

На правах рукописи

Слукин Павел Владимирович

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
УРОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Специальность: 1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2023

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.

Научный руководитель:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, 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:

Кафтырева Лидия Алексеевна, доктор медицинских наук, 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 кишечных инфекций, ведущий научный сотрудник, г. Санкт-Петербург

Сухорукова Марина Витальевна, кандидат медицинских наук, Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория микробиологии и антимикробной терапии, заведующая лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства Российской Федерации

Защита диссертации состоится **«08» декабря 2023 г.** в 11-00 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 «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета 64.1.002.01

кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Бактерии вида *Escherichia coli* могут быть как представителями нормальной кишечной микрофлоры, так и возбудителями кишечных, септических, респираторных, урологических и др. заболеваний (Ali et al., 2019; Sarowska et al., 2019). Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относятся к числу самых распространенных инфекций в мире: не менее 150 млн. случаев заболеваний в год во всем мире, из которых на долю *E. coli* приходится порядка 50-70 % (Paskeh et al., 2020; Zavala-Cerna et al., 2020; Javed et al., 2021).

Разнообразие штаммов *E. coli*, возбудителей ИМВП или уропатогенных *E. coli* (UPEC), приводит к необходимости их внутривидового типирования по биохимическим, серологическим и биологическим особенностям, а также по наличию генетических маркеров. Наиболее информативными методами типирования считаются внутривидовое типирование по специфичным генам синтеза O-антигенов, филогенетический анализ по Clermont и мультилокусное сиквенс-типирование (Manges et al., 2015). В Российской Федерации описаны штаммы UPEC серогрупп O1, O2, O6, O7, O8, O16, O25 и O75; филогенетических групп по Clermont A, B1, B2, D, E и F; и сиквенс-типов ST10, ST12, ST38, ST46, ST80, ST101, ST117, ST127, ST131, ST155, ST167, ST372, ST405, ST420, ST453, ST636, ST648, ST1664 и ST4109 (Казанцев и др., 2018; Кузнецова и др., 2018; Макарова и др., 2019). Наиболее распространенной генетической группой UPEC в мире считается O25-B2-ST131, впервые зафиксированная в 2008 г. и выделенная во многих странах (Riley et al., 2014; Ali et al., 2019; Hojabri et al., 2019). Широко встречаются в мире также другие группы UPEC: D-ST405, A-CC10, O6-B2-ST73, O75-B2-CC14, O15-D-ST393 и др. (Riley et al., 2014; Manges et al., 2015).

Среди штаммов UPEC широко распространена устойчивость к антимикробным препаратам (АМП): пенициллинам, сульфаниламидам, фторхинолонам, цефалоспорином и аминогликозидам. При этом высока доля мультирезистентных штаммов (MDR), устойчивых к АМП трех и более функциональных групп (Ny et al., 2019; Rafalskiy et al., 2020). Фенотип MDR ассоциирован с наличием генетических детерминант, определяющих устойчивость к бета-лактамам (*bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{TEM}* и др.), аминогликозидам (*aac*, *aad*, *ant*, *aph* и др.), сульфаниламидам (*dfr*, *sul* и др.) и другим препаратам, а также наличием интегронов (*intl1* и *intl2*) и эффлюксных насосов (*mdfA*, *qacE* и др.) (Wu et al., 2019; Naziri et al., 2020; Sun et al., 2020). Кроме того, очень часто MDR штаммы обладают резистентностью к дезинфицирующим препаратам: четвертичным аммониевым соединениям и тяжелым металлам (Henly et al., 2019).

Штаммы UPEC обладают большим числом факторов вирулентности: адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма (Sarowska et al., 2019; Naziri et al., 2020). Идентификация факторов

вирулентности позволяет оценить патогенные свойства штаммов, их клиническую и эпидемиологическую значимость (Nüesch-Inderbilen et al., 2017; Sarowska et al., 2019). Биологические особенности штаммов UPEC характеризует способность вызывать патологический процесс в модельных организмах. Особый интерес представляют эксперименты на личинках большой восковой моли *Galleria mellonella* (Barber et al., 2016), которые, несмотря на таксономическую удаленность от млекопитающих, имеют высокую степень сходства иммунной системы с иммунной системой млекопитающих, что позволяет использовать личинок большой восковой моли для скрининговой оценки вирулентности штаммов UPEC (Tsai et al., 2016).

Для коррекции функциональных нарушений и улучшения качества жизни пациентов с урологическими заболеваниями в современной медицине используется большое количество имплантатов: катетеров, стентов, сфинктеров и др. (Barros et al., 2017). Использование имплантатов, а также урологические заболевания с образованием конкрементов (мочекаменная болезнь), ассоциированы с формированием биопленок. Бактерии в биопленках обладают особым фенотипом, характеризующимся невосприимчивостью к факторам иммунной системы макроорганизма и повышенной устойчивостью к воздействию АМП (Кузнецова и др., 2019). Рост устойчивости к АМП и распространенность биопленочных форм патогенов привели к необходимости использования альтернативных и вспомогательных antimicrobial материалов (Brüssow et al., 2017).

Степень разработанности темы исследования. Широкая распространенность ИМВП, вызванных *E. coli*, подтверждается значительным количеством научных публикаций во всех регионах мира, которые посвящены различным аспектам, связанным с UPEC: особенностям эпидемиологии, распространения и передачи возбудителя, резистентности к АМП и обуславливающих ее детерминант (Палагин и др., 2019; Ny et al., 2019), определению вирулентности отдельных штаммов, в том числе на биологических моделях (Alghoribi et al., 2014; Gao et al., 2017), выявлению генетических детерминант вирулентности (Казанцев и др., 2019; Naziri et al., 2020), идентификации генетических групп (Manges et al., 2015; Ali et al., 2019; Hojabri et al., 2019), оценке степени биопленкообразования (Shan et al., 2017; Кузнецова и др., 2019) и других. Большое количество публикаций посвящено неклассическим методам профилактики и терапии ИМВП (Ширяев и др., 2019).

Для противодействия образованию биопленок во множестве работ описаны различные варианты модификации поверхности имплантатов, в том числе с помощью antimicrobial препаратов и наночастиц, в ряде работ описано тестирование таких имплантов на штаммах UPEC (Cloutier et al., 2015; Brüssow et al., 2017).

В Российской Федерации описаны спектры и уровни резистентности к антибактериальным препаратам у штаммов UPEC в различных медицинских учреждениях и регионах (Летифов и др., 2019; Палагин и др., 2019). В отдельных

работах показана принадлежность штаммов UPEC к определенным сиквенс-типам, серо- и филогруппам, а также идентифицированы генетические детерминанты вирулентности (Казанцев и др., 2018; Макарова и др., 2019).

Цель исследования

Изучение фенотипических и молекулярно-генетических особенностей штаммов уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от людей с инфекциями мочевыводящих путей.

Задачи исследования

1. Создать коллекцию штаммов *Escherichia coli*, выделенных от людей с инфекциями мочевыводящих путей, и изучить их фенотипические особенности.

2. Провести генетическое типирование штаммов *E. coli* по генам, ассоциированным с серологическими O-группами, филогенетическими группами и сиквенс-типами.

3. Исследовать выделенные штаммы *E. coli* на наличие у них генетических детерминант вирулентности; оценить вирулентность штаммов на модели личинок *Galleria mellonella*.

4. Идентифицировать у штаммов *E. coli* генетические детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам.

5. Осуществить полногеномное секвенирование штаммов *E. coli*, проанализировать их геномы.

Научная новизна исследования. Установлено, что среди 303 штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России в 2005-2020 гг., значительная часть (n=136, 45 %) принадлежала к широко распространенным в мире группам UPEC O25-B2-ST131, O75-B2-CC14, A-CC10, D-ST69, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, O2/O6-B2-ST73, D-ST405, O86-D-ST501, B1-ST58 и O89-A-ST744.

Выявлена высокая генетическая гетерогенность штаммов UPEC: определены 19 серогрупп, 25 сиквенс-типов и 21 генетические группы. Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа *E. coli*: ST9239, ST10102 и ST12358, характеризующихся новыми аллельными профилями генов «домашнего хозяйства» по схеме Ahtman (*adk6, fumC19, gyrB33, icd26, mdh11, purA8, recA341; adk13, fumC44, gyrB9, icd22, mdh579, purA30, recA34; и adk10, fumC11, gyrB4, icd8, mdh1153, purA13, recA2*, соответственно).

Впервые штаммы UPEC отнесены к сиквенс-типам ST165, ST1140, ST1858, ST9239, ST10102 и ST12358; а также генетическим группам O4-F-ST12, O6-B2-ST1858, O8-B1-ST9239, O8-B1-ST297, O9-A-ST46, O11-F-ST457, O15-E-ST38, O17-E-ST69, O18-B2-ST14, O91-B1-ST1196 и O134-B2-ST569.

Показано, что 20 % штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими инфекциями, одновременно являлись мультирезистентными к антибиотикам (бета-лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам) и устойчивыми к препаратам антисептиков/дезинфектантов (триклозану и бензалконию хлориду).

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные в ходе исследования результаты расширяют представления об этиологической структуре ИМВП, вызванных *E. coli*.

Созданы: коллекция штаммов *E. coli* (n=303), выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в Российской Федерации в 2005-2020 гг., электронный каталог и три Базы данных: «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (Свидетельство RU2017621413 от 01.12.2017 г.), «Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.» (Свидетельство № 2021621432 от 01.07.2021 г.) и «CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности» (Свидетельство № 2021621482 от 07.07.2021 г.), которые могут быть использованы другими исследователями в РФ – Федеральный уровень внедрения.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 62 штамма UPEC, охарактеризованных по O-групповой принадлежности, вирулентности, антибиотикорезистентности и биопленкообразованию (Справки о депонировании №№ 57-60 от 18.05.2018; №№ 181-184 от 15.11.2018; №№ 60-74 от 28.05.2019; №№ 94-100 от 09.09.2019; №№ 66-82 от 11.02.2020; №№ 107-121 от 04.03.2020) – Федеральный уровень внедрения.

В Базу данных GenBank размещены 28 нуклеотидных последовательностей генов вирулентности, антибиотикорезистентности и O-серогрупповой принадлежности, а также 54 полных генома штаммов UPEC; в Базу данных MLST Уорикского университета - информация о 21 штамме *E. coli*, принадлежащих к 16 сиквенс-типам – Международный уровень внедрения.

Разработаны Методические рекомендации «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*» (Рассмотрены и одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ, протокол № 4 от 10.09.2020) – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению темы исследования с использованием широкого спектра методов: формально-логических, микробиологических, биохимических, биофизических, молекулярно-генетических, биоинформатических, биологических и статистических.

Изоляты бактерий. Клинические изоляты *E. coli* (n=303) выделены из образцов мочи пациентов Первого МГМУ им. И.М. Сеченова в 2005-2007 гг. (n=50), ФГБУ НЦАГИП им. академика В.И. Кулакова в 2015-2019 гг. (n=50), ГБУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница № 1» в 2016-2017 гг. (n=20), НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина в 2016-2019 гг. (n=161), а также пациентов других лечебных учреждений РФ в 2017-2020 гг. (n=22). Каждый выделенный изолят нашей коллекции,

как установлено в дальнейшем, обладает уникальным набором морфологических, биохимических и генетических характеристик, что позволяет каждый из выделенных изолятов считать отдельным штаммом.

Микробиологические методы. Культивирование микроорганизмов проводили на твердых и в жидких питательных средах. Видовую идентификацию осуществляли с помощью высева на дифференциально-диагностические питательные среды с последующим подтверждением видовой принадлежности на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Стандартными микробиологическими методами оценивали морфологию колоний (Поздеев, 2010), гипермукоидность (Shon et al., 2013), подвижность и колициногенность (МУ 04-723/3), гемолитическую активность (Кузнецова и др., 2018), биопленкообразование (O'Toole, 2011) и образование курли-волокон (Vokranz et al., 2005). Чувствительность к АМП планктонных культур определяли методом микроразведений в жидкой питательной среде (МУ 04-723/3), чувствительность к АМП биопленочных культур определяли согласно авторской методике (Слукин и др., 2014). Интерпретацию результатов чувствительности к АМП проводили в соответствии с рекомендациями EUCAST Breakpoint tables v 11.0 (URL: <http://www.eucast.org>) и публикации Morrissey et al. (Morrissey et al. 2014). Образцы наноструктурированных пленок получены из лаборатории «Неорганические наноматериалы» НИТУ «МИСиС». Определение антибактериальной активности наноструктурированных пленок определяли по снижению концентрации КОЕ тест-штаммов в растворе и на подложке, относительно контроля, после 24 ч инкубирования.

Молекулярно-генетические методы. В штаммах *E. coli* методом ПЦР со специфичными праймерами детектировали гены, кодирующие факторы вирулентности UPEC, факторы антибиотикорезистентности, специфичные белки, участвующие в синтезе ЛПС, а также гены для филогенетического анализа по Clermont и MLST. RAPD-генотипирование проводили с помощью «случайного» праймера OPA-11 (Zimmer et al., 2003). Секвенирование нуклеотидных последовательностей изучаемых генов проводили методом Сенгера в ООО «Синтол» (Москва, Россия). Полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* проводили на платформе «Illumina MiSeq» с использованием наборов «Nextera DNA Library Preparation Kit» и «MiSeq Reagent Kits v3» (Illumina, США).

Биоинформатический анализ. Мультилокусное сиквенс-типирование проводили по системе Ahtman для *E. coli* с последующим определением аллельного профиля на сайте (URL: http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search). Анализ и идентификацию амплифицированных последовательностей ДНК осуществляли с помощью программ «Vector NTI9» (Life Technologies, США) и «Chromas 2.6.2.» (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и веб-ресурса BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Анализ RAPD-профилей проводили с помощью программы «GelJ 2.0» (Heras et al., 2015). Нуклеотидные последовательности полных

геномов штаммов *E. coli* аннотировали с помощью web-сервиса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/). Гены и опероны в геномах детектировали с помощью web-сервисов BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>). Филогенетический анализ полных геномов штаммов *E. coli* проводили на сайте Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>) с помощью алгоритма NDtree 1.2.

Биологические методы. Оценку вирулентности штаммов *E. coli* проводили на модели личинок *Galleria mellonella* по величине LD₅₀, которую вычисляли методом Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева (Ашмарин и др., 1962; Alghoribi et al., 2014).

Положения, выносимые на защиту

1. Уропатогенные штаммы *E. coli*, выделенные от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей в 2005-2020 гг. в отдельных лечебных учреждениях Центрального региона России, характеризуются наличием в их геномах специфических генов вирулентности четырех функциональных групп: адгезинов, факторов поглощения железа, токсинов и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма.

2. Охарактеризованные штаммы уропатогенных *E. coli* являются гетерогенной группой возбудителей инфекции мочевыводящих путей, представленной 19 серологическими O-группами, 25 сиквенс-типами и 8 филогенетическими группами. Доминирующей является генетическая группа O25-B2-ST131.

3. Большинство изученных уропатогенных штаммов *E. coli* являются резистентными и мультирезистентными к антимикробным лекарственным препаратам, часть штаммов одновременно устойчивы к антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам.

4. Уропатогенные штаммы *E. coli* доминирующей группы O25-B2-ST131 характеризуются наличием консервативных генов вирулентности и генетическими кластерами резистентности к антимикробным препаратам, а также наличием сравнительно идентичных профаговых кластеров.

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 отраслевых НИР Роспотребнадзора «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» 2015-2020 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 116030310007), «Молекулярно-генетические механизмы вирулентности и резистентности бактерий к антибактериальным препаратам» 2021-

2025 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 121022400056-5), «Исследование наночастиц с модифицированной поверхностью для разработки диагностических и иммунобиологических препаратов» 2016-2017 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ 116030310018) и «Исследование бактерицидной активности наночастиц и наномодифицированных поверхностей» 2018-2020 гг. (Номер регистрации в ЕГИСМ АААА-А18-118011690119-0). Достоверность результатов обеспечена проведением работ с использованием современных методов исследования, рекомендованных российским и международным научным сообществом. Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 10 Российских и международных конференциях: IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 18-20 апреля 2017 г.); I-й Российский Микробиологический конгресс (г. Пущино, 17-18 октября 2017 г.); III национальный конгресс бактериологов в рамках XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения» (г. Москва, 16-17 ноября 2017 г.); XX Международный конгресс по антимикробной терапии и клинической микробиологии (г. Москва, 23-25 мая 2018 г.); IV Национальный конгресс бактериологов (г. Омск, 12-13 сентября 2018 г.); V Национальный конгресс бактериологов (г. Москва, 16-17 сентября 2019 г.); Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии XXIII Кашкинские чтения (г. Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2020 г.); Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии XXIV Кашкинские чтения (г. Санкт-Петербург, 9-11 июня 2021 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию академика И.Н. Блохиной (г. Нижний Новгород, 26-27 апреля 2021 г.) и Конгресс с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2023» (г. Москва, 27-28 сентября 2023 г.).

Личное участие автора в получении результатов. Совместно с научным руководителем, к.б.н. Фурсовой Н.К., определены цель и задачи исследования, методика и дизайн экспериментов, а также подготовка материалов к публикации. Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании, выполнении и анализе большей части экспериментов. Совместно с д.б.н. Игнатовым С.Г. выполнен дизайн, анализ и подготовка к публикации экспериментов с образцами наноструктурированных пленок. Отдельные работы по ПЦР-детекции выполнены совместно с к.м.н. Асташкиным Е.И. Масс-спектрометрическая идентификация штаммов проведена совместно с Детушевым К.В. и Новиковой Т.С., полногеномное секвенирование штаммов – с к.б.н. Мухиной Т.Н. и к.б.н.

Кисличкиной А.А., отдельные эксперименты на модели личинок *G. mellonella* – совместно с Асланян Е.М.

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 24 научных работы, в том числе 5 статей в отечественных и международных реферируемых научных журналах, 3 Базы данных, 5 статей в других изданиях и 11 тезисов устных и стендовых сообщений в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и выводов. Объём диссертации составляет 162 страницы текста. Работа иллюстрирована 35 рисунками, 28 таблицами и 7 приложениями. Список литературы содержит 270 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Коллекция клинических штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей. Клинические штаммы *E. coli* (n=303) выделены из образцов мочи 230 пациентов восьми лечебных учреждений Российской Федерации в 2005-2020 гг. Доля штаммов, выделенных от пациентов с осложненной ИМВП, составила более 95 %. Штаммы коллекции характеризовались значительным разнообразием биохимических и культурально-морфологических свойств, при этом 42 % штаммов ферментировали лактозу, выделяли газ при ферментации глюкозы и обладали подвижностью. Для 32 % штаммов отмечена продукция колицинов, а для 27 % – гемолитическая активность. В изученной коллекции 79 % штаммов *E. coli* обладали способностью формировать биопленку, для 73 % идентифицирована продукция курли-волокон – основного компонента матрикса биопленок.

Генотипирование штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП. В ходе исследования показана высокая внутривидовая гетерогенность штаммов *E. coli* изученной коллекции. Среди 294 штаммов, для которых определена филогенетическая группа по Clermont, наиболее представлена была филогруппа В2 (51 % штаммов), на втором месте – филогруппа А (17 %), менее представлены были филогруппы Е (9 %), В1 (8 %), D (7 %), F (3 %), клада I (2 %) и С (1 %).

В ходе исследования 197 штаммов *E. coli* отнесены к 23 серологическим O-группам. Доминирующую позицию занимали штаммы с серогруппой O25 (n=112, 37 %), менее представлены штаммы с серогруппами O2 (n=17), O8 (n=12), O6 (n=9), O89 (n=7), O15 (n=6), O86 (n=5), O75 (n=4) и O9 (n=4). К серогруппам O4, O11, O17, O18, O22, O91, O100, O101, O102, O106, O115, O134, O143 и O9/O21 отнесены 3 и менее штаммов к каждой. Показано, что 57 % штаммов обладали типичными для UPEC серогруппами (O25, O2, O8, O15, O6, O75, O9, O18, O11, O4, O102 и O22). С помощью RAPD-типирования показана генетическая гетерогенность для штаммов серогрупп O2, O4, O6, O8, O9, O15, O18, O25 и O91 и отсутствие генетической гетерогенности для штаммов серогрупп O11, O75, O86, O89, O101 и O102.

В ходе исследования 61 штамм *E. coli* отнесены к 31 сиквенс-типу и 27 клональным комплексам. К сиквенс-типу ST131 отнесено 11 штаммов, к сиквенс-типам ST69 и ST127 – по 5 штаммов, к ST73 – 4 штамма, к ST141 – 3 штамма, к ST38, ST58, ST405, ST457, ST1193, ST1196 и ST1858 – по 2 штамма, к ST12, ST14, ST46, ST93, ST165, ST167, ST297, ST501, ST540, ST569, ST617, ST744, ST1140, ST1429, ST1434 и ST5958 – по 1 штамму. Большинство клональных комплексов представлены одним сиквенс-типом. Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа: ST9239, ST10102 и ST12358, а также новый клональный комплекс CC10102 (табл. 1).

Таблица 1 – Аллельный профиль, серо- и филогруппы штаммов новых сиквенс-типов *E. coli*

Штамм	Сиквенс-тип	Клональный комплекс	Аллельный профиль							Серо-группа	Фило-группа
			<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>		
U26	ST9239	CC446	6	19	33	26	11	8	341	O8	B1
U19	ST10102	CC10102	13	44	9	22	579	30	34	ND	B2
K369	ST12358	CC10	10	11	4	8	1153	13	2	O101	A

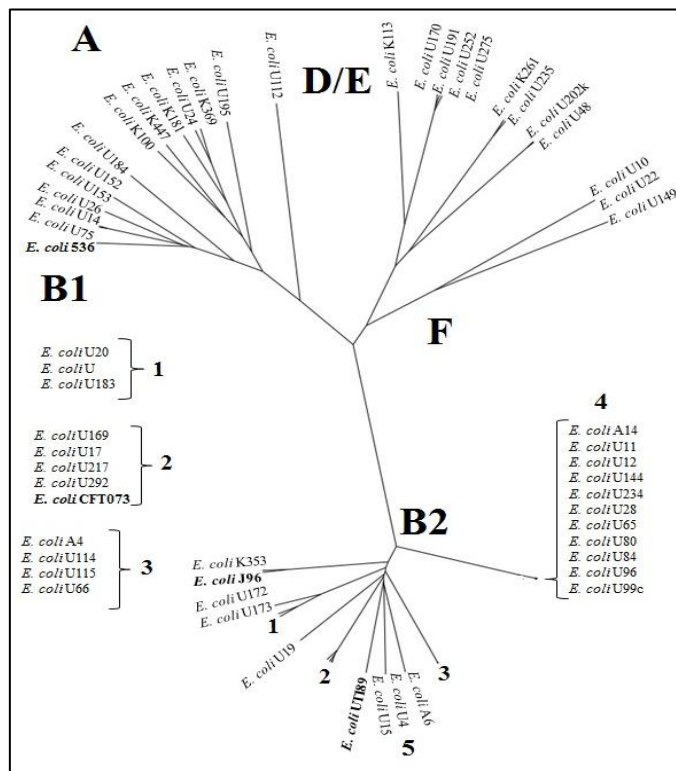
Впервые штаммы *E. coli*, выделенные от пациентов с ИМВП, отнесены к серогруппам O91, O100, O101, O106, O115 и O143, а также сиквенс-типам ST14, ST46, ST58, ST69, ST73, ST93, ST141, ST165, ST297, ST457, ST501, ST540, ST569, ST617, ST744, ST1140, ST1193, ST1196, ST1429, ST1434, ST1858, ST5958, ST9239, ST10102 и ST12358. Впервые штаммы *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП в России, отнесены к распространенным в мире группам UPEC O25-B2-ST131, O75-B2-CC14, A-CC10, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, B1-ST58, O89-A-ST744, D-ST69, O2/O6-B2-ST73 (табл. 2).

Таблица 2 – Представленность штаммов *E. coli* серогрупп O8- и O9- и O 25 с идентифицированными филогруппами, сиквенс-типами, клональными комплексами, RAPD-типами

О-группа	Филогруппа	ST	CC	RAPD-тип*	Количество штаммов	Генетическая группа
O8	A	ND	ND	O8 ₁ , O8 ₂	4	NI
	B1	58	155	O8 ₃	2	B1-ST58
		ND	ND		1	
		297	297		1	O8-B1-ST297
		9239	446	O8 ₁	1	O8-B1-ST9239
		ND	ND	O8 ₁ , O8 ₄	2	NI
	D	ND	ND	O8 ₃	1	B1-ST58
E	ND	ND	O8 ₄	1	NI	
O9	A	46	46	O9 ₁	1	O9-A-ST46
		540	540		1	O9-A-ST540
	B1	58	155	O9 ₂	1	B1-ST58
		ND	ND		1	
O25	A	ND	ND	O25 ₆ , O25 ₇	2	NI
	B2	131	131	O25 ₁	11	O25-B2-ST131
		ND	ND		78	
		ND	ND	O25 ₂	19	NI
	Клада I	ND	ND	O25 ₃	2	NI
D	ND	ND	O25 ₄ , O25 ₅	2	NI	

Примечание: ND – нет данных; NI – не идентифицирована; * – подстрочный индекс означает номер RAPD-типа, ST – сиквенс-тип, CC – клональный комплекс

На основе результатов RAPD-типирования и анализа филогенетического дерева 54 геномов штаммов *E. coli* выявлена генетическая идентичность штаммов генетических групп O4-B2-ST127 и O6-B2-ST127, а также штаммов групп O6-B2-ST73 и O2-B2-ST73, что говорит о единстве генетических групп *E. coli* O2/O6-B2-ST73 и O4/O6-B2-ST127, соответственно (рис. 1).



Большими буквами обозначены субкластеры филогрупп; жирным шрифтом выделены геномы контрольных штаммов *E. coli* 536, CFT073, UTI89 и J96; «1» – штаммы генетических групп O18-B2-ST14 и O75-B2-CC14; «2» – генетическая группа O2/O6-B2-ST73; «3» – генетическая группа O4/O6-B2-ST127; «4» – генетическая группа O25-B2-ST131; «5» – генетическая группа O2-B2-ST141

Рисунок 1 – Филогенетическое дерево полных геномов штаммов *E. coli*

Оценка вирулентности штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с ИМВП. В результате проведенного исследования в 303 штаммах *E. coli* были детектированы гены вирулентности (рис. 2).



Рисунок 2 – Встречаемость в штаммах *E. coli* (n=303) генов вирулентности UPEC

Показана высокая гетерогенность штаммов *E. coli* по генам вирулентности. Гены *fimH*, *fyuA*, *chuA*, *iutA*, *yfcV*, *traT*, *ompT*, *kpsMTII* и *usp* детектированы у большей части штаммов. В изучаемой коллекции штаммов *E. coli* описаны 9 вариантов сочетаний 4 функциональных групп генов, ассоциированных с проявлением вирулентности в урологическом тракте – генотипов вирулентности или GV-типов (табл. 3). Наиболее распространенной являлась группа GV15 (57 %), штаммы которой отнесены преимущественно к B2-филогруппе, O25-серогруппе (встречаются O4-, O6-, O75- и O102-серогруппы), и несли гены *fyuA*, *usp*, *chuA*, *ompT*, *yfcV*, *iutA* и *traT*. Только среди штаммов *E. coli* GV15-типа встречались штаммы, несущие гены *cnf1*, *vat*, *sfaS*, *focG* и *papGIII*.

Таблица 3 – Представленность генотипов вирулентности (GV-типов) в коллекции изучаемых штаммов *E. coli*

GV-тип	A	C	П	Т	Количество штаммов, шт
GV4	–	+	–	–	1
GV6	–	+	+	–	6
GV7	–	+	+	+	2
GV8	+	–	–	–	10
GV10	+	–	+	–	14
GV12	+	+	–	–	11
GV13	+	+	–	+	2
GV14	+	+	+	–	84
GV15	+	+	+	+	173

GV-тип – генотип вирулентности; «+» – наличие генов; «–» – отсутствие генов; А – гены адгезинов (*fimH*, *papGII*, *papGIII*, *sfaS*, *focG*, *afa/draBC* и *yfcV*); С – гены факторов поглощения железа (*iroN*, *fyuA*, *iutA* и *chuA*); П – гены факторов защиты от иммунной системы (*ompT*, *traT*, *kpsMTII* и *kpsMTIII*); Т – гены токсинов (*hlyA*, *cnf1*, *usp* и *vat*)

Примечание: штаммы с генотипами GV0, GV1, GV2, GV3, GV5, GV9 и GV11 отсутствовали в изучаемой коллекции

Штаммы GV14-типа (28 %) преимущественно отнесены к не-B2 филогруппам с неопределенными серогруппам (встречались O11-, O15- и O17-серогруппы), и несли гены *traT*, *iutA*, *fyuA* и *chuA*.

Анализ генов вирулентности позволяет отнести штаммы (n=257) с генотипами вирулентности GV14 и GV15 к патогруппе UPEC. Соответственно, впервые выделенные от пациентов с урологическими заболеваниями штаммы *E. coli*, отнесенные к сиквенс-типам ST165, ST1140 и ST1858, генетическим группам O4-F-ST12, O6-B2-ST1858, O8-B1-ST9239, O8-B1-ST297, O9-A-ST46, O11-F-ST457, O15-E-ST38, O17-E-ST69, O18-B2-ST14, O91-B1-ST1196 и O134-B2-ST569, и новым сиквенс-типам ST9239, ST10102 и ST12358, на основании принадлежности к GV14 и GV15 генотипам вирулентности, также отнесены к патогруппе UPEC.

Оценка вирулентности штаммов *E. coli* на модели личинок *Galleria mellonella*. Анализ кривых выживаемости личинок *G. mellonella* после заражения штаммами *E. coli* в дозе 10⁶ КОЕ/особь показал дифференцировку совокупности штаммов на высоко-, средне- и низковирулентные (рис. 3). Высоковирулентные

штаммы *E. coli* (n=92) при заражении в дозе 10^6 КОЕ/особь на 4 сутки вызывали гибель 80-100 % личинок, средневирулентные (n=76) – 50-70 % личинок, а низковирулентные (n=41) – менее 50 % (рис. 3).

Методических рекомендаций для оценки вирулентности на модели личинок *G. mellonella*. Анализ результатов исследований вирулентности штаммов *E. coli* позволил обобщить полученные данные и разработать методические рекомендации учрежденческого уровня, в которых изложен алгоритм оценки вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок *G. mellonella*.

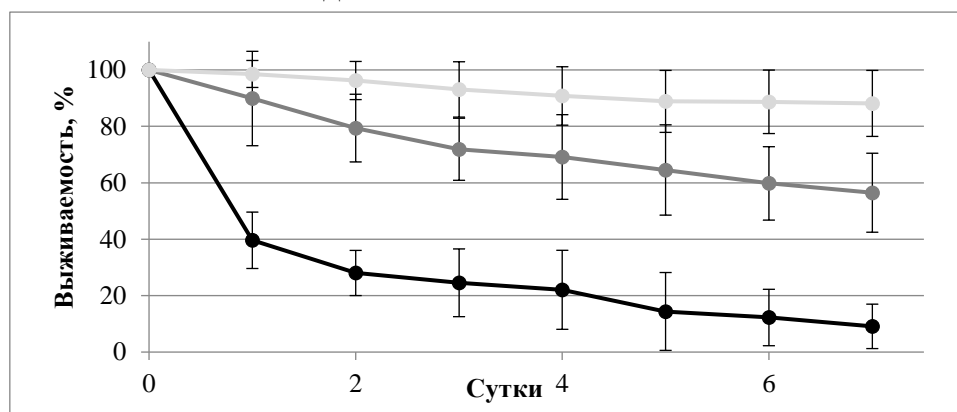


Рисунок 3 – Выживаемость личинок *G. mellonella* после заражения высоко- (черный цвет), средне- (темно-серый цвет) и низковирулентными (светло-серый цвет) штаммами *E. coli* в дозе 10^6 КОЕ/особь

В качестве референсных предложены штаммы *E. coli* U15 и *E. coli* C600, которые отнесены к высоко- и низковирулентным штаммам, соответственно. При этом штамм *E. coli* U15 отнесен к патогруппе UPEC GV15-типа. Анализ динамики выживаемости личинок показал резкое падение численности живых личинок после заражения штаммами *E. coli* U15 в дозах $>10^5$ КОЕ и *E. coli* C600 – в дозах $>10^8$ КОЕ. Изучение выживаемости личинок *G. mellonella* после их заражения штаммами *E. coli* позволило оценивать вирулентность микроорганизмов, сравнивать результаты между собой и с литературными данными, проводить эпидемиологический анализ инфекционных ситуаций в разных регионах и в разные периоды времени.

Фенотипы и генотипы резистентности штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам. Для штаммов *E. coli* (n=303) была проведена оценка чувствительности к АМП – антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам (рис. 4). Штаммы коллекции обладали высоким уровнем устойчивости к антибиотикам (49 % устойчивых и 46 % множественно устойчивых штаммов): более 90 % штаммов устойчивы к бета-лактамам, более 50 % – к фторхинолонам (рис. 4А). Кроме того, 33 % штаммов характеризовались устойчивостью к триклозану, а 2 % – к бензалконию хлориду (рис. 4В). При этом 54 MDR-штамма *E. coli* обладали резистентностью к триклозану, 2 MDR-штамма – к бензалконию хлориду, а 1 MDR-штамм – к триклозану и бензалконию хлориду.

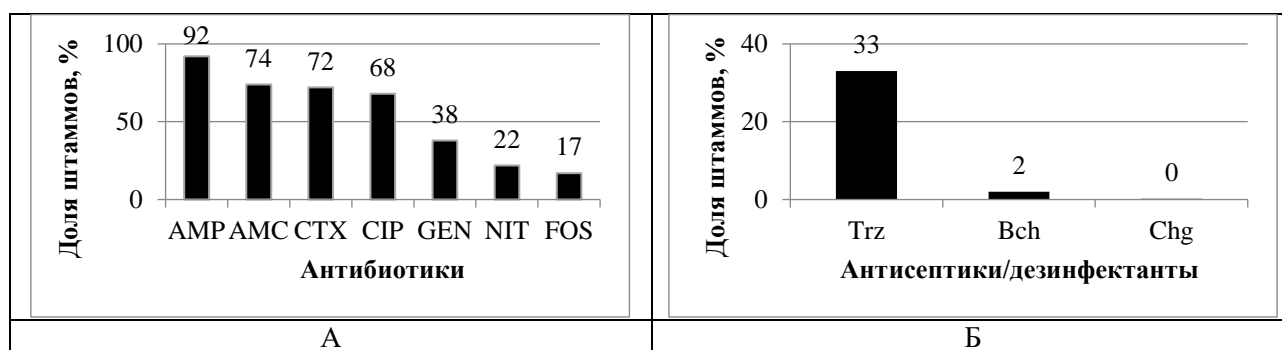


Рисунок 4 – Представленность штаммов *E. coli* (n=303), устойчивых к антибиотикам (А) и антисептикам/дезинфектантам (Б)

AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – ципрофлоксацин, GEN – гентамицин, NIT – нитрофурантоин, FOS – фосфомицин; Trz – триклозан, Bch – бензалконий хлорид, Chg – хлоргексидин

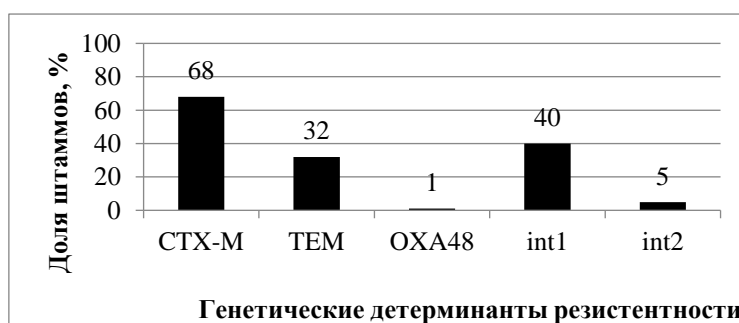
Большая часть чувствительных штаммов коллекции (>90 %) в виде биопленок обладали устойчивостью к антибиотикам: ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму, гентамицину, фосфомицину и нитрофурантоину, более трети штаммов – к ципрофлоксацину, кроме того, биопленки всех исследованных штаммов были устойчивы к триклозану, хлоргексидину и бензалконию хлориду. (табл. 4).

Таблица 4 – Представленность штаммов *E. coli* с R- и S-фенотипами биопленок

Фенотип	Доля штаммов, %									
	AMP (n=25)	AMC (n=78)	CTX (n=85)	CIP (n=98)	GEN (n=187)	FOS (n=250)	NIT (n=237)	Trz (n=203)	Bch (n=297)	Chg (n=303)
R	100,0	100,0	96,0	37,0	89,0	99,6	98,0	100,0	100,0	100,0
S	0,0	0,0	4,0	63,0	11,0	0,4	2,0	0,0	0,0	0,0

Примечание: AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – ципрофлоксацин, GEN – гентамицин, FOS – фосфомицин, NIT – нитрофурантоин, Trz – триклозан, Bch – бензалконий хлорид, Chg – хлоргексидин; R – устойчивость (резистентность) к АМП, S – чувствительность к АМП

Все штаммы коллекции протестированы на наличие у них генов резистентности к АМП: генов бета-лактамаз и интегронных структур (рис. 5).



CTX-M – ген бета-лактамазы *bla*_{CTX-M}-типа, TEM – ген бета-лактамазы *bla*_{TEM}-типа, OXA48 – ген бета-лактамазы *bla*_{OXA-48}, *int1* – ген интегразы 1 класса, *int2* – ген интегразы 2 класса

Рисунок 5 – Представленность штаммов *E. coli* (n=303), несущих генетические детерминанты резистентности к АМП

Показано, что 81 % штаммов несли по крайней мере одну из генетических детерминант резистентности. В 38 % штаммов *E. coli* идентифицированы только гены

бета-лактамаз, в 5 % штаммов – только интегронные структуры, а в 39 % штаммов – гены бета-лактамаз и интегронные структуры одновременно.

С помощью двух тест-штаммов *E. coli* (K261 и U20) была произведена оценка антибактериальной и антибиопленочной активности наноструктурированных пленок TiCaPCON с имплантированными ионами Pt⁺ и Fe²⁺. Показано, что образцы наноструктурированных пленок TiCaPCON, нанесенные на кремневую подложку, с имплантированными ионами Pt⁺ и Fe²⁺, оказывали угнетающее действие на формирование биопленок штаммами уропатогенных *E. coli*, но практически не оказывали антимикробного действия на планктонные клетки. Использование материалов на основе наночастиц – перспективное направление противодействия резистентным и мультирезистентным уропатогенным *E. coli*, позволяющее снизить распространение планктонных и биопленочных форм UPEC.

Характеристика штаммов генетических групп UPEC изучаемой коллекции.

Штаммы *E. coli* выявленных генетических групп характеризовались специфичными фенотипами и генотипами (табл. 5). Для штаммов группы D-ST69, A-CC10 и O89-A-ST744 характерным был R- и MDR-фенотип, наличие генов бета-лактамаз и интегронов класса 1, при малом числе детерминант вирулентности, отсутствии генов формирования капсулы и токсинов. Кроме того, штаммы групп A-CC10 и O89-A-ST744 характеризовались отсутствием подвижности и колициногенности. Штаммы групп O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127 и O2/O6-B2-ST73 несли большое число генетических детерминант вирулентности, в том числе генов формирования капсулы и токсинов, и имели наиболее высокий уровень вирулентности на модели личинок *G. mellonella*. Штаммов с MDR-фенотипом среди этих групп не выявлено, при этом штаммы O2-B2-ST141 и O2/O6-B2-ST73 чаще всего обладали R-фенотипом и несли небольшое число генов резистентности, а штаммы O4/O6-B2-ST127 преимущественно обладали S-фенотипом. Штаммы группы O25-B2-ST131 часто имели MDR-фенотип, были устойчивы к бета-лактамам и фторхинолонам. В геномах штаммов O25-B2-ST131 определены детерминанты большого числа адгезинов, гены сидерофоров, капсулы 2 группы, протеазы внешней мембраны, антисывороточного липопротеина, а также большое число генов резистентности, в том числе в составе интегронов.

Полные геномы штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131. Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей 11 штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131, выявил низкую изменчивость генов факторов вирулентности: фимбрий типа I (*fim*), F9-фимбрий (*c1931-c1936*), Usp-токсина (*usp*), энтеробактина (*ent/fep*), иерсиниабактина (*ybt/irp/fyu*), курли-волокон (*csg*), гемофора (*chu*), Yfc-фимбрии (*yfc*) и аэробактина (*iuc*), а также гены нефибрильных адгезинов *fdeC* и *iha*, и гены токсинов *sat* и *pic*. При этом редко встречались как мутации в гене, приводящие к аминокислотным заменам, так и мутации, не приводящие к аминокислотным заменам, а также мутации в межгенных областях в опероне синтеза факторов вирулентности.

Таблица 5 – Фенотипы и генотипы штаммов, выделенных в 2005-2020 гг., отнесенных к широко распространенным генетическим линиям UPEC

Генетическая линия	Фенотип								Генотип*	
	Л#	П#	Г#	Кол#	КВ#	БП#	Спектр резистентности*	MDR/R/S#	резистентности	вирулентности
O25-B2-ST131 (n=89)	72	58	75	22	89	74	AMP, AMC, CTX, CIP	51/38/0	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>intl1</i>	<i>fimH</i> , <i>usp</i> , <i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ompT</i> , <i>traT</i> , <i>kpsMTII</i>
O75-B2-CC14 (n=3)	0	0	2	2	3	3	AMP, AMC, CTX, CIP	0/3/0	-	<i>fimH</i> , <i>usp</i> , <i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>ompT</i> , <i>kpsMTII</i>
A-CC10 (n=3)	3	0	3	0	1	2	AMP, CTX, CIP	2/1/0	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>intl1</i>	<i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>traT</i>
O2-B2-ST141 (n=11)	11	8	11	4	11	10	AMP	1/9/1	-	<i>fimH</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfaS</i> , <i>focG</i> , <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>ompT</i> , <i>kpsMTII</i>
O4/O6-B2-ST127 (n=6)	6	0	6	0	6	6	-	0/2/4	-	<i>fimH</i> , <i>papGIII</i> , <i>sfaS</i> , <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>ompT</i> , <i>kpsMTII</i>
B1-ST58 (n=5)	5	0	4	5	5	3	AMP, AMC, CTX	1/2/2	<i>bla</i> _. , <i>intl1</i>	<i>fimH</i> , <i>cvaC</i> , <i>iroN</i> , <i>iutA</i> , <i>fyuA</i> , <i>traT</i>
O89-A-ST744 (n=7)	4	0	7	0	6	6	AMP, AMC, CTX, CIP	4/3/0	<i>bla</i> _{CTX-M} , <i>intl1</i>	<i>fimH</i> , <i>iutA</i> , <i>traT</i>
D-ST69 (n=5)	5	4	5	2	3	5	AMP, AMC	1/4/0	<i>bla</i> _{TEM} , <i>intl1</i>	<i>fimH</i> , <i>fyuA</i> , <i>traT</i> , <i>ompT</i>
O2/O6-B2-ST73 (n=4)	4	2	3	4	3	4	AMP, AMC	0/4/0	<i>bla</i> _{TEM} , <i>intl1</i>	<i>fimH</i> , <i>papGII</i> , <i>focG</i> , <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>usp</i> , <i>iroN</i> , <i>fyuA</i> , <i>iutA</i> , <i>ompT</i> , <i>kpsMTII</i>

– количество штаммов с указанным признаком; * – указанный признак идентифицирован у более половины штаммов; AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, AMP – ампициллин, CIP – ципрофлоксацин, CTX – цефотаксим; Л – ферментация лактозы, П – подвижность, Г – выделение газа при ферментации глюкозы, Кол – колициногенность, КВ – продукция курли-волокон, БП – биопленкообразование; MDR – множественно резистентный фенотип, R – резистентный фенотип, S – чувствительный фенотип

Выявлены 5 мутаций с аминокислотной заменой в четырех различных генах факторов вирулентности четырех штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131 изученной коллекции. В штамме *E. coli* U234 ген *sat* имеет замену Glu622Asp, в гене *fimA* штамма *E. coli* U84 выявлено две аминокислотные замены: Asp85Gly и Thr106Pro, штамм *E. coli* U144 имеет нуклеотидную замену Ile320Ser в гене *fimD* – анализ расположения аминокислотных замен предполагает, что они не влияют на функционирование измененного белка. В гене *iucD*, оперона синтеза сидерофора аэробактина в штамме *E. coli* U65, выявлена делеция 601 нуклеотида, ведущая к формированию стоп-кодона.

Во всех полногеномных последовательностях штаммов *E. coli* идентифицированы профаги, в составе которых, кроме генов фагов идентифицированы гены, кодирующие эффлюксные насосы, гены антибиотикорезистентности и гены, ассоциированные с факторами вирулентности. Во всех геномах штаммов *E. coli* (n=11) группы O25-B2-ST131 изучаемой выборки выявлены профаги фагов *Enterobacteria phage P88*, *Escherichia phage SH2026Stx1* и *Pectobacterium phage ZF40*, имеющие сравнительно идентичное строение для всех штаммов.

Исследование, проведенное на выборке штаммов (n=11) показало высокую распространенность генов резистентности к бета-лактамам, тетрациклинам, сульфаниламидам и четвертичным аммониевым соединениям, а также макролидам. Из генов бета лактамаз выявлены только идентичные для всех штаммов *bla_{ampC}*, а также *bla_{STX-M}* и *bla_{OXA-1}*. Кроме того, в полных геномах всех протестированных штаммов выявлены мутации генов *parE* и *parC*, обуславливающие резистентность к фторхинолонам. В полных геномах протестированных штаммов *E. coli* выявлены комплексные области резистентности (CRR), включающие несколько генов резистентности к разным антимикробным препаратам. CRR *int11~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA* выявлена во всех штаммах *E. coli*, полученных от пациентов НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина в 2016-2017 гг. При этом в штаммах из ГБУЗ ЯО «ИКБ №1» и ФГБУ НЦАГИП им. академика В.И. Кулакова, а также в штамме из НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина 2019 г. эта CRR не найдена. Кроме того, в геномах половины штаммов изучаемой выборки *E. coli* выявлены CRR *aac(6')-Ib-cr~bla_{OXA-1}~catB3* а в 1 штамме – *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id*.

Сравнение полного генома штамма *E. coli* U28, обладающего типичными свойствами распространенной в нашей коллекции генетической группы O25-B2-ST131, с геномом штамма *E. coli* SA186 (NZ_CP022730.1) этой же генетической группы, выделенной в 2012 г. в Саудовской Аравии, показало высокую степень гомологии обоих штаммов, в том числе по носительству отдельных профагов, генов факторов вирулентности и резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования изучены 303 штамма *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей в восьми лечебных

учреждениях четырех регионов Российской Федерации в 2005-2020 гг. Полученные данные позволили прояснить этиологическую структуру возбудителя урологических эшерихиозов, выявить доминирующие и ранее неизвестные группы. Анализ полученных данных позволил сформулировать критерии отнесения штаммов *E. coli* к патогруппе UPEC: наличие набора генов факторов патогенности – адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма. Полученные данные по устойчивости выделенных возбудителей ИМВП к антимикробным препаратам, в том числе к антисептикам/дезинфектантам, указывают на важность формирования и распространения резистентности среди данной группы патогенов человека. Получены экспериментальные данные о возможности использования новых конструкционных материалов на основе наноповрхностей для разработки урологических имплантов с заданными свойствами.

ВЫВОДЫ

1. На основании молекулярно-генетической характеристики 303 штаммов *Escherichia coli*, выделенных в 2005-2020 гг. в Центральном регионе России от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей, 257 штаммов отнесены к уропатогенной группе *E. coli* (UPEC). Штаммы UPEC являлись гетерогенной группой возбудителей, представленных 19 серологическими O-группами, 25 сиквенс-типами, 8 филогенетическими группами и 21 генетическими группам. UPEC штаммы обладали типичными для вида культурально-морфологическими и ферментативными свойствами; часть штаммов продуцировала бактериоцины (34 %), гемолизин (31 %), образовывала курли-волокна (73 %) и формировала биопленки (79 %).

2. Впервые у штаммов UPEC идентифицированы сиквенс-типы ST165, ST1140 и ST1858, описанные ранее у *E. coli* других патогрупп, а также 3 новых сиквенс-типа *E. coli*: ST9239, ST10102 и ST12358. Установлена принадлежность уропатогенных штаммов *E. coli* к генетическим группам O25-B2-ST131, D-ST69, B1-ST58, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, O75-B2-CC14, O2/O6-B2-ST73, A-CC10, O89-A-ST744. Доминирующей генетической группой среди штаммов UPEC являлась группа O25-B2-ST131, к ней принадлежало 35 % штаммов.

3. На модели личинок *Galleria mellonella* штаммы UPEC генетических групп O4/O6-B2-ST127, O75-B2-CC14 и O89-A-ST744 проявляли высокий уровень вирулентности, а штаммы O25-B2-ST131 и B1-ST58 – средний уровень вирулентности. При этом группы O2-B2-ST141, D-ST69, A-CC10 и O2/O6-B2-ST73 были представлены как высоко-, так и низковирулентными штаммами. Разработаны и утверждены Методические рекомендации учрежденческого уровня для определения уровней вирулентности микроорганизмов III-IV групп патогенности на модели личинок *Galleria mellonella*.

4. Из исследованных 303 штаммов *E. coli* в 57 % случаев выявлены гены вирулентности четырех функциональных групп: адгезинов (*fimH*, *sfaS*, *focG*, *papG*, *yfcV*

и/или *afa/draBC*), факторов поглощения железа (*chuA*, *iroN*, *iutA* и/или *fyuA*), токсинов (*cnfI*, *hlyA*, *vat* и/или *usp*) и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма (*ompT*, *traT* и/или *kpsMT*); в 28 % случаев - трех функциональных групп (адгезинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма).

5. Штаммы UPEC в планктонной форме обладали фенотипом резистентности к антимикробным препаратам (95 %), включая фенотип мультирезистентности (47 %); 20 % штаммов дополнительно обладали ассоциированной устойчивостью к антисептикам/дезинфектантам триклозану и бензалкония хлориду. Все эти штаммы в форме биопленок были устойчивы к применяемым в урологической практике антимикробным препаратам (кроме ципрофлоксацина), а также к антисептикам/дезинфектантам триклозану и бензалконию хлориду. Новые конструкционные материалы на основе наноструктурированных пленок TiCaPCON с имплантированными ионами Pt⁺ и Fe²⁺ проявляли ингибирующий эффект на формирование биопленок уропатогенных *E. coli*.

6. Анализ полных нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *E. coli* показал, что штаммы доминирующей генетической группы UPEC O25-B2-ST131 характеризовались наличием консервативных генов факторов вирулентности: фимбрий типа I (*fim*), F9-фимбрий (*c1931-c1936*), Yfc-фимбрии (*yfc*), адгезина FdeC (*fdeC*), адгезина Iha (*iha*), курли-волокон (*csg*), Usp-токсина (*usp*), Sat-токсина (*sat*), Pic-токсина (*pic*), энтеробактина (*ent/fep*), иерсиниабактина (*ybt/irp/fyu*), гемофора (*chu*) и аэробактина (*iuc*). При этом, все эти штаммы характеризовались мультирезистентностью, обусловленной точечными мутациями в генах *gyrA* и *parC*, генами бета-лактамаз СТХ-М-типа, интегронами класса 1 и генетическими кластерами резистентности *int11~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA*, *aac(6')-Ib-cr~bla_{OXА-1}~catB3* и *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id*. Кроме того, в штаммах этой генетической группы присутствовали сравнительно идентичные профаговые генные кластеры.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Созданная в результате исследования коллекция уропатогенных штаммов *E. coli*, электронный каталог и База данных «Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.» могут быть использованы для анализа характеристик штаммов UPEC, выделяемых в клинической практике.

2. Депонированные в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» штаммы UPEC могут быть использованы в качестве референсных при анализе возбудителей инфекции мочевыводящих путей.

3. Нуклеотидные последовательности генов вирулентности, резистентности и O-серогрупп, и полные геномы штаммов UPEC, размещенные в базе данных GenBank, а также информация о сиквенс-типах выделенных штаммов UPEC, размещенная в Базе данных MLST, могут быть использованы исследователям во всем мире.

4. Методические рекомендации «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*» могут быть использованы сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ при изучении бактерий III-IV групп патогенности.

5. Предложенная схема определения штаммов UPEC (на основании анализа наличия генов вирулентности четырех функциональных групп: адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунитета макроорганизма) и информация о генетических группах UPEC, выделенных в России, может быть использована для выявления эпидемически значимых возбудителей в клинической практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в реферируемых научных журналах

1. Детушева, Е.В. Чувствительность нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* к антисептику на основе хлоргексидина / Е.В. Детушева, В.Б. Родин, **П.В. Слукин** [и др.] // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17, № 1. – С. 57-66. (SCOPUS, ВАК, IF 1,32; цит. 11)

2. Permyakova, E.S. Antibacterial biocompatible PCL nanofibers modified by COOH-anhydride plasma polymers and gentamicin immobilization / E.S. Permyakova, D.V. Shtansky, A. Manakhov, J. Polčák, **P.V. Slukin**, S.G. Ignatov, N.A. Gloushankova, L. Zajíčková // Materials & Design. – 2018. – Vol. 153. – P. 60-70. (Web of Science, SCOPUS, Q1, IF 6,551; цит. 37)

3. Ponomarev, V.A. TiCaPCON-supported Pt-and Fe-based nanoparticles and related antibacterial activity / V.A. Ponomarev, A.N. Sheveyko, E.S. Permyakova, A.M. Manakhov, I.V. Chepkasov, Z.I. Popov, D.V. Shtansky, J. Lee, A.A. Voevodin, D. Berman, M. Michlíček, **P.V. Slukin**, V.V. Firstova, S.G. Ignatov // ACS applied materials & interfaces. – 2019. – Vol. 11. – № 32. – P. 28699-28719. (SCOPUS, Q1, IF 8,758; цит. 17)

4. **Слукин, П.В.** Фенотипические и молекулярно-генетические свойства клинических штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями / **П.В. Слукин**, Э.А. Светоч, Е.М. Асланян [и др.] // Урология. – 2020. – № 2. – С. 23-30. (SCOPUS, ВАК, Q4, IF 2,649; цит. 1)

5. **Слукин, П.В.** Характеристика вирулентных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с урологической инфекцией / Слукин П.В., Е.И. Асташкин,

Е.М. Асланян [и др.] // Журн. Микроб. Эпидем. Иммуно. – 2021. – № 6. – С. 671-684. (SCOPUS, ВАК, Q4, IF 0,324; цит. 4)

Базы данных

1. **Слукин, П.В.** Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг. / П.В. Слукин, Л.В. Колупаева, Н.А. Слукина, Н.К. Фурсова // База данных. Свид. о рег. 2021621432, 01.07.2021. Заявка № 2021621323 от 25.06.2021.

2. **Слукин, П.В.** Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности / П.В. Слукин, А.И. Лев, Е.И. Асташкин, Н.К. Фурсова // База данных. Свид. о рег. RU 2017621413, 01.12.2017. Заявка № 2017621156 от 18.10.2017.

3. **Слукин, П.В.** CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности / П.В. Слукин, Е.В. Детушева, Е.С. Кузина [и др.] // База данных. Свид. о рег. 2021621482, 07.07.2021. Заявка № 2021621321 от 25.06.2021.

Статьи, опубликованные в других изданиях

1. **Слукин, П.В.** Антибактериальная активность бензидамина гидрохлорида против клинических изолятов бактерий, выделенных от людей в России и Испании / П.В. Слукин, Н.К. Фурсова, Н.И. Брико // Эпидем. Вакцинопроф. – 2018. – Т. 17. – № 6 (103). – С. 11-18.

2. Детушева, Е.В. Молекулярно-генетические методы изучения биопленок микроорганизмов / Е.В. Детушева, **П.В. Слукин**, Н.К. Фурсова // Бактериология. – 2020. – Т. 5. – № 2. – С. 49-55.

3. Ермоленко, З.М. Биопленки микроорганизмов в урологии: клиническая значимость и контроль связанных с ними инфекций / З.М. Ермоленко, **П.В. Слукин**, Н.К. Фурсова // Бактериология. – 2021. – Т. 6. – № 2. – С. 47-61.

4. **Слукин, П.В.** Оценка способности бензидамина гидрохлорида подавлять планктонные клетки, а также растущие и зрелые биопленки клинически значимых микроорганизмов / П.В. Слукин, Н.К. Фурсова, И.В. Кукес, Н.И. Брико // Фарматека. – 2021. – Т. 28. – № 1. – С. 102-107.

5. **Слукин, П.В.** Создание базы данных клинических штаммов грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности / П.В. Слукин, А.И. Лев, Е.И. Асташкин [и др.] // Бактериология. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 26-32.

Тезисы Всероссийских и международных научных конференций

1. **Слукин, П.В.** Антибактериальное действие наночастиц на керамическом носителе на грамположительные и грамотрицательные бактерии / П.В. Слукин, З.М.

Ермоленко, Н.К. Фурсова, С.Г. Игнатов // Бактериология. – 2017. – Т. 2. – № 3. – С. 99-100.

2. **Слукин, П.В.** Генетические детерминанты антибиотикорезистентности и вирулентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Ярославле в 2016-2017 гг / П.В. Слукин, З.М. Ермоленко, Е.И. Асташкин [и др.] // Материалы I-ого Российского Микробиол. конгресса. – 2017. – С. 124-125.

3. **Слукин, П.В.** Антибактериальная активность нановолокон с иммобилизованным гентамицином против уропатогенных *Escherichia coli* / П.В. Слукин, З.М. Ермоленко, Н.К. Фурсова, С.Г. Игнатов // Материалы I-ого Российского Микробиол. конгресса. – 2017. – С. 174-174.

4. **Слукин, П.В.** Разнообразие клинических уропатогенных штаммов *Escherichia coli* по генотипам вирулентности / П.В. Слукин, Е.И. Асташкин, З.М. Ермоленко [и др.] // Молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 345-347.

5. **Слукин, П.В.** Колицинпродуцирующие антибиотикорезистентные уропатогенные штаммы *Escherichia coli*, выделенные в Ярославле в 2016-2017 гг / П.В. Слукин, З.М. Ермоленко, Е.И. Асташкин [и др.] // Бактериология. – 2017. – Т. 2. – № 3. – С. 98-99.

6. **Слукин, П.В.** Антибиотикорезистентность и генотипы клинических штаммов уропатогенных *Escherichia coli* / П.В. Слукин, З.М. Ермоленко, Е.И. Асташкин [и др.] // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2018. – Т. 20. – № S1. – С. 41-41.

7. **Слукин, П.В.** Чувствительность к антимикробным препаратам уропатогенных *Escherichia coli* в планктонной форме и в составе биопленок / П.В. Слукин, З.М. Ермоленко, Е.И. Асташкин [и др.] // Микроорг. и биосфера «Microbios-2018». – 2018. – С. 65-65.

8. **Слукин, П.В.** Распространенность генов вирулентности в клинических штаммах уропатогенных *Escherichia coli* / П.В. Слукин, Е.И. Асташкин, З.М. Ермоленко [и др.] // Материалы V Национал. конгресса бактериол. – 2019. – С. 72-72.

9. Колупаева, Л.В. Чувствительность штаммов *Escherichia coli* серогруппы O25 к бактериофагам / Л.В. Колупаева, **П.В. Слукин**, Н.К. Фурсова // Пробл. Мед. Микол. – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 89.

10. Колупаева, Л.В. Оценка эффективности фага ВЕУ 50 против уропатогенных *Escherichia coli* на *in vivo* модели *Galleria mellonella* / Л.В. Колупаева, Е.М. Асланян, **П.В. Слукин**, Н.К. Фурсова // Пробл. Мед. Микол. – 2021. – Т. 23. – № 2. – С. 92.

11. Колупаева, Л.В. Чувствительность уропатогенных *E. coli* к коммерческим фаговым препаратам / Л.В. Колупаева, **П.В. Слукин**, Н.К. Фурсова // Эпидемиолог. надзор за актуал. инф.: новые угрозы и вызовы. – 2021. – С. 343-345.

ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТЕРМИНЫ

Гены вирулентности – маркерные гены формирования факторов, обуславливающих проявление вирулентных свойств штаммов при развитии инфекционного процесса у человека.

Курли-волокна – белковые структуры, основной компонент внеклеточного матрикса биопленки *E. coli*, кодируемые двумя оперонами *csgABC* и *csgDEFG*.

Филогенетический анализ по Clermont – принадлежность к филогенетической группе (A, B1, B2, C, D, E, F и клада I), идентифицируемая на основании наличия определенной комбинации из пяти генов: гемофора внешней мембраны *chuA*, гипотетического протеина *ujaA*, анкирин-повторяемого белка A *arpA*, фрагмента ДНК предполагаемого гена липазы эстеразы TspE4.C2 и гена триптофан синтетазы α -SU *trpA*.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам НИИ урологии им. Н.А. Лопаткина: д.м.н., проф. Перепановой Т.С. и к.м.н. Хазан П.Л.; сотрудникам ФГБУ НЦАГИП им. академика В.И. Кулакова: д.м.н., проф. Припутневич Т.В. и к.м.н. Любасовской Л.А.; сотрудникам ГБУЗ ЯО «ИКБ №1»: Ершовой М.Г. и Полетаевой Е.Д.; а также к.б.н. Круглову А.Н. и д.м.н. Ершовой О.Н. за предоставление бактериальных культур. **Выражаю искреннюю благодарность** сотрудникам лаборатории «Неорганические наноматериалы» НИТУ «МИСиС» и их руководителю д.ф.-м.н., проф. Штанскому Д.В. за предоставление образцов наноструктурированных пленок.

Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ д.в.н., проф. Светочу Э.А., д.б.н. Игнатову С.Г., к.м.н. Асташкину Е.И., к.б.н. Детушевой Е.В., к.б.н. Мухиной Т.Н., к.б.н. Кисличкиной А.А., н.с. Асланян Е.М., н.с. Детушеву К.В. и м.н.с. Новиковой Т.С. за помощь в проведении работ.

Особую благодарность выражаю моему научному руководителю к.б.н. Фурсовой Н.К. за оказанную помощь при выполнении диссертационной работы.