

КУЗИНА ЕКАТЕРИНА СЕРГЕЕВНА

**ИНТЕГРОНЫ КЛАССОВ 1 И 2 В ШТАММАХ МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ
ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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 Российской Федерации.

Научный руководитель:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии, ведущий научный сотрудник.

Официальные оппоненты:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая лабораторией, г. Санкт-Петербург;

Сухорукова Марина Витальевна, кандидат медицинских наук (специальность 1.5.11. Микробиология), Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория микробиологии и антимикробной терапии, врач-бактериолог, г. Москва.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург.

Защита диссертации состоится «**16**» **декабря 2022 г.** в 14-00 часов на заседании диссертационного совета 64.1.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: 142279, Московская область, г.о. Серпухов, п. Оболенск, Территория «Квартал А», д. 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 64.1.002.01

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (AR Threats Report, 2019). 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 (Jackson *et al.*, 2018; Burki *et al.*, 2021).

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 (Timsit *et al.*, 2019). Фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) у бактерий формируется в результате аккумуляции генов, обеспечивающих устойчивость к антибиотикам разных функциональных групп (Partridge *et al.*, 2018; Yalda *et al.*, 2021). Причиной наблюдаемого повсеместно быстрого распространения таких механизмов является горизонтальный перенос генов, опосредованный мобильными генетическими элементами (МГЭ) - плазмидами, транспозонами, IS-элементами, ISCR-элементами и интегронами (San Millan *et al.*, 2018; Sabbagh *et al.*, 2021). 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 (Novovic *et al.*, 2019; Barraud *et al.*, 2021).

Исследования, задачей которых является расширение перечня генетических детерминант антибиотикорезистентности, доступных тестированию, проводятся регулярно и основываются на изучении генотипов бактерий, циркулирующих в настоящее время в конкретном регионе (Ellington *et al.*, 2017). Большое значение приобретают не

только детекция генов резистентности как таковых, но также выявление и характеристика молекулярных механизмов их эволюции и распространения (Partridge *et al.*, 2018; Ghaly *et al.*, 2021). 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 (Peterson *et al.*, 2018; Ghaly *et al.*, 2021).

Наиболее распространены интегроны в геномах грамотрицательных бактерий (ГОб) 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. (Zhang *et al.*, 2018; Yalda *et al.*, 2021). Поэтому изучение интегронов именно в штаммах ГОб, вызывающих госпитальные и внегоспитальные инфекции у человека, представляется актуальной проблемой современной медицины и микробиологии (Nijssen *et al.*, 2005; Rizk *et al.*, 2017; Bagheri-Nesami *et al.*, 2017; Kaushik *et al.*, 2018; Chairat *et al.*, 2019; Dawes *et al.*, 2020; Barraud *et al.*, 2021). Идентификация широко распространенных в составе интегронов генетических каскадов антибиотикорезистентности, а также обнаружение и характеристика новых, не описанных ранее генных каскадов, описание молекулярных механизмов эволюции интегронов, их взаимосвязи с другими МГЭ, открывают дополнительные возможности для оценки современной эпидемиологической ситуации по антибиотикорезистентности популяций бактериальных патогенов, прогнозирования ее развития 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 МЛУ у клинических изолятов (Sabbagh *et al.*, 2021; Sabbagh *et al.*, 2021; Yalda *et al.*, 2021). Изучена структура интегронов, которая включает в себя два консервативных участка (5'-CS и 3'-CS) и переменный участок (генные каскады) (Gillings *et al.*, 2015; Rodulfo *et al.*, 2019). Генные каскады представляют

собой открытую рамку считывания (ORF) с сайтом рекомбинации кассеты *attC*, способны существовать в виде кольцевых молекул ДНК и встраиваться в интегрон путем сайт-специфической рекомбинации, катализируемой интегразой (Collis *et al.*, 2002; Novovic *et al.*, 2019). Интегроны локализованы как в хромосомах бактерий, так и на конъюгативных и мобилизуемых плаزمиде, которые способны к внутри- и межвидовому распространению между бактериями путем горизонтального переноса (Rolland *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2018; Botelho *et al.*, 2019; Barraud *et al.*, 2021). К настоящему времени идентифицировано более 130 видов генных кассет в составе интегронов, кодирующих устойчивость к антимикробным препаратам разных функциональных групп в геномах бактерий, выделенных в разных регионах мира, как в госпитальной, так и во внегоспитальной среде (Gillings *et al.*, 2015; Abella *et al.*, 2015; Xie *et al.*, 2018; Rodulfo *et al.*, 2019; Ghaly *et al.*, 2021). Имеются данные о большом вкладе интегронов в резистомы грамотрицательных бактерий, вызывающих инфекции человека в Австралии (Partridge *et al.*, 2018; Ghaly *et al.*, 2017), Швейцарии (Poirel *et al.*, 2018), США (Almuzara *et al.*, 2017), Испании (Marchisio *et al.*, 2015), Франции (Guérin *et al.*, 2011; Barraud *et al.*, 2021) и Ирана (Moghaddam *et al.*, 2015; Yalda *et al.*, 2021). В Российской Федерации интегроны также описаны как важные генетические детерминанты антибиотикорезистентности у клинически значимых патогенов, в том числе *K. pneumoniae* (Aleksееva *et al.*, 2020; Fursova *et al.*, 2020., Shelenkov, *et al.*, 2020; Самойлова *и др.*, 2022), *A. baumannii* (Shmakova *et al.*, 2019; Mindlin *et al.*, 2021) и *P. aeruginosa* (Astashkin *et al.*, 2019; Savinova *et al.*, 2018; Bocharova *et al.*, 2020).

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-Оболенск», размещение известных и новых генетических кассет в базы данных GenBank и INTEGRALL. Создание базы данных интегронных 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 цефалоспоринызы *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}*.

У 20 % здоровых сотрудников микробиологической лаборатории описано носительство штаммов грамотрицательных бактерий, несущих интегроны класса 1 (36 % изолятов) и класса 2 (7 % изолятов), а также гены 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 интегронных 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 интегронных в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» (зарегистрирована ФИПС №2020621657 от 31.07.2020 г.) – Федеральный уровень внедрения.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» 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 интегров класса 1, цефалоспорины *bla*_{CTX-M-15} и карбапенемаз трех классов: класса А – *bla*_{KPC-2}, класса В – *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).

Результаты исследования представлены на 18 Всероссийских и международных конференциях: VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, 30.03- 01.04.2015 г.); XVII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 20-22.05.2015 г.); Международная научно-практическая конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 25-26.05.2015 г.); 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Сан-Диего, 17-21.09.2015); VIII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 28-30.03.2016 г.) – **диплом 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, 01-03.11.2016 г.); IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (Москва, 18-20.04.2017 г.); Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Московская обл., Пущино, 23-27.04.2018 г.); X Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, Беларусь, 27-28.09.2018 г.); XXI Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиоло-

гии (Москва, 22-24.05.2019 г.); Российско-Китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XXII Кашкинские чтения) (С.-Петербург 12-15.06.2019 г.); V национальный конгресс бактериологов (Москва, 16-17.09.2019 г.); ASM Microbe 2020 (Чикаго, США, 18-22.06.2020 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность 2020» (Москва, 06–08.10.2020 г.); XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 21-22.10.2020 г.); VI Национальный конгресс бактериологов (Казань, 14-16.09.2021 г.); XIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Екатеринбург, 15-17.09.2021 г.) – **диплом победителя II степени** в конкурсе молодых ученых; Научная конференция «Инфекции у пациентов в отделении реанимации. Лечение и профилактика» (Москва, 25.09.2021 г.).

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.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 180 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Результатов и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературных источников, включающего 243 работы отечественных и зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 44 рисунками и 31 таблицей, включает 4 Приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Детекция и идентификация интегронов классов 1 и 2

Клинические штаммы 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 ху-*

losoxidans (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 (n=1016) и других регионов РФ в 2003-2015 гг. (n=232), а также из госпитальной среды (n=37). Анализ чувствительности к антимикробным препаратам показал преобладание штаммов, устойчивых к бета-лактамам, в том числе к пенициллинам (99 % штаммов), цефалоспорином (95 %) и карбапенемам (20 %); а также к аминогликозидам (87 %), хлорамфениколу (74 %) и сульфаниламидам (72 %). Высокий уровень устойчивости изучаемых штаммов к бета-лактамам 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 %). Гены *bla*_{SHV}-типа были выявлены только у *K. pneumoniae*, гены *bla*_{VIM}-типа - только у *P. aeruginosa*, гены *bla*_{OXA} (*bla*_{OXA-40}-, *bla*_{OXA-23}- и *bla*_{OXA-51}- типов) - только у *A. baumannii* (Рис. 1).

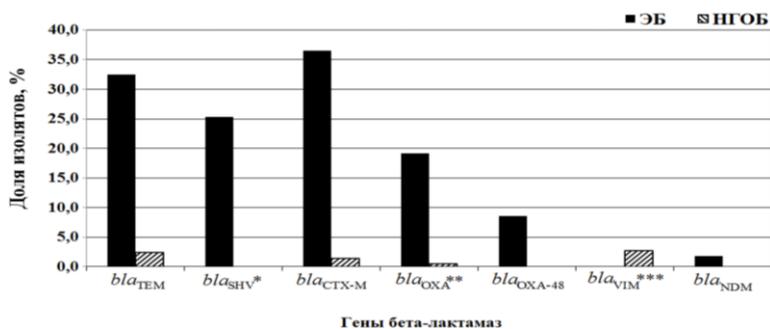


Рисунок 1 – Представленность генов бета-лактамаз в штаммах грамотрицательных бактерий: ЭБ – бактерии порядка *Enterobacteriales*, НГОБ – неферментирующие грамотрицательные бактерии

Выявлены 842 интегрона, в том числе класса 1 - 737 интегрон (59 % изолятов) и класса 2 - 105 интегрон (8 % изолятов). При этом интегроны детектированы в 43 % представителей порядка *Enterobacteriales* и в 25 % штаммов НГОБ (Рис. 2).

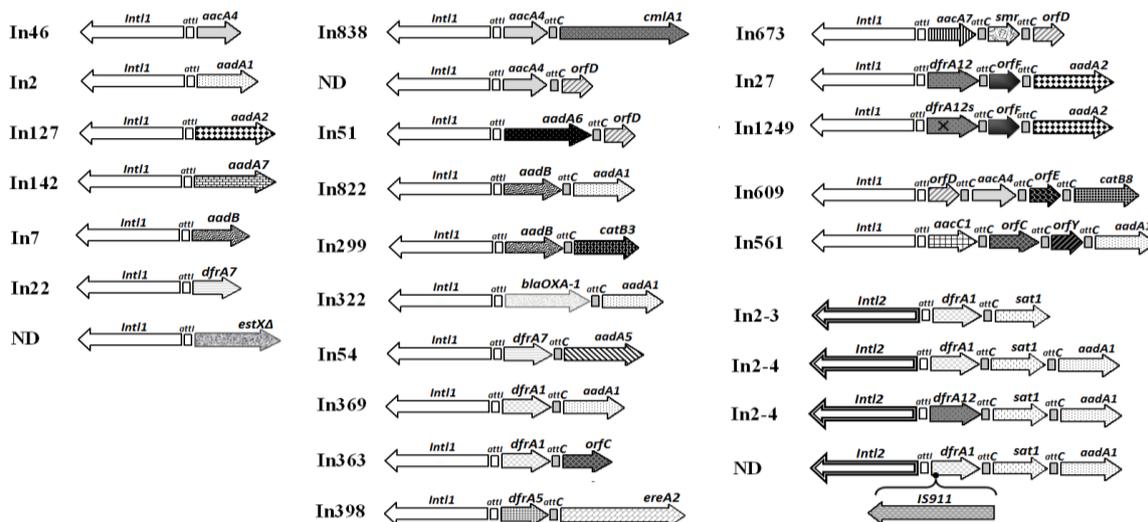
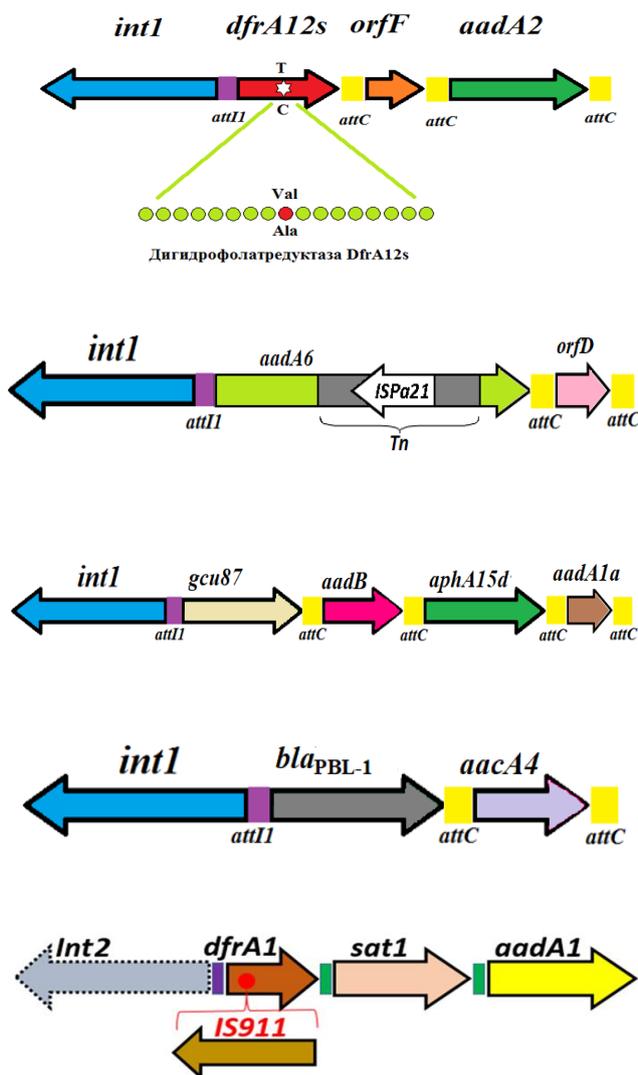


Рисунок 2 – Варианты наборов генных кассет в интегронах классов 1 и 2, детектированные в штаммах изучаемой коллекции

Новые интегронные структуры, выявленные в ходе исследования

В ходе работы были описаны четыре новых интегрона класса 1 и один новый интегрон класса 2:



In1249. В клиническом штамме *E. coli* I-7433, выделенном из мочи пациента в стационаре Москвы в 2014 г. Генная кассета *dfrA12s* является новым аллелем гена, кодирующего дигидрофолат редуктазу, которая обеспечивает устойчивость к триметоприму [КТ316808]

In1379. В клиническом изоляте *P. aeruginosa* t9P1/15, выделенном из трахеи пациента, находящегося на искусственной вентиляции легких в 2015 г., и несущего ген *blaSTX-M-15*. В генную кассету *aadA6* встроился IS элемент ISPa21 [KX870013]

In1360. В штамме *P. aeruginosa* B-1384P/15, выделенном из эндотрахеального аспирата от пациента нейрореанимации 27.07.2015 г. Содержит новую генную кассету *gcu87* с неизвестной функцией [KX218442]

In1375. В штамме *P. aeruginosa* B-2175P/15, выделенном 30.11.2015 г. из мочи пациента.

Содержит новую кассету *blaPBL-1* - ген бета-лактамазы класса А [KY171972]

In2-IS911. В клиническом штамме *Shigella flexneri* Y-5, выделенном во время вспышки дизентерии в Якутске в 2010 г. Генная кассета *dfrA1* разрушена вставкой последовательности IS911 [HM592262]

В ходе исследования подтверждена общепризнанная роль интегров 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 *gcu87*, генная кассета *aphA15d* и генная кассета *blaPBL-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.

Интегроны классов 1 и 2 в резистомах нозокомиальных патогенов, выделенных от пациентов нейрореанимации

В ходе исследований по оценке эпидемиологической ситуации с целью выявления носительства бактерий и генетических детерминант резистентности у пациентов НМИЦН имени академика Н.Н. Бурденко в г. Москве 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, относящихся к 26 видам бактерий порядка Enterobacterales и НГОб (Табл.1).

Таблица 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

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 интегровов класса 1 увеличилась с 83 % в 2015 г. до 92 % в 2019 г. (Рис. 3).

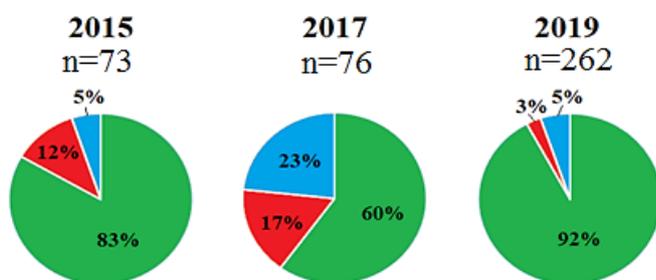


Рисунок 3 – Динамика представленности интегровов классов 1 и 2 в изолятах ГОБ, выделенных в 2015 г., 2017 г. и 2019 г. Зеленый цвет – интегроны класса 1, красный – интегроны класса 2, голубой – интегроны классов 1 и 2 в одном изоляте

Представленность интегровов в клинических изолятах бактерий *K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, входящих в группу ESKAPE-патогенов отличалась в разные периоды времени (Рис. 4).

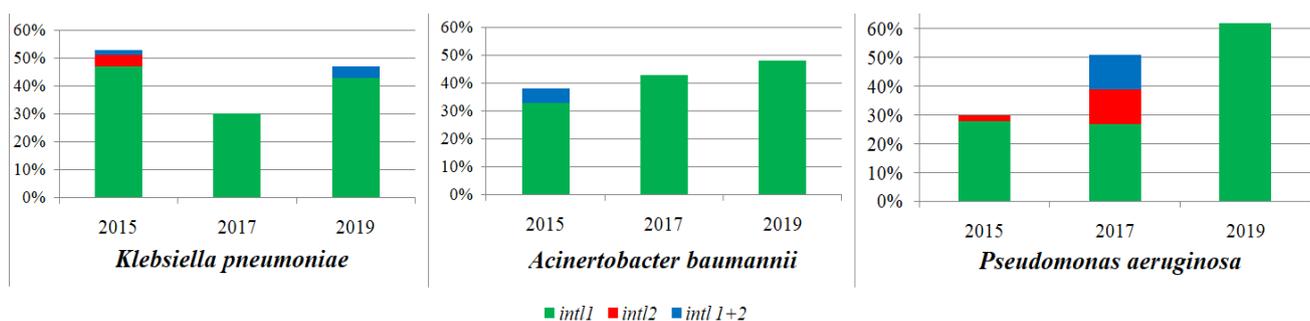
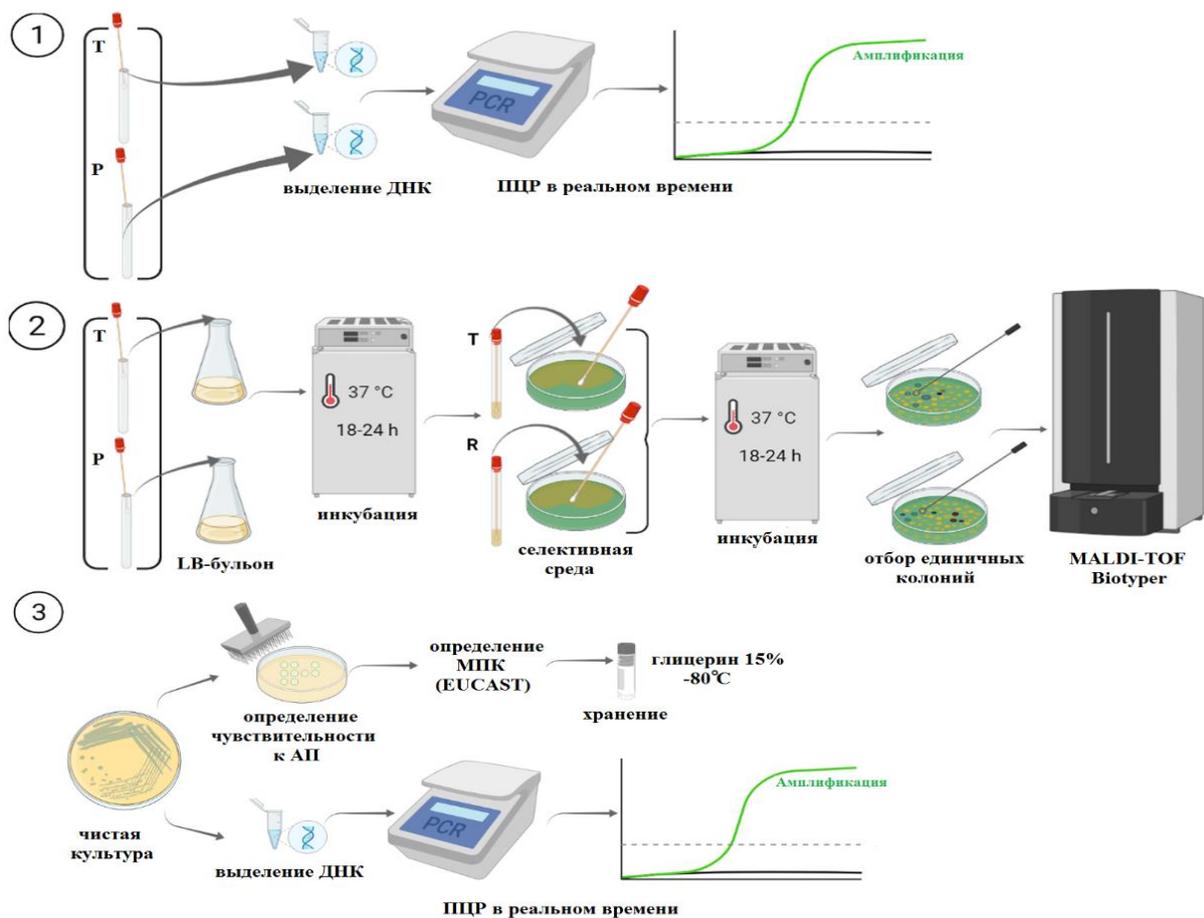


Рисунок 4 – Представленность интегровов классов 1 и 2 в изолятах *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*, выявленная в ходе одномоментных обследований в 2015, 2017 и 2019 гг.

Носительство генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2019 г.

Целью данного раздела исследования было изучение носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации г. Москвы в период с октября по ноябрь 2019 г. (Рис. 5).



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

Рисунок 5 – Дизайн эксперимента по изучению носительства генетических детерминант антибиотикорезистентности и потенциальных грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций

В ходе исследования были обследованы 60 пациентов, возрастная медиана составила 53,8 года (от 14 до 73 лет), гендерное соотношение мужчины/женщины - 1,07 (31/29). Уровень летальности составил 10 %. У 50 % пациентов были отмечены госпитальные инфекции, в том числе - симптомы кишечной дисфункции (n=13) и симптомы инфекции дыхательной системы (n=21), оба симптома - у 4 пациентов. Из образцов клинического материала (трахеальных и ректальных мазков) выделяли тотальную ДНК, которую использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР в реальном времени для выявления генетических детерминант антибиотикорезистентности. Всего проанализировано 293 клинических образца, включая 146 ректальных мазков (Р) и 147 трахеальных мазков (Т). В 119 образцах ДНК 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 (Рис. 6).

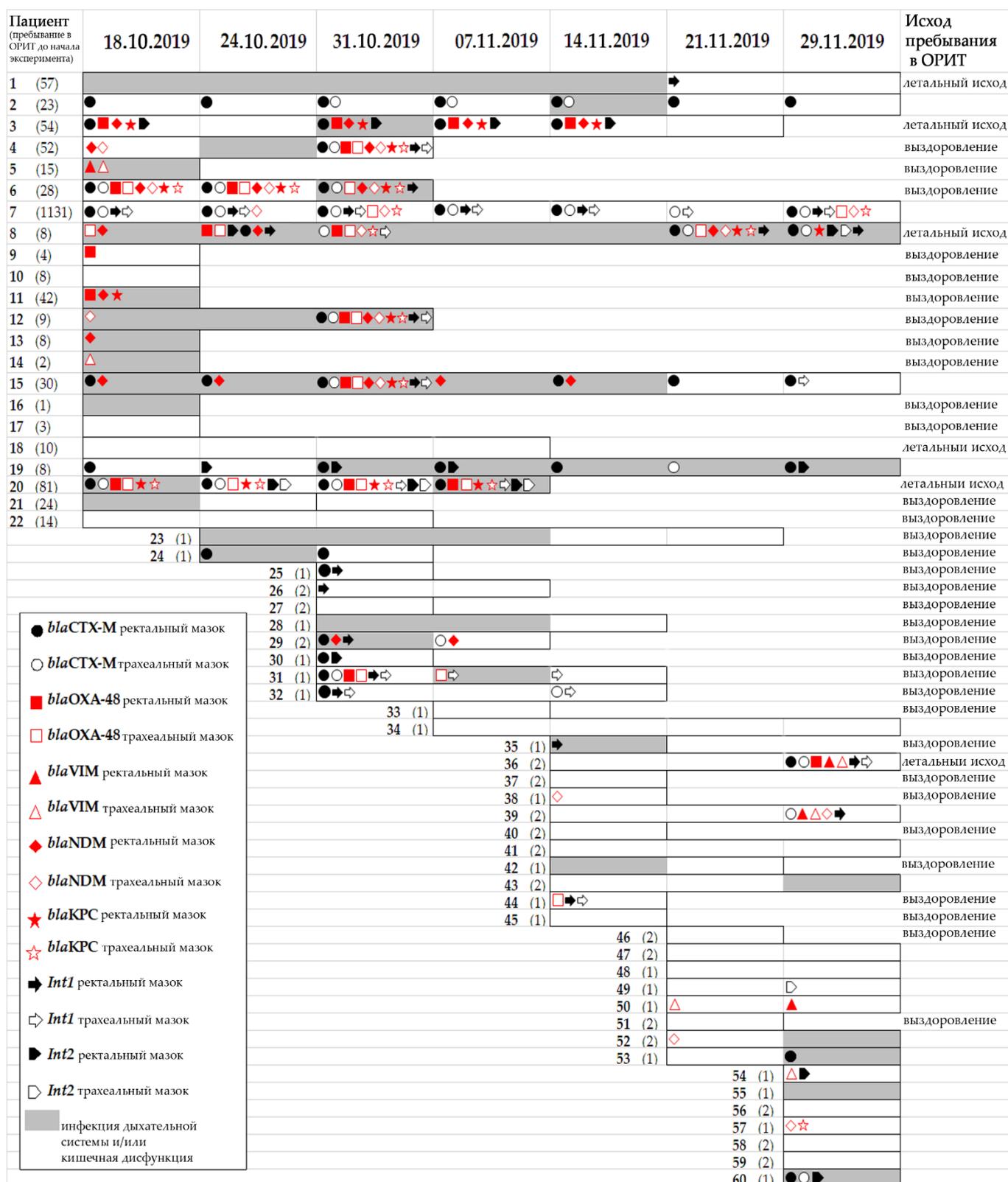


Рисунок 6 – Динамика обнаружения генов интегронов и бета-лактамаз в ректальных и трахеальных клинических образцах, полученных от пациентов нейрореанимации в октябре-ноябре 2019 г.

У большинства пациентов выявлены гены бета-лактамаз *bla*TEM-(n=47) и *bla*SHV-(n=19) типов, гены цефалоспориноз *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. (Рис. 7).

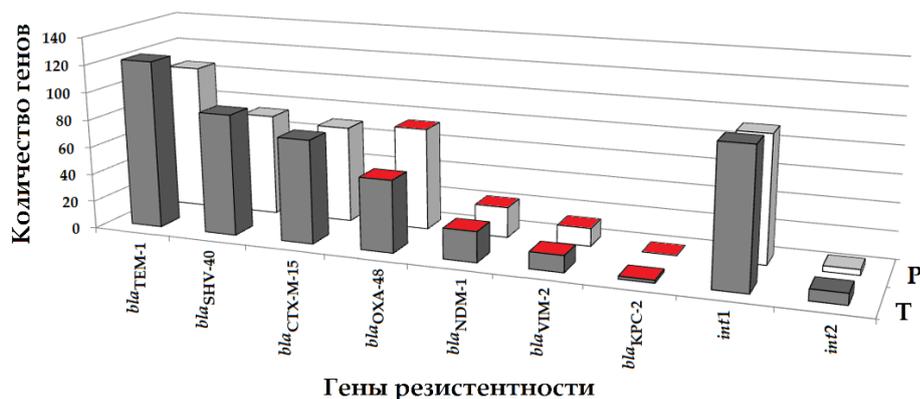


Рисунок 7 – Представленность генов антибиотикорезистентности (n = 419) в клинических образцах трахеальных и ректальных мазков Р – ректальный мазок, Т – трахеальный мазок, красным – гены карбапенемаз

Всего от пациентов было получено 344 грамотрицательных бактериальных изолята, в том числе 183 - выделенных из ректальных мазков (Р) и 161 изолят - из трахеальных мазков (Т) (Рис. 8).

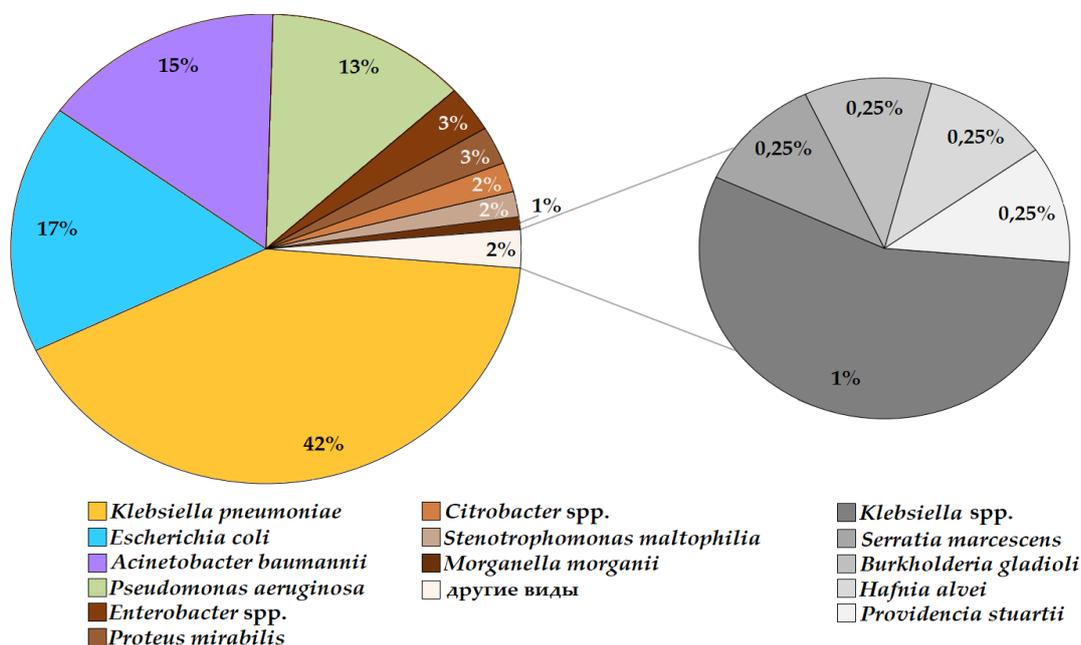


Рисунок 8 – Видовой состав грамотрицательных бактерий (n = 344), выделенных от пациентов нейро-реанимации в 2019 г.

Большинство изолятов (n=311, 95 %) были устойчивы к бета-лактамам, 169 (52 %) - к аминогликозидам, 155 (47 %) - к фторхинолонам, 154 (47 %) - к хлорамфениколу, 26 (34 %) - к тетрациклинам, 5 (2 %) - к сульфаниламидам. По критериям Magiorakos *et al.*, 2012, 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). Высокий уровень МЛУ фенотипов ассоциирован с большим количеством выявленных в бактериальных изолятах детерминант резистентности. Всего в изолятах было обнаружено 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, в изолятах были детектированы 262 интегрона, в том числе интегроны класса 1 (n=248)

и класса 2 (n=14). Носительство ГОБ, потенциальных возбудителей внутрибольничных инфекций, выявленное у 78 % госпитализированных пациентов, может быть расценено как скрытый резервуар патогенов и генов антибиотикорезистентности. Особую опасность в этом плане представляют генетические детерминанты, обеспечивающие устойчивость патогенов к бета-лактамам, в том числе, выявленные гены карбапенемаз *bla*_{NDM-1}-, *bla*_{OXA-48}-, *bla*_{KPC-2} – типов и 72 % интегროнов классов 1 и 2.

Изучение уникального резистома *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-48}+*bla*_{KPC}+*bla*_{NDM}+*intI1* в изолятах *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39, капсульного типа K23

Сложный резистом, включающий гены четырех бета-лактамаз *bla*_{CTX-M}+*bla*_{OXA-48}+*bla*_{KPC}+*bla*_{NDM} и двух интегროнов класса 1, не описанный ранее, идентифицирован в 4 изолятах *K. pneumoniae*, выделенных от 4 пациентов (а именно, 3, 11, 12 и 20) из ректальных и трахеальных мазков. В хромосомах изучаемых изолятов выявлены 6 инсерций IS-подобных элементов, 1 инверсия в области профага, а также от 2 до 8 SNP, что может свидетельствовать о продолжающейся микроэволюции *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39 капсульного типа K23. В их геномах идентифицированы три разных набора плазмид (Рис. 9).

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)							
12РКР/19с (В-8919)							
20РКр/19с (В-8922)							
3ТКР/19g (В-8923)							

БЛ – бета-лактамазы, Inc – группа несовместимости плазмид

Рисунок 9 – Наборы плазмид в изолятах *K. pneumoniae* 11РКР/19а (В-8912), 12РКР/19с (В-8919), 20РКр/19с (В-8922) и 3ТКР/19g (В-8923)

Плазмиды группы несовместимости IncHI1B несут эпидемически значимые гены антибиотикорезистентности: бета-лактамаз *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*, определяющих устойчивость к аминогликозидам. В гене интегразы выявлена делеция, не затрагивающая область промотора генной кассеты (Рис. 10).

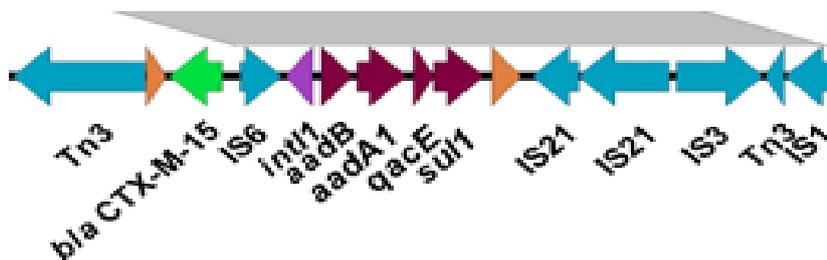


Рисунок 10 – Интегрон In822 в составе транспозона Tn3 на плазмиде pB-8919_OXA-48 [CP094992]. Стрелками показаны открытые рамки считывания (orf), их протяженность и ориентация.

Плазмиды группы несовместимости IncC (*bla*_{NDM-1}) несут эпидемически значимые гены БЛ *bla*_{OXA-1} и *bla*_{OXA-10}, карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и двух интегров класса 1: ND (*arr3-cmlA5-bla*_{OXA-10}-*aadA1*) и In 27 (*dfrA12-orfF-aadA1*) (Рис. 11).

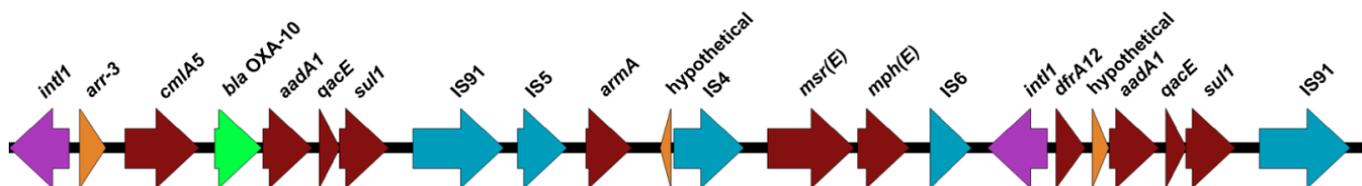


Рисунок 11 – Интегроны класса 1 на плазмиде pB-8919_OXA-1 [CP094993]. Стрелками показаны открытые рамки считывания (orf), их протяженность и ориентация.

Плазмида группы несовместимости IncC (*bla*_{CTX-M-55}) идентифицирована в одном изоляте 20PKp/19c (B-8922) плазмиды несет ген цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M 55}.

Плазмиды группы несовместимости IncFIB(pQil) в четырех изолятах были идентичны, несли ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2} в составе транспозона Tn4401.

Плазмиды гибридной группы несовместимости IncFIB(K)/IncFII(K) детектированы в трех исследуемых геномах. На них локализованы опероны, определяющие устойчивость к тяжелым металлам *ars*ABC_{DR}, *pco*ABC_{DRS} и *sil*ABC_{EFGPRS}.

Низкомолекулярные плазмиды pColRNAI, описанные в геномах всех четырех изолятов *K. pneumoniae*, были полностью идентичны, несли гены, кодирующие колицин, клоацин и токсин-антитоксиновую систему RelE/ParE.

Низкомолекулярные плазмиды pUN1 определены в геномах всех четырех изолятов, несли гены, обеспечивающие конъюгативную мобилизацию.

Таким образом, описание нового уникального резистома, включающего в себя гены трех карбапенемаз, цефалоспоринызы и интегров класса 1, указывает на продолжение эволюции мультирезистентных возбудителей госпитальных инфекций, что представляет интерес для клинической микробиологии и эпидемиологии.

Резистомы грамотрицательных бактерий, выделенных от здоровых людей

Цель данного раздела исследования – изучение носительства генов антибиотико-резистентности грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей нозокомиальных инфекций, у сотрудников микробиологической лаборатории, на основании одобрения Межвузовского комитета по этике Московского государственного медикостоматологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ № 11-18 от 20.12.2018 г. В исследовании приняли участие 30 человек, от которых получено по одному мазку из зева, из десневого кармана и образцу фекалий. Всего собрано 79 клинических образцов, из которых выделены 353 клинических изолятов бактерий, в том числе грамотрицательных бактерий (n=246), грамположительных бактерий (n=101) и грибов (n=6). 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 ГОБ (Рис. 12).

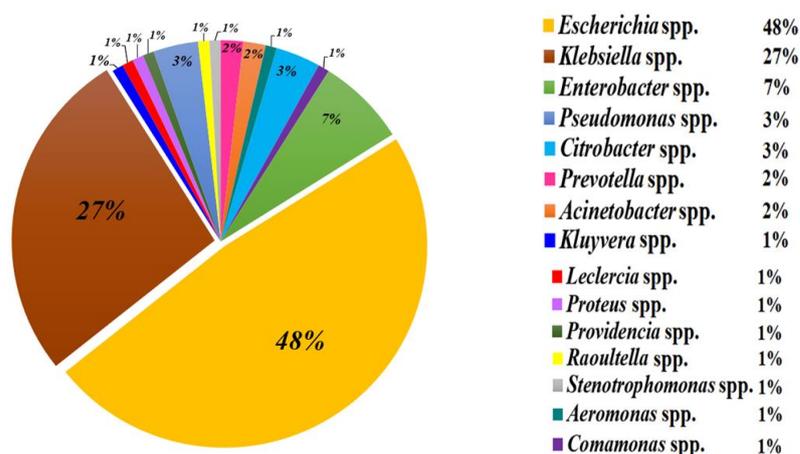


Рисунок 12 – Представленность грамотрицательных бактерий, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории из клинических образцов фекалий (n=84), мазков из зева (n=16) и мазков из десневого кармана (n=7)

Анализ чувствительности к антимикробным препаратам показал преобладание изолятов (79 %), устойчивых к бета-лактамам, в том числе к пенициллинам (72 %), цефалоспорином (17 %) и карбапенемам (11 %); к фторхинолонам (24 %), сульфаниламидам (13 %), аминогликозидам (11 %), тетрациклинам (12 %) и фосфомицину (9 %). Фенотип МЛУ был выявлен у 20 % изолятов, генотипы которых характеризовались наличием генов бета-лактамаз и интегров (Рис. 13).

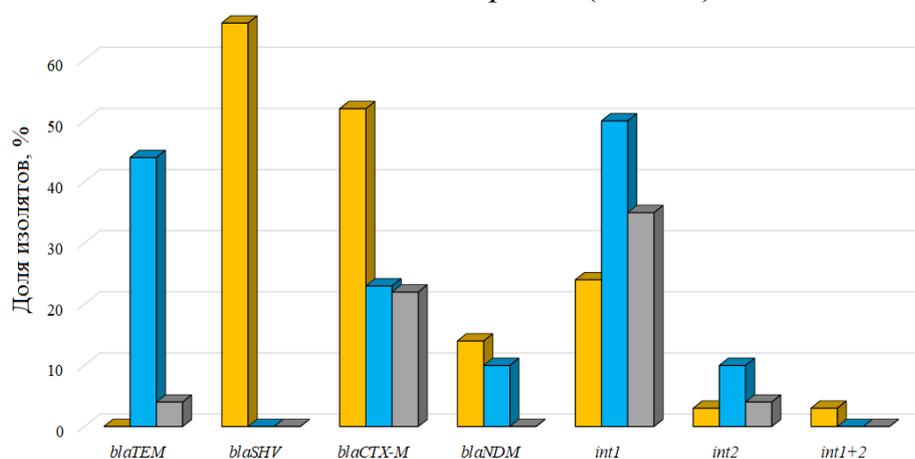


Рисунок 13 – Представленность генов бета-лактамаз и интегров в резистомах изолятов *K. pneumoniae* (желтый цвет), *E. coli* (голубой цвет) и других ГОБ (серый цвет), выделенных от здоровых людей

Структура интегров классов 1 и 2, идентифицированных в геномах ГОБ

В ходе исследования идентифицированы 4 набора генных кассет в интегронах класса 1 и один набор генных кассет – в интегронах класса 2 (Рис. 14).

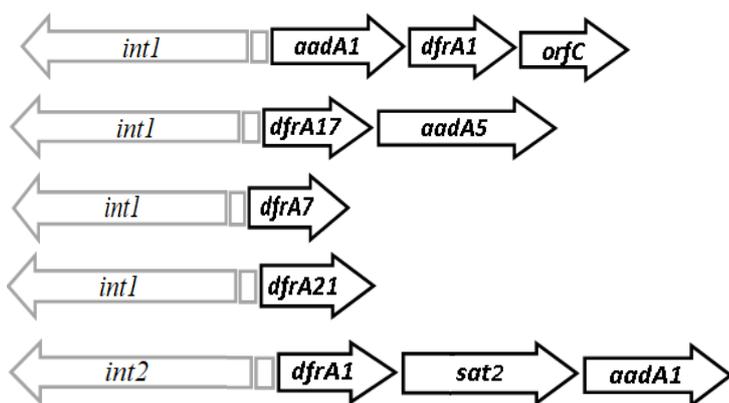


Рисунок 14 - Представленность наборов генных кассет в изолятах ГОБ, выделенных от сотрудников микробиологической лаборатории: набор генных кассет *dfrA17-aadA5* выявлен у 15 чел.; набор *aadA1-dfrA1-orfC* - у 6 чел.; набор *dfrA1-sat2-aadA* - у 7 чел.; набор *dfrA7* - у 1 чел.; набор *dfrA21* - у 1 чел.

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

Из клинических образцов трех участников эксперимента были выделены 3 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 hvKp: гена *tmpA*, ассоциированного с гипермукоидностью, оперона *iro*, детерминирующего рецептор синтеза сидерофора сальмохелина, гена *kfu*, кодирующего транспортер поглощения железа, и генов оперона *all*, обеспечивающего способность метаболизировать аллантоин. Размеры полных геномов варьировали от 5,55 до 5,56 Мб, 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.

Таким образом, впервые задокументировано носительство гипервирулентных *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 капсульного типа K1 у здоровых людей в России. Полученные данные показывают важность мониторинга hvKp, поскольку ранее сообщалось, что колонизация людей штаммами hvKp связана с заболеваемостью абсцессами печени в Южной Корее и США (Chung, 2012; Hartantyo, 2020; Karlsson, 2019) и с тяжелыми инфекциями в Европе (Lepuschitz, 2020).

Заключение

Клинические штаммы, выделенные в лечебных учреждениях г. Москвы в 2013 - 2015 гг., характеризовались множественной лекарственной устойчивостью, в них были идентифицированы 842 интегрона. Интегроны классов 1 присутствовали в геномах 31 % изолятов, интегроны класса 2 – в геномах 13 % изолятов, выделенных от пациентов и из госпитальной среды. В ходе исследования выявлено 22 варианта наборов генных кассет в интегронах 1 класса и 4 варианта – в интегронах 2 класса. Наиболее распространенными были 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* интегროнов класса 1 и один набор генных кассет *dfrA1-sat2-aadA1* интегროнов класса 2. В базе данных GenBank наиболее представленными были интегроны классов 1: *aadB*; *aadB-aadA1y*; *bla_{ОХА30}-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*.

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

В данной работе идентифицированы новые интегроны: четыре интегрона класса 1: In1249, In1379, In1360 и In1375 и интегрон класса 2 In2-IS911, в которых описаны новые модификации генных кассет *dfrA12s* и *dfrA1-IS911*, генная кассета *aadA6* с ISPa21e элементом, генная кассета *gsu87*, генная кассета *aphA15d* и генная кассета *bla_{РВL-1}*, кодирующая не описанную ранее бета-лактамазу класса А.

Доля клинических изолятов, выделенных от пациентов нейрореанимации в 2019 г., несущих интегроны классов 1 и 2, составила 63 %. Большая часть (72 %) интегროнов были локализованы в изолятах грамотрицательных представителей группы ESKAPE (*K. pneumoniae*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*). Носительство генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных патогенов было выявлено у 78 % пациентов. Показано, что значительная часть интегროнов локализуется на конъюгативных плазмидах, несущих также другие детерминанты антибиотикорезистентности, в том числе гены карбапенемаз классов А (*bla_{КРС-2}*), В (*bla_{VIM-2}* и *bla_{NDM-1}*) и D (*bla_{ОХА-48}*). Изучены геномы четырех изолятов *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST39, капсульного типа K23 с уникальным резистомом *bla_{СТХ-М-15}+bla_{ОХА-48}+bla_{КРС-2}+bla_{NDM-1}+intl1*, показана высокая степень гомологии их хромосом, но при этом - наличие структурных различий и набора однонуклеотидных полиморфизмов, что может свидетельствовать о продолжающейся микроэволюции данной генетической линии клебсиелл. Описаны три варианта наборов плазмид у этих изолятов. На плазмидах группы несовместимости IncHI1B (~328 т.п.н.) локализованы гены бета-дактамаз *bla_{ОХА-1}* и *bla_{ТЕМ-1}*, карбапенемазы *bla_{ОХА-48}* и цефалоспорины *bla_{СТХ-М-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 бета-дактамаз *bla*_{ОХА-1} и *bla*_{ОХА-10}, карбапенемазы *bla*_{NDM-1} и двух интегронов класса 1 с наборами генных кассет *arr3-cmlA5-bla*_{ОХА-10}-*aadA1* и *dfrA12-orfF-aadA1*. Плазида группы несовместимости IncC (~170 т.п.н.) в одном изоляте содержала ген цефалоспоринызы *bla*_{СТХ-М-55}. В составе плазмид группы несовместимости IncFIB(pQil) (~102 т.п.н.) идентифицирован ген карбапенемазы *bla*_{КРС-2}.

Изучено носительство генов антибиотикорезистентности и грамотрицательных бактерий, потенциальных возбудителей инфекций у здоровых людей. 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 цефалоспоринызы СТХ-М-15 и карбапенемазы NDM-1. Это подтверждает тенденцию, отмеченную исследователями во всем мире, о том, что множественная лекарственная устойчивость, присущая ранее только патогенам из госпитальной среды и ассоциированным с оказанием медицинской помощи, вышла за пределы лечебных учреждений. Разработан лабораторный образец мультиплексной ПЦР тест-системы в реальном времени для детекции интегронных структур, позволяющий изучать механизмы формирования фенотипов множественной антибиотикорезистентности.

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 интегронов, в геномах бактерий идентифицированы гены бета-лактамаз *bla*_{ОХА} (41 %), *bla*_{СТХ-М} (38 %), *bla*_{ТЕМ} (35 %), *bla*_{SHV} (25 %), *bla*_{VIM} (3 %), *bla*_{NDM} (2 %) и *bla*_{КРС-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 плаزمидах 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 интегронных бактерий 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 интегронных структур 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 изолятов грамотрицательных бактерий, электронный каталог и база данных «Разнообразие интегронов в клинических штаммах грамотрицательных бактерий» могут быть использованы для анализа фенотипических и генетических характеристик изолятов, выделяемых на территории Российской Федерации.

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

3. Лабораторный образец мультиплексной ПЦР тест-системы может быть использован для детекции интегронных структур в геномах грамотрицательных бактерий.

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» на образовательной платформе ФБУН ГНЦ ПМБ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

1. 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. Microb. Antimicrob.-2015.-V.14, N1.-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. – Vol. 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. – Vol. 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 Integrons 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. – Vol. 11, N 7. – P. 886. Scopus, SJR=0,785. Цит. 0.

Б. Зарегистрированные базы данных

1. **Кузина, Е.С.** База данных интегронов 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. Основные 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. VII Ежегод. Всерос. конгр. инф. бол. 2015. - С. 193.

2. 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.

3. **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. Мат. VIII ежегодн. Всерос. конгресса по инф. болезням с международ. участием 2016, Москва, 28-30 марта 2016 г. – с.162-163.

4. 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 сб. трудов конф. – «Мол. диагностика - 2017» Москва, 18-20 апреля 2017. С. 220-222.

5. **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. 22 Международ. Пущинская школа–конф. молод. учен. «Биология – наука XXI века», Пущино, 23-27 апреля 2018 г. – с.298-299.

6. **Леонова, Е.С.** Разработка тест-системы для определения уровня экспрессии генов устойчивости у грамотрицательных бактерий / Е.С. Леонова, М.В. Фурсов, Н.К. Фурсова. Сб. трудов конф. – «Мол. Диагностика - 2018», Москва, 27-28 сентября 2018 г. – с. 66.

7. **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. XXII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 11-13 июня 2019 г. – с. 89.

8. **Кузина, Е.С.** Детекция бессимптомного носительства грамотрицательных бактерий у сотрудников микробиологической лаборатории / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, К.В. Дегушев, Е.Н. Николаева, Е.В. Ипполитов, В.Н. Царёв, Н.К. Фурсова. V Нац. конг. бактериол. Москва, 16–17 сентября 2019 – с. 47.

9. **Кузина, Е.С.** Носительство грамотрицательных бактерий и генов антибиотикорезистентности у сотрудников микробиологической лаборатории / Е.С. Кузина, Т.С. Новикова, Н.К. Фурсова. «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2020». 6–8 октября 2020 г. – с.53.

10. **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. Мат. конф. XII Всерос. научно-практ. конф. Молод. ученых и спец. Роспотребнадзора. 21-22 октября 2020 г. – с.352-354.

11. **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. Сб. трудов VI Нац. конгр. бактериологов. 13–15 сентября 2021 г. – с.44.

12. **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. Мат. конф. XII Всерос. научно-практ. конф. молод. уч. и спец. Роспотребнадзора. 15-17 сентября 2021 г. – с.276-277.

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