулярных механизмов множественной антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Е.И. Асташкин, Н.К. Фурсова // Материалы конференции XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. 21-22 октября 2020 г. – с.352-354.
18. **Кузина, Е.С.** Разработка лабораторного образца мультиплексной ПЦР-тест-системы на основе TaqMan в реальном времени для обнаружения структур интегронов / Е.С. Кузина, Н.К. Фурсова // Сборник трудов VI Национального конгресса бактериологов. 13–15 сентября 2021 г. – с.44.
19. **Кузина, Е.С.** Бессимптомное носительство *Klebsiella oxytoca* сиквенс-типов ST82, ST176 и ST349 у здоровых людей / Е.С. Кузина, В.И. Соломенцев, Т.С. Новикова, Т.Н. Мухина, Н.К. Фурсова // Сборник трудов VI Национального конгресса бактериологов. 13–15 сентября 2021 г. – с.45.
20. **Кузина, Е.С.** Вклад интегронов классов 1 и 2 в формирование фенотипов множественной лекарственной устойчивости у клинических штаммов грамотрицательных бактерий группы ESKAPE, выделенных от пациентов нейрореанимации г. Москвы в 2019 г. / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Е.И. Асташкин, Г.Н. Федюкина, Н.К. Фурсова // Материалы конференции XII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. 15-17 сентября 2021 г. – с.276-277.

Примечание: Леонова, Леопова – фамилия Кузиной Е.С. до даты 01.11.2018 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

**Свидетельство о государственной регистрации базы данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий»
(зарегистрирована ФИПС №2020621657 от 31.07.2020 г.)**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№ 2020621657

**«Разнообразие интегронов в клинических штаммах
граммотрицательных бактерий»**

Правообладатель: **Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН
ГНЦ ПМБ) (RU)**

Авторы: **Кузина Екатерина Сергеевна (RU), Новикова Татьяна
Сергеевна (RU), Асташкин Евгений Ильич (RU), Говорунов Игорь
Геннадиевич (RU), Фурсова Надежда Константиновна (RU)**

Заявка № 2020621276

Дата поступления 31 июля 2020 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 11 сентября 2020 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Перечень депонированных в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» референс-штаммов грамотрицательных бактерий для детекции генов антибиотикоустойчивости

№ п/п	Вид	Номер штамма	Инвентарный номер в ГКПМ-Оболensk	Дата депонирования	Номер справки
1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11PKP/19a	B-8912	31.01.2020	21
2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6TKp/19b	B-8913	31.01.2020	22
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4PKp/19c	B-8914	31.01.2020	23
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4TKp/19c	B-8915	31.01.2020	24
5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6PKp/19c	B-8916	31.01.2020	25
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7TKp/19c	B-8917	31.01.2020	26
7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8TKp/19c	B-8918	31.01.2020	27
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12PKp/19c	B-8919	31.01.2020	28
9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	12TKp/19c	B-8920	31.01.2020	29
10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15PKp/19c	B-8921	31.01.2020	30
11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20PKp/19c	B-8922	31.01.2020	31
12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3TKp/19g	B-8923	31.01.2020	32
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23PKp/19g	B-8924	31.01.2020	33
14	<i>Providencia stuartii</i>	F12-8Ps/19	B-9247	14.12.2020	352
15	<i>Pseudomonas monteilli</i>	Z12Pm/19	B-9248	14.12.2020	353
16	<i>Citrobacter braakii</i>	F24-1Cb/19	B-9249	14.12.2020	354
17	<i>Klebsiella variicola</i>	F12-3Kv/19	B-9250	14.12.2020	355
18	<i>Klebsiella oxytoca</i>	F12-4Ko/19	B-9251	14.12.2020	356
19	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Z12Ko/19	B-9252	14.12.2020	357
20	<i>Klebsiella oxytoca</i>	F13-1Ko/19	B-9253	14.12.2020	358
21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Z18Ko/19	B-9254	14.12.2020	359
22	<i>Klebsiella oxytoca</i>	F28-4Ko/19	B-9255	14.12.2020	360
23	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	F19-4Pa/19	B-9256	14.12.2020	361
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F18R-1Kp/19	B-9257	14.12.2020	362
25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F19-1RKp/19	B-9258	14.12.2020	363
26	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F27-3Kp/19	B-9259	14.12.2020	364
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Z27-Kp/19	B-9260	14.12.2020	365
28	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-672-1	B-9371	14.05.2021	83
29	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-672-2	B-9372	14.05.2021	84
30	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3275	B-9373	14.05.2021	85
31	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-306/14A	B-9374	14.05.2021	86
32	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-919/14	B-9375	14.05.2021	87
33	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1077/14	B-9376	14.05.2021	88
34	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1808/14	B-9377	14.05.2021	89
35	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2133/14A	B-9378	14.05.2021	90
36	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-102/15-1	B-9379	14.05.2021	91
37	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-214/15	B-9380	14.05.2021	92
38	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1710/15	B-9381	14.05.2021	93
39	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2419/15	B-9382	14.05.2021	94
40	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2761/15	B-9383	14.05.2021	95
41	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2044/15	B-9384	14.05.2021	96
42	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2052/15	B-9385	14.05.2021	97
43	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2077/15	B-9386	14.05.2021	98
44	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2791/15	B-9387	14.05.2021	99

45	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2836/15	B-9388	14.05.2021	100
46	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2201A/15	B-9389	14.05.2021	101
47	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1060/16	B-9390	14.05.2021	102
48	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1268/16	B-9391	14.05.2021	103
49	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-780/16	B-9392	14.05.2021	104
50	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-873/16	B-9393	14.05.2021	105
51	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1290/16	B-9394	14.05.2021	106
52	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1279/16	B-9395	14.05.2021	107
53	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1712/16	B-9396	14.05.2021	108
54	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1792/16	B-9397	14.05.2021	109
55	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1612/16	B-9398	14.05.2021	110
56	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2168/16	B-9399	14.05.2021	111
57	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3039/17	B-9400	14.05.2021	112
58	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2269/17	B-9401	14.05.2021	113
59	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3507/17	B-9402	14.05.2021	114
60	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-44/18	B-9403	14.05.2021	115
61	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-423/18	B-9404	14.05.2021	116
62	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1712/18	B-9405	14.05.2021	117
63	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2826/18	B-9406	14.05.2021	118
64	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2996/18	B-9407	14.05.2021	119
65	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3261/18	B-9408	14.05.2021	120
66	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3487/18	B-9409	14.05.2021	121
67	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-3756/18	B-9410	14.05.2021	122
68	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1460/19	B-9411	14.05.2021	123
69	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-1514/19	B-9412	14.05.2021	124
70	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2275/19	B-9413	14.05.2021	125
71	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2477/19	B-9414	14.05.2021	126
72	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-181/20	B-9415	14.05.2021	127
73	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2087/20	B-9416	14.05.2021	128
74	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B-2234/20	B-9417	14.05.2021	129
75	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B-2226K/15	B-9497	27.09.2021	216
76	<i>Proteus mirabilis</i>	B-917/16	B-9498	27.09.2021	217
77	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4PAB/19a-1	B-9510	04.10.2021	226
78	<i>Acinetobacter baumannii</i>	10PAB/19a	B-9511	04.10.2021	227
79	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8PAB/19g	B-9512	04.10.2021	228
80	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4TAB/19a	B-9513	04.10.2021	229
81	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1PAB/19d	B-9514	04.10.2021	230
82	<i>Acinetobacter baumannii</i>	47TAB/19h	B-9515	04.10.2021	231
83	<i>Acinetobacter baumannii</i>	49TAB/19g	B-9516	04.10.2021	232
84	<i>Acinetobacter baumannii</i>	1PAB/19c	B-9517	04.10.2021	233
85	<i>Acinetobacter baumannii</i>	55PAB/19h	B-9518	04.10.2021	234
86	<i>Acinetobacter baumannii</i>	15PAB/19a	B-9519	04.10.2021	235
87	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1PPA/19a	B-9520	06.10.2021	236
88	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7TPA/19a	B-9521	06.10.2021	237
89	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32PPA/19c	B-9522	06.10.2021	238
90	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1PPA/19d	B-9523	06.10.2021	239
91	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7TPA/19d	B-9524	06.10.2021	240
92	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15TPA/19d	B-9525	06.10.2021	241
93	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20PPA/19d	B-9526	06.10.2021	242
94	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28PPA/19d	B-9527	06.10.2021	243
95	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32PPA/19d	B-9528	06.10.2021	244
96	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1PPA/19f	B-9529	06.10.2021	245
97	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32TPA/19f	B-9530	06.10.2021	246
98	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3TPA/19g	B-9531	06.10.2021	247
99	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50PPA/19g	B-9532	06.10.2021	248

100	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1PPA/19h	B-9533	06.10.2021	249
101	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2TPA/19h	B-9534	06.10.2021	250
102	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7TPA/19h	B-9535	06.10.2021	251
103	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34PPA/19h	B-9536	08.10.2021	252
104	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39PPA/19h	B-9537	06.10.2021	253
105	<i>Proteus mirabilis</i>	19PPM/19a	B-9538	06.10.2021	254
106	<i>Proteus mirabilis</i>	21PPM/19a	B-9539	06.10.2021	255
107	<i>Proteus mirabilis</i>	21PPM/19b	B-9540	06.10.2021	256
108	<i>Proteus mirabilis</i>	31PPM/19d	B-9541	06.10.2021	257
109	<i>Proteus mirabilis</i>	26TPM/19d	B-9542	06.10.2021	258
110	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1TKP/19a-1	B-9543	08.10.2021	259
111	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9PKP/19a	B-9544	08.10.2021	260
112	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1PKP/19g	B-9545	08.10.2021	261
113	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7PKP/19a	B-9546	08.10.2021	262
114	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10PKP/19a	B-9547	08.10.2021	263
115	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6PKP/19a	B-9548	08.10.2021	264
116	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7TKP/19a	B-9549	08.10.2021	265
117	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11TKP/19a	B-9550	08.10.2021	266
118	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13PKP/19a	B-9551	08.10.2021	267
119	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20TKP/19a	B-9552	08.10.2021	268
120	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6PKP/19b	B-9553	08.10.2021	269
121	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7TKP/19b-1	B-9554	08.10.2021	270
122	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8PKP/19b	B-9555	08.10.2021	271
123	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15PKP/19b	B-9556	08.10.2021	272
124	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20TKP/19b	B-9557	08.10.2021	273
125	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3PKP/19c	B-9558	08.10.2021	274
126	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19PKP/19c	B-9559	08.10.2021	275
127	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20TKP/19c	B-9560	08.10.2021	276
128	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29PKP/19c	B-9561	08.10.2021	277
129	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31PKP/19c	B-9562	08.10.2021	278
130	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32PKP/19c	B-9563	08.10.2021	279
131	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15TKP/19d	B-9564	08.10.2021	280
132	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29PKP/19d	B-9565	08.10.2021	281
133	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32TKP/19d	B-9566	08.10.2021	282
134	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34PKP/19d	B-9567	08.10.2021	283
135	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34TKP/19d	B-9568	08.10.2021	284
136	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	31PKP/19f	B-9569	08.10.2021	285
137	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36PKP/19f	B-9570	08.10.2021	286
138	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	36TKP/19f	B-9571	08.10.2021	287
139	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3PKP/19g-2	B-9572	08.10.2021	288
140	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19TKP/19g	B-9573	08.10.2021	289
141	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48TKP/19g	B-9574	08.10.2021	290
142	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15TKP/19h	B-9575	08.10.2021	291
143	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	59TKP/19h	B-9576	08.10.2021	292
144	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19PKP/19h	B-9577	08.10.2021	293
145	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	58TKP/19h	B-9578	08.10.2021	294
146	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34TKP/19h	B-9579	08.10.2021	295
147	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50TKP/19h	B-9580	08.10.2021	296
148	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41TKP/19h	B-9581	08.10.2021	297
149	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48PKP/19h	B-9582	08.10.2021	298

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Номера доступа нуклеотидных последовательностей генов и полных геномных последовательностей, размещенных в базе данных GenBank

Обозначение гена	Номер доступа
Гены, ассоциированные с антибиотикорезистентностью (n=220)	
<i>adeR</i> (n=3)	KU870993, KU667287, KX132088
<i>bla_{CTX-M-14}</i> (n=1)	KP849462
<i>bla_{CTX-M-15}</i> (n=37)	KP849463, KP849464, KP849465, KJ187476, KJ187477, KM085431, KM085432, KM085433, KM085435, KM085436, KP205559, KP205560, KP205561, KP205562, KP205563, KP214528, KP214529, KP214530, KP214531, KP214532, KP214533, KP214534, KP214535, KP214536, KP214537, KP214538, KP271997, KU926353, KU870992, KX944737, KX944738, KX944739, MN702457, MN737584, MN737585, MN737586, MN737587
<i>bla_{KPC-3}</i> (n=2)	MN688559, MN688560
<i>bla_{OXA-48}</i> (n=23)	KP789946, KJ481797, KJ481798, KM085437, KJ579286, KP056311, KP100448, KP100449, KP198287, KP198288, KP198289, KP198290, KP198291, KP198292, KP198293, KP198294, KP205551, KP205552, KP205553, KP205554, KP205555, KP205556, KU821683
<i>bla_{OXA-51L}</i> (n=2)	KU870997, KU870998
<i>bla_{OXA-72}</i> (n=3)	KU870994, KU870995, KU870996
<i>bla_{OXA-244}</i> (n=5)	KJ187475, KJ481799, KJ579285, KP056309, KP205557
<i>bla_{NDM-1}</i> (n=6)	MN702458, MW736057, MW736058, MW736059, MW736060, MW750219
<i>bla_{SHV-1}</i> (n=8)	MN688551, MN688552, MN688553, MN688554, MN688555, MN688556, MN688557, MN688558
<i>bla_{VIM-2}</i> (n=1)	KX216849
<i>intl 1</i> (n=1)	KP902675
<i>ins1: aac(3)-Ic-cmlA5</i> (n=1)	KU901704
<i>ins1: aacA4</i> (n=2)	MK649936, MK889497
<i>ins1: aacA7-smr2-orfD</i> (n=1)	MK680905
<i>ins1: aacC1- aadA1</i> (n=1)	KR610434
<i>ins1: aacC1-orfX-orfY-aadA1</i> (n=2)	KR028101, KR028107
<i>ins1: In15, aadA1</i> (n=13)	KP789949, KR028104, KR028105, KR028106, KU860564, KU860567, KU860568, KX267566, KU901701, MH294120, MH294121, MK889496, MK680900
<i>ins1: aadA2</i> (n=2)	MH294122, MK799966
<i>ins1: aadA6</i> (n=2)	KU870999, KU901705
<i>ins1: aadA1-orfC</i> (n=2)	K800019, MK680899
<i>ins1: aadA6- ISPa21e</i> (n=1)	KX870013
<i>ins1: aadA13-orfD</i> (n=2)	MH178367, MH294123
<i>ins1: In7, aadB</i> (n=1)	KX216848

<i>ins1: aadB-aadA1</i> (n=12)	KU901703, MK800018, MK889498, MK889499, MN698641, MK816930, MK799964, MK799965, MK680903, MK889500, MN689932, MN689933
<i>ins1: blaOXA-1-aadA2</i> (n=1)	KX267567
<i>ins1: blaPBL-1-aacA4</i> (n=1)	KY171972
<i>ins1: dfrA1</i> (n=1)	MK680902
<i>ins1: dfrA5</i> (n=2)	MH294119, MN186299
<i>ins1: dfrA7</i> (n=5)	KP789951, KU870990, KY053527, MK816931, MT721828
<i>ins1: dfrA21</i> (n=1)	MT721829
<i>ins1: dfrA1-aadA1</i> (n=3)	KR028103, KR610435, KT305946
<i>ins1: dfrA1-orfC</i> (n=11)	KU860569, KX906677, KY084250, KY084252, MK388145, MK649937, MK799963, MK680901, MN186297, MN186300, MN398388
<i>ins1: dfrA12-aadA2</i> (n=3)	KU860566, KU901702, KY293687
<i>ins1: In54, dfrA17-aadA5</i> (n=22)	KR028102, KP902673, KP789950, KM085438, KT175893, KT175894, KT175895, KT316804, KT316805, KT305943, KT305944, KT305945, KU860565, KX267565, KX896439, KY084249, MK680899, MN380297, MN380298, MN640690, MT721827, KR610432
<i>ins1: In502-518, dfrA12-orfF-aadA2</i> (n=9)	KP965723, KP789948, KP796139, KT316808, KU860570, KU870991, KX906676, KY084251, KY084253
<i>ins1: dfrA12-orfF-aadA8</i> (n=1)	MK680904
<i>ins1: In211, dfrB4</i> (n=1)	KP789952
<i>ins1: estX</i> (n=1)	KP965724
<i>ins1: blaVIM-2</i> (n=2)	KX896437, KX896438
<i>ins1: orfNC- aadB-aphA15-aadA1</i> (n=1)	KX218442
<i>ins2: In2-3, dfrA1-sat2</i> (n=2)	KP796141, KP796142
<i>ins2: In2-4, dfrA1-sat2- aadA1</i> (n=12)	KP796140, KP965725, KP271998, KT175896, KT175897, KT316806, KT316807, KX274124, KX896440, KY094649, MN393164, MW725088
<i>ins2: dfrA12-sat2 -aadA1</i> (n=3)	KM085439, KM085440, KJ579284
<i>ins2: dfrA1Δ3:IS911-sat1-aadA1</i> (n=1)	HM592262
<i>ISEcp1</i> (n=1)	KP214529
<i>ompK36/ompC</i> (n=3)	KJ579289, KJ579290, KJ579291
Полные сборки последовательностей хромосом и плазмид (n=26)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-8923, chromosome	CP086671
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_OXA-48	CP086672
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_NDM-1	CP086673
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_IncFIB	CP086674
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_KPC-2	CP086675
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_ColRNAI	CP086676
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8923_6	CP086677
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-8912, chromosome	CP086664
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pOXA-48	CP086665
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pNDM-1	CP086666
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pIncFIB	CP086667
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pKPC-2	CP086668
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pColRNAI,	CP086669
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid p6	CP086670

<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-8922, chromosome	CP094363
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8922_OXA-48	CP094364-CP094368
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8922_CTX-M-55	CP094370
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8922_KPC-2	CP094371
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8922_ColRNAI	CP094372
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8922_6	CP094373
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-8919, chromosome	CP094991
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8919_OXA-48	CP094992
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8919_NDM-1	CP094993
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8919_KPC-2	CP094994
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8919_ColRNAI	CP094995
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , plasmid pB-8919_6	CP094996
Полногеномные последовательности (n=30)	
<i>Pseudomonas monteilii</i> Z12Pm/19, SCPM-O-B-9248	JAGRZD010000000
<i>Citrobacter braakii</i> F24-1Cb/19, SCPM-O-B-9249	JAGRZC010000000
<i>Klebsiella variicola</i> F12-3Kv/19, SCPM-O-B-9250	JAGRZB010000000
<i>Klebsiella michiganensis</i> F12-4Ko/19, SCPM-O-B-9251	JAGRZA010000000
<i>Klebsiella michiganensis</i> Z12Ko/19, SCPM-O-B-9252	JAGRYZ010000000
<i>Klebsiella variicola</i> F13-1Kv/19, SCPM-O-B-9253	JAGRY010000000
<i>Klebsiella oxytoca</i> Z18Ko/19, SCPM-O-B-9254	JAGRYX010000000
<i>Klebsiella michiganensis</i> F28-4Ko/19, SCPM-O-B-9255	JAGRYW010000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> F19-4Pa/19, SCPM-O-B-9256	JAGRYV010000000
<i>Escherichia coli</i> B-3421E/19, SCPM-O-B-8871	JAHCSE010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 6TKP/19b, SCPM-O-B-8913	JAGUTU010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 4PKP/19c, SCPM-O-B-8914	JAGUTT010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 4TKP/19c, SCPM-O-B-8915	JAGVVO010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 6PKP/19c, SCPM-O-B-8916	JAGUTS010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 7TKP/19c, SCPM-O-B-8917	JAGUTR010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 8TKP/19c, SCPM-O-B-8918	JAGUTQ010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 12TKP/19c, SCPM-O-B-8920	JAHAVO010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 15PKP/19c, SCPM-O-B-8921	JAHAVN010000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-75/14, SCPM-O-B-9017	JAGUUA010000000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B-306/14, SCPM-O-B-9018	JAGUTZ010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-225/20, SCPM-O-B-9023	JAGUTY010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-306/20, SCPM-O-B-9024	JAGUTX010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-320/20, SCPM-O-B-9025	JAGUTW010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-16K/19, SCPM-O-B-9221	JAGVVS010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-185/19, SCPM-O-B-9222	JAGVVR010000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i> B-1261/19, SCPM-O-B-9223	JAGVVQ010000000
<i>Providencia stuartii</i> B-2140/18, SCPM-O-B-9132	JAHCDE010000000
<i>Serratia marcescens</i> B-451/16, SCPM-O-B-9133	JAHAVP010000000
<i>Enterobacter cloacae</i> B-2919c1/17, SCPM-O-B-9134	JAHCDF010000000
<i>Escherichia coli</i> B-A51E/17-1, SCPM-O-B-9135	JAHCDF010000000

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

**Перечень генных кассет, идентифицированных в интегронах
клинических штаммов грамотрицательных бактерий,
выделенных в 2003-2019 гг.**

№	Ген	Синоним	Продукт гена	Функция (устойчивость к антимикробным препаратам)
Устойчивость к аминогликозидам				
1	<i>aacA</i>	<i>aac</i> (6')	аминогликозид 6'-N-ацетилтрансфераза	AMK, ISP, NET, TOB
2	<i>aacC</i>	<i>aac</i> (3')	аминогликозид 3'-N-ацетилтрансфераза	GEN, KAN, NEO, TOB
3	<i>aadA</i>	<i>ant</i> (3')	аминогликозид 3'-аденилтрансфераза	STR, SPE
4	<i>aadB</i>	<i>ant</i> (2')	аминогликозид 2'-аденилтрансфераза	KAN, GEN, TOB
5	<i>aphA</i>	-	аминогликозид 3'-фосфотрансфераза	GEN, KAN, NEO
Устойчивость к хинолонам				
6	<i>qnr</i>	-	белок устойчивости к фторхинолонам	CIP, LEV
Устойчивость к бета-лактамам				
7	<i>bla_{OXA}A</i>	-	бета-лактамаза класса D <i>bla_{OXA}</i> -типа (оксациллиназа)	AMP, CEF, OXA
8	<i>bla_{PSE}</i>	-	PSE-1 / CARB-2 бета-лактамаза класса A	бета-лактамы, включая CB
9	<i>bla_{VI}M</i>	-	бета-лактамаза класса B (металло-бета-лактамаза)	бета-лактамы, кроме монобактамов
10	<i>bla_{PBL}</i>	-	бета-лактамаза класса A	устойчивость к бета-лактамам
Устойчивость к фениколам				
11	<i>cml</i>	-	хлорамфениколацетилтрансфераза	CML
12	<i>catB</i>	-	хлорамфениколацетилтрансфераза	CML
Устойчивость к другим классам антимикробных препаратов				
13	<i>dfr</i>	<i>dhfr</i>	дигидрофолатредуктаза	SXT
14	<i>ereA</i>	-	эритромицин эстераза I типа	ERY
15	<i>estX</i>	-	гипотетическая эстераза	ND
16	<i>qac</i>	-	эффлюксный белок множественной лекарственной устойчивости	соединения четвертичного аммония
17	<i>sat</i>	-	стрептотрицинацетилтрансфераза	STM
18	<i>smr</i>	-	небольшой белок множественной лекарственной устойчивости	SPE/STR
19	<i>str</i>	-	белок устойчивости к стрептомицину	STR
20	<i>sul</i>		дигидроптероатсинтаза, устойчивая к сульфаниламидам	STR
21	<i>tet(G)</i>		эффлюксный насос для оттока тетрациклина	TET
22	<i>lnuF</i>	<i>linF</i>	линкозамиднуклеотидилтрансфераза	LIN
23	<i>arr</i>		АДФ-рибозилтрансфераза	RIF

Примечание: AMK – амикацин, ISP – изепамицин, NET – нетилмицин, TOB – тобрамицин, GEN – гентамицин, KAN – канамицин, NEO – неомицин, STR – стрептомицин, SPE – спектиномицин, STM – стрептотрицин, CIP – ципрофлоксацин, LEV – левофлоксацин, AMP – ампициллин, CEF – цефалотин, OXA – оксациллин, CB – карбенициллин, ERY – эритромицин, CML – хлорамфеникол, SXT – триметоприм, TET – тетрациклины, LIN – линкозамид, RIF – рифампицин, ND – нет данных