

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ  
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ И  
БИОТЕХНОЛОГИИ

На правах рукописи

Слукин Павел Владимирович

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

1.5.11. Микробиология

Диссертация  
на соискание учёной степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н. Фурсова Н.К.

Оболенск – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Клиническая значимость уропатогенных <i>E. coli</i> .....	12
1.2 Фенотипические особенности <i>E. coli</i> .....	14
1.3 Факторы вирулентности UPEC.....	19
1.4 Оценка вирулентности уропатогенных <i>E. coli</i> на животных моделях...	25
1.5 Устойчивость уропатогенных <i>E. coli</i> к антимикробным препаратам...	26
1.6 Геномы уропатогенных <i>E. coli</i> .....	30
1.7 Внутривидовое типирование уропатогенных <i>E. coli</i> .....	32
1.8 Заключение по Главе 1.....	38
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	40
2.1 Микробиологические методы.....	40
2.2 Молекулярно-генетические методы.....	46
2.3 Биоинформатические методы.....	48
2.4 Биологические методы.....	49
2.5 Статистические методы.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
ГЛАВА 3. КОЛЛЕКЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ.....	51
3.1 Источники выделения изолятов <i>E. coli</i> .....	51
3.2 Культурально-морфологические и ферментативные свойства штаммов <i>E. coli</i> .....	53
3.3 Заключение по главе 3.....	57
ГЛАВА 4. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ.....	58
4.1 Определение O-групповой принадлежности штаммов <i>E. coli</i> .....	58
4.2 Принадлежность штаммов <i>E. coli</i> к филогенетическим группам.....	59
4.3 Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов <i>E. coli</i> .....	59
4.4 Генотипирование штаммов <i>E. coli</i> методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК.....	60
4.5 Генетические группы штаммов <i>E. coli</i> .....	61
4.6 Заключение по главе 4.....	65

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ.....	67
5.1 Генетические детерминанты вирулентности <i>E. coli</i> , выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей.....	67
5.2 Определение принадлежности изучаемых <i>E. coli</i> к патогруппе UPEC.....	69
5.3 Оценка вирулентности штаммов <i>E. coli</i> на модели личинок <i>Galleria mellonella</i> .....	74
5.4 Разработка методических рекомендаций для оценки вирулентности на модели личинок <i>Galleria mellonella</i> .....	77
5.5 Заключение по главе 5.....	78
ГЛАВА 6. ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ.....	83
6.1 Чувствительность штаммов <i>E. coli</i> к антимикробным препаратам.....	83
6.2 Генетические детерминанты резистентности штаммов <i>E. coli</i> .....	86
6.3 Оценка антибактериального действия наноструктурированных пленок TiCaPCON на штаммы <i>E. coli</i> .....	90
6.4 Заключение по главе 6.....	91
ГЛАВА 7. ПОЛНЫЕ ГЕНОМЫ ШТАММОВ <i>E. COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ.....	95
7.1 Полные геномы штаммов <i>E. coli</i> группы O25-B2-ST131.....	97
7.2 Заключение по главе 7.....	108
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	112
ВЫВОДЫ.....	116
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ.....	118
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	119
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	122
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ...	149
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	152
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	153
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	154
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	155
ПРИЛОЖЕНИЕ Д.....	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Е.....	159
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж.....	161

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования**

Бактерии *Escherichia coli* могут быть как представителями нормальной кишечной микрофлоры, так и возбудителями кишечных, септических, респираторных, урологических и др. заболеваний [45, 215]. Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относятся к числу самых распространенных инфекций: не менее 150 млн. случаев заболеваний в год во всем мире, из которых на долю *E. coli* приходится порядка 50-70 % [114, 192, 265].

Разнообразие штаммов *E. coli* – возбудителей ИМВП или уропатогенных *E. coli* (UPEC), приводит к необходимости 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 О-антигенов, филогенетический анализ по Clermont и мультилокусное сиквенс-типирование [160]. В Российской Федерации описаны штаммы UPEC серогрупп O1, O2, O6, O7, O8, O16, O25 и O75; филогенетических групп 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 [13, 23, 26]. Наиболее распространенной группой UPEC в мире считается O25-B2-ST131, впервые зафиксированная в 2008 г. и распространенная во всех регионах мира [45, 61, 89, 106, 154, 180, 194, 209]. Широко распространены в мире также другие группы UPEC: D-ST405, A-CC10, O6-B2-ST73, O75-B2-CC14, O15-D-ST393 и др. [160, 209].

Среди штаммов UPEC широко распространена устойчивость к антимикробным препаратам (АМП): пенициллинам, сульфаниламидам, фторхинолонам, цефалоспорином и аминогликозидам [30, 181, 200]. При этом высока доля мультирезистентных штаммов (MDR), устойчивых к АМП трех и более функциональных групп [30, 86, 100, 175, 181, 200, 267]. Фенотип MDR ассоциирован с наличием генетических детерминант, определяющих устойчивость к бета-лактамам (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> 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.) [175, 238]. Кроме того, очень часто MDR штаммы обладают резистентностью к дезинфицирующим препаратам: четвертичным аммониевым соединениям и тяжелым металлам [102].

Штаммы UPEC обладают большим числом как структурных, так и секретируемых факторов вирулентности: адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма [175, 215, 241]. Идентификация факторов вирулентности позволяет оценить патогенные свойства штаммов, их клиническую и эпидемиологическую значимость [86, 91, 180, 184, 192, 215, 218]. Биологические особенности штаммов UPEC характеризует способность вызывать патологический процесс в модельных организмах. Особый интерес представляют эксперименты на личинках большой восковой моли *Galleria mellonella* [54], 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 UPEC [244].

Для коррекции функциональных нарушений и улучшения качества жизни пациентов с урологическими заболеваниями в современной медицине используется большое количество имплантатов: катетеров, стентов, сфинктеров и др. [55]. Использование имплантатов, а также урологические заболевания с образованием конкрементов (мочекаменная болезнь), приводят к формированию особой формы существования патогенных бактерий – биопленок. Бактерии в биопленках обладают особым фенотипом, характеризующимся невосприимчивостью к факторам иммунной системы макроорганизма и повышенной устойчивостью к воздействию АМП [21]. Рост устойчивости к АМП и распространенность биопленочных форм патогенов привели к необходимости использования альтернативных и вспомогательных антимикробных материалов [62]. Наиболее перспективными средствами для борьбы с биопленками и MDR штаммами UPEC считаются препараты наночастиц и новые конструкционные материалы с антибактериальными и антибиопленочными свойствами [74, 202].

### **Степень разработанности темы исследования**

Широкая распространенность ИМВП, вызванных *E. coli*, подчеркивается значительным количеством научных публикаций во всех регионах мира. Научные работы посвящены различным аспектам, связанным с UPEC: особенностям эпидемиологии, распространения и передачи возбудителя [16, 24, 30, 32, 91, 160, 161,

181, 192, 215, 233, 265], резистентности и обуславливающих ее детерминант [30, 91, 102, 173, 175, 180, 181, 185, 189, 192, 238, 256, 259], вирулентности отдельных штаммов, в том числе на биологических моделях [44, 54, 93, 147, 244], генетических детерминант вирулентности [14, 21, 116, 175, 215], генетических групп [45, 61, 89, 94, 106, 154, 160, 180, 194, 209], биопленкообразования [21, 143, 170, 203, 218] и других. Большое количество публикаций посвящено неклассическим методам профилактики и терапии ИМВП [33, 40].

Подробно изучены механизмы, генетические детерминанты, влияние внешних факторов и динамика процесса биопленкообразования [21, 31, 39, 143, 170, 203, 218]. Для противодействия образованию биопленок множество работ описывают различные варианты модификации поверхности имплантатов, в том числе модификации антимикробными препаратами и наночастицами, но только в небольшой части встречается оценка этих изделий на штаммах UPEC [74, 150, 236, 237, 247, 258].

В Российской Федерации в работах Летинова и соавт. 2019 г., Палагина и соавт. 2019 г., и Перепановой и соавт. 2012 г. описаны спектры и уровни резистентности к антимикробным препаратам у штаммов UPEC в различных медицинских учреждениях и регионах России [24, 30, 32]. В работах Аминева и соавт. 2013 г., Казанцева и соавт. 2018 и 2019 гг., Кузнецовой и соавт. 2018 г. и Макаровой и соавт. 2019 г. показана принадлежность штаммов UPEC к филогруппам, а также определение генетических детерминант вирулентности и сиквенс-типов [2, 13, 14, 23, 26].

### **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 изученных 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 % *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 *Escherichia 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., Приложение А), «Генетические детерминанты

вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.» (Свидетельство № 2021621432 от 01.07.2021 г., Приложение Б) и «CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности» (Свидетельство № 2021621482 от 07.07.2021 г., Приложение В), 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 последовательности 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, Приложение Г) – Учрежденческий уровень внедрения.

### **Методология и методы исследования**

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению темы исследования с использованием широкого спектра методов. Анализ научной литературы проведен формально-логическими методами. Создание коллекции штаммов уропатогенных *E. coli*, фенотипическая характеристика, определение чувствительность к антимикробным препаратам и новым материалам проводили микробиологическими методами. Видовое типирование проводили биохимическими и биофизическими методами. Детекция генов вирулентности, резистентности, O-групповой принадлежности, филогенетической принадлежности и «домашнего хозяйства», полногеномное секвенирование штаммов *E. coli* проводили молекулярно-генетическими методами. Обработка результатов секвенирования ДНК, сиквенс-

типирование, RAPD-типирование, анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов *E. coli* проводили биоинформатическими методами. Определение выживаемости и среднелетальной дозы штаммов *E. coli* проводили биологическими методами. Обработка результатов, анализ и визуализация полученных данных проводили статистическими методами.

### **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» 2021-2022 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 проведен биоинформатический анализ отдельных нуклеотидных последовательностей генов и 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 генов вирулентности и генов «домашнего хозяйства» 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 журналах и 11 тезисов устных и стендовых сообщений в материалах международных и всероссийских научных конференций.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Escherichia coli* принадлежат к роду *Escherichia* семейства *Enterobacteriaceae*. *E. coli* являются представителями нормальной кишечной микрофлоры всех млекопитающих и птиц. Патогенные штаммы *E. coli* могут вызывать кишечные и урологические заболевания, бактериемии и менингит, кроме того описаны респираторные инфекции, вызываемые этим возбудителем [22, 35, 215].

В соответствии с клинической значимостью, выделяют кишечные патогенные или диареегенные *E. coli* (IPEC или DEC) и внекишечные патогенные *E. coli* (ExPEC). Диареегенные *E. coli* подразделяют на: энтеротоксигенные (ETEC), энтеропатогенные (EPEC), энтероинвазивные (EIEC), энтерогеморрагические (EHEC), энтероаггегативные (EAEC), диффузно-адгезивные (DAEC) и адгезивно-инвазивные (AIEC), при этом шига-токсин продуцирующие *E. coli* часто объединяют в одну группу – STEC. Внекишечные патогенные *E. coli* подразделяют на возбудителей неонатального менингита (NMEC), сепсиса или инфекции кровотока (SEPEC или BSI), инфекции мочевыводящих путей *E. coli* (UPEC), колибактериоза птиц (APPEC), инфекции молочных желез (MPPEC) и эндометрия (EpPEC), а также *E. coli*, ассоциированные с колоректальным раком (CRC) и *E. coli*, возбудители трофических язв у больных диабетом [22, 132, 148, 209, 215, 221, 224].

### 1.1 Клиническая значимость уропатогенных *E. coli*

Принадлежность *E. coli* к патогруппе UPEC в большинстве медицинских и микробиологических исследований устанавливают по месту локализации возбудителя, выделение *E. coli* из мочи в концентрации  $>10^5$  КОЕ/мл [16, 79, 81, 85, 265]. Однако в отдельных работах UPEC идентифицируют по серотипу или набору генов вирулентности [34, 163, 215, 232].

Заболевания, вызываемые UPEC, относят к инфекциям мочевыводящих путей (ИМВП). ИМВП – это инфекционные заболевания, выражающиеся в воспалении уротелия, возникающие в ответ на появление в мочевыводящих путях патогенных микроорганизмов. Выделяют следующие группы заболеваний, связанные с инфекцией мочевыводящих путей: неосложненные, осложненные, рецидивирующие и катетер-ассоциированные ИМВП, а также уросепсис [16]. В зависимости от уровня локализации

выделяют: инфекции нижних мочевыводящих путей (уретрит – воспаление мочеиспускательного канала; цистит – воспаление мочевого пузыря) и инфекции верхних мочевыводящих путей (воспаление мочеточников; пиелонефрит – воспаление почек). Кроме того, отмечают воспаление одновременно верхних и нижних мочевыводящих путей, ИМВП без установленной локализации и бессимптомную бактериурию – выделение бактерий с мочой, без признаков воспалительного процесса [10, 16].

Согласно опубликованным исследованиям, ежегодно в мире диагностируется порядка 150 млн. случаев ИМВП [233]. Не менее 50 % женщин имеют хотя бы один случай заболевания ИМВП в течение жизни [10]. Заболеваемость ИМВП связана с половой принадлежностью (чаще у женщин), сексуальной активностью (чаще у сексуально активных людей) и возрастом пациента (чаще в возрасте от 18 до 70 лет), а также с сезонными и климатическими особенностями (чаще при низких температурах) [47, 168, 212, 230]. Серьезную проблему составляют ИМВП у детей: в России отмечаются 18 эпизодов ИМВП на 1000 младенцев и 5093 эпизодов на 100000 детей в возрасте до 14 лет [12, 41]. Особую озабоченность вызывают ИМВП при беременности, которые встречаются у 18 % беременных и очень часто вызывают осложнения как у матери, так и у ребенка [29]. Распространены ИМВП и при инфицировании в медицинских стационарах: за 2018 г. в России зафиксировано 2198 эпизодов (0,7 случаев на 1000 госпитализированных) [1].

*E. coli* - доминирующий возбудитель ИМВП, при этом доля вызванных ими заболеваний составляет от 39 до 81 % [10, 12, 29, 41, 91, 192, 265]. Так, многолетнее исследование возбудителей заболеваний у детей с ИМВП в Городской клинической больнице № 20 в г. Ростов-на-Дону показало, что доля *E. coli*, как возбудителя ИМВП, в 2000-2003 гг. составляла 57 % (второе место – у *S. epidermidis*, 20 %), в 2011-2012 гг. – 36 % (*Proteus spp.* 21 %, *S. epidermidis* 15 %), в 2017 г. – 55 % (*Klebsiella pneumoniae* и *Enterococcus faecalis* по 11 %) [24]. В 2015-2017 гг. в рамках исследования NoDARS (Northern Dimension Antibiotic Resistance Study) было показано, что *E. coli* являлись доминирующими возбудителями неосложненной ИМВП у женщин в Финляндии (50 %), Германии (51 %), Латвии (65 %), Польше (77 %), России (68 %) и Швеции (72 %) [181]. В 2017-2018 гг. в 32 медицинских центрах 24 городов России проводилось многоцентровое проспективное эпидемиологическое исследование «ДАРМИС-2018» по

изучению динамики антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных ИМВП в различных субпопуляциях пациентов. Согласно данным этого исследования, *E. coli* являлись доминирующим возбудителем внебольничных ИМВП среди взрослых людей (71 %), беременных женщин (74 %), а также среди детей и подростков (80 %). Доля взрослых пациентов с неосложненными ИМВП, вызванными *E. coli*, составляла 75 %, а с осложненными ИМВП, вызванными *E. coli*, – 67 % [30].

## 1.2 Фенотипические особенности *E. coli*

### *Морфологические, биохимические и культуральные свойства E. coli.*

*Escherichia coli* – это грамотрицательные короткие прямые палочки с закругленными концами, длиной от 2,0 до 6,0 мкм и шириной от 1,1 до 1,5 мкм, в мазках располагающиеся одиночно или парами. У бактерий большинства штаммов имеются капсулы или микрокапсулы. В большинстве случаев *E. coli* подвижны [34].

Биохимически *E. coli* весьма активны: ферментируют глюкозу, маннит, арабинозу и галактозу с образованием кислоты и газа; сбраживают лактозу; клетки оксидаза-отрицательные; каталазо-положительные; образуют индол; восстанавливают нитраты в нитриты; декарбоксилируют лизин, аргинин и орнитин; утилизируют ацетат натрия; не гидролизуют мочевины; не утилизируют цитрат; не продуцируют сероводород, лецитиназу и желатиназу; не синтезируют фенилаланиндезаминазу; не образуют ацетилметилкарбинол из глюкозы [19, 27, 34]. *E. coli* – факультативные анаэробы, хорошо растут на обычных питательных средах в диапазоне температур от 10 °С до 45 °С с оптимумом 37 °С при рН от 7,2 до 7,5. В жидких средах *E. coli* дают диффузный рост, вызывая помутнение среды и образование осадка, реже формируют поверхностную пленку или пристеночное кольцо. На плотных питательных средах образуют выпуклые мутные S-колонии с ровными или волнистыми краями, либо сухие плоские прозрачные R-колонии с неровными краями [19, 34]. S-колонии более вирулентны, биохимически более активны, образуют капсулу, формируют жгутики и обычно выделяются в остром периоде заболевания [5].

*Антигенная структура E. coli.* Бактерии *E. coli* характеризуются наличием O-, K- и H-антигенов. Наиболее информативными и значимыми в клинической практике считают O-антиген [34, 36], который является частью липополисахарида (ЛПС), формирующего внешнюю мембрану бактерии. Структурно ЛПС состоит из трех частей: липида А, закрепляющего ЛПС в мембране клетки; центрального олигосахарида (core,

коровый олигосахарид); и собственно О-антигена, отвечающего за специфичность штамма и его преимущество в экологической нише [151]. О-антиген штаммов UPEC способствует подавлению иммунитета: ослабляет индукцию цитокинов и хемокинов в эпителиальных клетках и способствует защите бактерий от фагоцитоза нейтрофилами и моноцитами [156, 249].

Для *E. coli* идентифицированы О-антигены с номерами от 1 до 187, однако антигены O31, O47, O67, O72, O94 и O122 отсутствуют, в то время как другие антигены имеют несколько подгрупп: O9 и O9a, O18ab и O18ac, O28ab и O28ac, O112ab и O112ac – таким образом на сегодняшний день описано 185 О-антигенов (О-серогрупп) *E. coli* [151]. Чаще всего гены синтеза О-антигена в геноме *E. coli* находятся в виде единого кластера, расположенного между двумя генами «домашнего хозяйства» – *galF* и *gnd*. Существует три основных класса генов синтеза О-антигена: гены синтеза нуклеотидных предшественников сахаров, гены гликозилтрансфераз, специфичных для донорных и акцепторных сахаров, а также гены процессинга олигосахаридных единиц для транслокации и полимеризации. Для *E. coli* описаны два пути процессинга – с помощью белков Wzx/Wzy или с помощью ABC-транспортера [151]. Одно из отличий между путями процессинга заключается в переносе олигосахарида через мембрану: это может осуществляться либо сначала флиппазой Wzx, а уже после происходит полимеризация белком Wzy, либо сначала полимеризуется олигосахарид, а уже после по специальному каналу из белков Wzm и Wzt происходит его перемещение [151]. Наличие специфичных генов для каждого О-антигена позволяет проводить детекцию О-групп *E. coli* методом ПЦР.

По данным литературы, UPEC чаще всего принадлежат к следующим О-серогруппам: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25, O29 и O75. Обычно доля штаммов с этими О-группами суммарно составляет от 40 до 90 % от выделяемых штаммов UPEC, оставшаяся часть штаммов представлена другими серогруппами [13, 34, 93, 104, 133, 171, 179, 198, 227]. Кроме того, доля нетипируемых по О-серогруппам штаммов достаточно велика, составляет – до 40 % [189]. Исследования, проведенные в Китае, Германии, Японии и Индии показали, что штаммы UPEC серогрупп O21, O26, O39, O42, O46, O51, O60, O74, O76, O77, O83, O92, O102, O105, O117, O120, O135, O145, O149, O150 и O153 являются «неклассическими» или «необычными» возбудителями ИМВП [104, 133, 179]. При этом, штаммы UPEC серогрупп O12, O15 и

O78 в данных исследованиях отнесены к «неклассическим», а в других исследованиях они отнесены к числу основных [34, 93, 104, 160]. Подобные расхождения свидетельствуют о наличии иных факторов, кроме O-антигена, обуславливающих принадлежность к UPEC. В России описаны штаммы UPEC, относящиеся к серогруппам O1, O2, O6, O7, O8, O16, O25, O75 и O83 [13].

K-антиген представляет собой полисахарид, формирующий капсулу *E. coli*, описаны более 80 полисахаридных капсульных K-антигенов. Согласно одной из классификаций, капсулы *E. coli* подразделяются на 4 группы. Капсулы первой группы образуют две формы K-антигенных полисахаридов: низкомолекулярные, связанные через коровый олигосахарид с липидом А, и высокомолекулярные, образующие капсулу, весьма сходную по строению с капсулами *Klebsiella* и *Erwinia*. Высокомолекулярная капсула может «маскировать» O-антиген при серотипировании, она содержит кислые полисахариды и коэкспрессируется с ограниченным числом O-антигенов – O8, O9, O20 и O101. Капсулы второй и третьей групп связаны с клеткой через фрагмент  $\alpha$ -глицерофосфата и напоминают полисахариды *Neisseria meningitidis* и *Haemophilus influenzae*. Капсулы четвертой группы состоят из полисахаридов, аналогичных полисахаридам O-антигена, но не связанных с ними биосинтетическим происхождением [58, 214, 252]. Капсулы 1 и 4 групп формируются аналогично O-антигенам по Wzx/Wzy-пути: сначала осуществляется перенос олигосахаридов через мембрану (транслокация), а уже после этого полимеризация олигосахаридных остатков. Перенос олигосахаридов капсулы 1 типа осуществляют белки Wza, Wzc и Wzb, а для капсулы 4 типа система транслокации не известна. Полимеризацию олигосахаридов капсулы 1 типа осуществляют белки Wzx, Wzy и WbaP, а капсулы 4 типа – белок WecA. Капсулы групп 2 и 3 формируются по ABC-пути, составными частями которого являются белки полимеризации, кодируемые опероном *kfiABCD* (для антигенов K5 и K10) или опероном *neuDBACES* (для антигенов K1), и белки переноса полисахаридов через плазматическую мембрану, кодируемые опероном *kpsFEDUCSTM* [58, 214, 252]. Большинство UPEC штаммов имеют капсулу второй или третьей группы и антигены K1, K2, K5, K12 или K13 [34, 252].

H-антиген – основной белковый компонент жгутиков, участвующих в движении *E. coli*. Описано 53 H-антигена, обозначенных H1-H56, при этом антигены H13, H22 и

H50 отсутствуют. Белок H-антигена кодируется геном *fliC*. У неподвижных *E. coli* H-антиген обычно не идентифицируется [34, 36, 170].

**Бактериоцины.** *E. coli*, и UPEC в частности, могут продуцировать рибосомально синтезируемые пептиды – бактериоцины, оказывающие антимикробное действие в наномолярных концентрациях. При этом сами бактерии к собственным бактериоцинам невосприимчивы, вследствие наличия у них факторов иммунитета [125]. У UPEC идентифицированы два типа бактериоцинов: колицины и микроцины.

Колицины – высокомолекулярные (25-80 кДа) пептиды, активные в отношении других штаммов *E. coli* и близкородственных бактерий, таких как *Salmonella* и *Shigella* [125]. Описано более 30 типов колицинов, из них 21 тип изучен подробно: продукция колицина регулируется системой окислительного стресса и происходит, в основном, при истощении питательных веществ, недостатке кислорода, повреждении ДНК или УФ-облучении. Колицины кодируются плазмидами, их опероны состоят из генов токсина, иммунитета (белка защиты от колицина) и белка-лизиса. Молекулы токсина связываются с белками внешней мембраны клетки-мишени, проникают в клетку, взаимодействуя с Tol или Ton комплексом периплазматических белков и разрушают клетку с помощью одного из механизмов: порообразования (колицины A, B, E1, Ia, Ib, K, L, N, U, 5 и 10), неспецифической активности ДНКазы (колицины E2, E7, E8 и E9) или ингибирования биосинтеза белка путем расщепления молекул 16S рРНК или тРНК (колицины E3, E4, E6, E5 и D) [125, 126].

Микроцины – низкомолекулярные (<10 кДа) пептиды, которые, как и колицины, секретируются в условиях истощения питательных веществ, но менее зависимы от системы окислительного стресса. Описано 14 микроцинов, которые обладают антибактериальной активностью против *E. coli* и близкородственных видов. Опероны, кодирующие микроцины, расположены на плазмидах или хромосоме, и включают в себя гены предшественника микроцина, белка иммунитета, фермента посттрансляционной модификации и фактора секреции [125, 126]. Согласно одной из классификаций, микроцины делятся на низкомолекулярные (1-5 кДа), кодируемые оперонами, локализованными только на плазмидах (из них наиболее изучены микроцины B17, C7, C51, J25, D93); и высокомолекулярные (5-10 кДа), кодируемые как плазмидными, так и хромосомными оперонами (из них наиболее изучены микроцины E492, V, L, H47 и 24) [95, 126, 164].

**Биопленки** – структурированные бактериальные сообщества, встроенные в продуцируемый бактериальными клетками матрикс, прикрепленные к абиотической или биотической поверхности. Бактерии в виде биопленочной культуры обладают повышенной устойчивостью к антимикробным препаратам, измененной вирулентностью и повышенным уровнем противодействия механизмам иммунной системы макроорганизма, в том числе фагоцитозу [11, 51, 98]. Биопленочные и планктонные культуры являются разными фенотипическими состояниями бактерий. Экспрессия разных генов у них приводит к значительной разнице в фенотипических свойствах, в частности, биопленки могут быть более устойчивыми к антимикробным препаратам, по сравнению с планктонной культурой, в 1000 и более раз [11, 143]. На этом различии основан один из методов детекции биопленок [235]. Устойчивость биопленок обусловлена рядом факторов: наличием межклеточного матрикса, препятствующего проникновению антимикробных препаратов к клеткам; наличием физиологически неактивных персистирующих клеток; наличием клеток с повышенным уровнем экспрессии белков ответа на стресс, в том числе эффлюксных насосов [21, 43]. Антимикробные препараты различаются по степени проникновения в биопленки: аминогликозиды и бета-лактамы незначительно проникают в биопленки, в то время как фторхинолоны способны проникать достаточно эффективно [203].

Биопленки состоят из клеток и внеклеточного матрикса. Бактерии в составе биопленок могут быть физиологически активными, персистирующими и мертвыми. Физиологически активные клетки могут иметь разные фенотипы, в зависимости от места расположения в биопленке [170, 218]. Внеклеточный матрикс биопленок *E. coli*, в том числе UPEC, включает в себя курли-волокна, поли-N-ацетилглюкозамин, целлюлозу, колановую кислоту, жгутики и ряд других компонентов. В зависимости от окружающих условий, компоненты матрикса биопленок могут находиться в различных комбинациях [219]. Основным компонентом матрикса биопленок UPEC – курли-волокна – выполняет структурные, механические и адгезивные функции, синтез курли-волокон кодируется двумя оперонами – *csgABC* и *csgDEFG*. Первый из них включает гены структурных компонентов курли-волокон, а второй состоит из генов, контролирующих транспорт структурных белков через мембрану, а также гена транскрипционного регулятора CsgD, который активирует множество генов и сам находится под влиянием большого количества регуляторов [170].

Для изучения биопленок разработано большое число *in vitro* моделей [75], которые могут быть классифицированы по их расположению на разделе фаз: твердое тело/жидкость, жидкость/газ и твердое тело/газ. Модели биопленок на разделе фаз твердое тело/жидкость наиболее часто используются, поскольку позволяют моделировать первый из изученных процессов биопленкообразования – биообрастание, что аналогично процессу образования биопленок на костных, тканевых, дентальных и урологических имплантатах, а также на эпителиальных и эндотелиальных тканях. К таким моделям относят формирование биопленок на планшетах, купонах и аппаратах для изучения механических свойств биопленок [75, 127, 129, 188, 228]. Модели биопленок на разделе фаз жидкость/газ позволяют изучать поверхностные биопленки – пелликулы, однако подобные биопленки нехарактерны для патогенных бактерий, поэтому их редко используют. Модели биопленок на разделе фаз твердое тело/газ наиболее распространены, поскольку моделируют биопленки на раневых поверхностях и в полостях тела на эпителиальных тканях. Наиболее распространенной является модель макроколоний бактерий на искусственных питательных средах, с помощью которой изучают процессы регуляции биопленкообразования [170, 176].

Для изучения способности штаммов UPEC формировать биопленки широко используют планшетную модель биопленки на разделе фаз твердое тело/жидкость, хотя данная модель не является вполне адекватной естественным биопленкам UPEC [140, 153, 225]. Кроме того, биообрастание урологических имплантатов моделируют по принципу формирования биопленок на разделе фаз твердое тело/жидкость, используя в качестве купонов урологические стенты и катетеры [7, 8].

### 1.3 Факторы вирулентности UPEC

Для уропатогенных *E. coli* описано множество факторов вирулентности: адгезины, токсины, факторы поглощения железа и факторы защиты от иммунной системы макроорганизма. Генетические детерминанты вирулентности UPEC могут быть локализованы как на плазмидах, так и в бактериальной хромосоме. Отличительной особенностью UPEC от других патогрупп *E. coli* является отсутствие у них доказанной прямой связи между характером и тяжестью заболевания и наличием у патогена того или иного фактора вирулентности [130, 217].

**Адгезины** – белки, которые служат для прикрепления к биотическим или абиотическим поверхностям. По структуре и функциям адгезины подразделяются

(таблица 1.1) на фимбриальные адгезины, расположенные на белковых органеллах – фимбриях или пиях и образуемые с помощью usher/chaperone-белков (фимбрии: S, F1C, P, Auf, типа I, типа 3, типа 9, Lpf, Dr и др.), афимбриальные фибрилльные адгезины, образующие нитчатые структуры (Afa, курли) и нефибрилльные адгезины, состоящие из одной белковой субъединицы (адгезин M, Iha-белок, Tos-адгезин, Антиген 43, UraB, UraG, UraH и FdeC) [21, 56, 68, 131, 255].

Таблица 1.1 – Адгезины уропатогенных *Escherichia coli*

Группа	Название	Функции	Ссылка
Адгезины S-подобных фимбрий	фимбрии 1, 3 и 9 типа; S-, F1C-, Auf-, Lpf- и Yad-фимбрии	прикрепление к уротелию, инвазия, образование биопленки, прикрепление к абиотическим поверхностям и межклеточным белкам	[22, 56, 63, 68, 117, 131, 135, 147, 187, 206, 245, 251, 254, 255]
	G-, Mat- (Ecp-), Yfc-, Ycb-, Stg-, Sfm-, Yra-, Yeh-, F17/G-, K88-, K99-, Pix-, Yqi-, Ygb-фимбрии	вклад в уропатогенность не выявлен	[116, 255]
Адгезины Dr-подобных фимбрий	Dr- и F1845-фимбрии	прикрепление к уротелию, абиотическим поверхностям и межклеточным белкам, связывание Dr-рецептора групп крови	[56]
Афимбриальные фибрилльные адгезины	Afa-I, Afa-II, Afa-III, Afa-IV, Afa-V, Afa-VII, AfaVIII, Aaf-I, Aaf-II, и Aaf-III	прикрепление к уротелию, абиотическим поверхностям и межклеточным белкам, связывание Dr-рецептора групп крови	[56]
	курли-волокна	образование биопленки, прикрепление к абиотическим поверхностям и межклеточным белкам	[22, 68]
Нефибрильные адгезины - белки внешней мембраны	Dr-II и Nfa-I	прикрепление к уротелию, абиотическим поверхностям и межклеточным белкам, связывание Dr-рецептора групп крови	[56]
	Iha-адгезин	прикрепление к уротелию	[22, 68, 215]
	адгезин M	вклад в уропатогенность не выявлен	[262]
Нефибрильные адгезины - ауто транспортеры	антиген 43, UraB-, UraG-, UraH- и FdeC-адгезин	прикрепление к межклеточным белкам: коллагену V, фибронектину, фибриногену и ламинину	[68, 116, 215, 248]
Нефибрильные адгезины с 1 типом секреции	Tos-адгезин	прикрепление к уротелию	[155]

Нефибрильные адгезины по способу выведения белковых субъединиц различаются на белки внешней мембраны (встраиваются во внешнюю мембрану

самостоятельно или при помощи специальных белков-транспортеров), аутоотранспортеры (самостоятельно проходят мембраны бактерии с отщеплением C-конца полипептидной цепи) и адгезины с 1 типом секреции (выводятся специальным комплексом белков) [22, 56, 68, 116, 155, 215, 248].

Разные авторы описывают различные адгезины UPEC и их генетические детерминанты. Это объясняется неясным вкладом каждого из них в патогенез UPEC - инфекции. Тем не менее, среди описанных многочисленных адгезинов UPEC можно выделить доминирующие. К ним относятся адгезины фимбрий I типа и основного белка курли-волокон, гены которых *fimH* и *csgA* обычно содержатся у всех или подавляющего большинства штаммов UPEC [22, 52, 139, 154, 201]. Гены фибриллярных адгезинов *sfaS*, *focG* и *pap*, а также ген Dr-адгезина *afa/draBC* описаны у 5-64 %, 8-58 %, 33-81 % и 5-23 % штаммов, соответственно [61, 134, 154, 174, 201, 220, 260]. Ген *iha* описан у 46-68 %, а ген *tosA* – у 11 % штаммов UPEC [52, 154, 189]. В работе Казанцева и соавт., 2019 г. показано, что среди штаммов UPEC встречаемость гена *fimH* составляла 99 %, *sfa* – 15 %, *pap* – 57 %, *afa* – 5 %, а *iha* – 58 % [14].

**Токсины.** Патогенность микроорганизмов во многих случаях связана со способностью продуцировать токсины – белковых или небелковых молекул, которые вызывают патологические изменения в организме хозяина. У UPEC описано несколько групп токсинов: цитолизины, цикломодулины и генотоксины, а также аутоотранспортные токсины [64, 215].

К цитолизинам UPEC отнесен гемолизин, который может внедряться в мембраны многих типов клеток хозяина, включая уроэпителиальные клетки, и поражать их. Гемолизин способствует инвазии патогена, стимулирует выработку иммунокомпетентными клетками хозяина цитокинов и воспалительную реакцию. Однако основной патологический эффект гемолизина связан с лизисом эритроцитов, вследствие чего происходит высвобождение железосодержащих молекул гема, которые усваивает патоген [22]. Оперон синтеза гемолизина UPEC *hlyCABD* расположен на четырех островах патогенности (PAI I<sub>536</sub>, PAI II<sub>536</sub>, PAI I<sub>96</sub> и PAI II<sub>96</sub>) в хромосоме бактерии. У UPEC может присутствовать также оперон синтеза EPEC-гемолизина, который аналогичен оперону UPEC-гемолизина, но расположен на большой плазмиде вирулентности EPEC pO157 [15, 64].

К цикломодулинам UPEC отнесены цитотоксический некротизирующий фактор Cnf и цитолетальный расширяющий токсин Cdt. Кроме того, UPEC могут продуцировать токсин Cif, характерный для штаммов патотипов EPEC и EHEC, и колибактин, свойственный для *E. coli*, ассоциированных с колоректальным раком [172].

Токсин Cnf, кодируемый геном *cnf1*, активирует семейство Rho GTP-связывающих белков в клетках мочевого пузыря, что приводит к перестройке их цитоскелета и последующему апоптозу [178, 215]. Токсин Cdt, кодируемый геном *cdt*, вызывает фрагментацию ядра, остановку клеточного цикла, необратимый мегалоцитоз (увеличение клетки) и гибель эукариотической клетки [22, 137].

Из группы генотоксинов в UPEC широко распространен токсин Usp – специфичный для этой патогруппы белок, кодируемый геном *usp*. На сегодняшний день установлено, что этот токсин является неспецифической ДНКазой, принадлежащей к семейству нуклеаз HNH, обладающих гидролазной активностью в отношении плазмид и токсическим действием на клетки млекопитающих [207, 210].

К автотранспортным токсинам UPEC принадлежат сериновая протеаза Sat, вакуолизирующий токсин Vat и «колонизационная» протеаза Pic [215]. Секретируемый токсин Sat оказывает цитопатическое действие на клетки мочевого пузыря и почек [178, 215]. Колонизационная протеаза Pic обладает муциназной активностью и стимулирует окислительный взрыв в клетках хозяина [22, 171, 178, 189, 215, 256]. Хотя все автотранспортные токсины (Sat, Pic и Vat) экспрессируются во время инфекции, но данные об их участии в патогенезе UPEC-инфекции не вполне выяснены и противоречивы [22].

По данным ряда авторов, гены *hlyA* и *cnf1* широко распространены среди UPEC: в 37-76 % и 14-83 % штаммов, соответственно [52, 134, 154, 220]. В работе Vozcal et al., 2018 в Турции доля штаммов UPEC с генами *hlyA* и *cnf1* была ниже и составляла 15 и 7 %, соответственно [61]. В Китае, Алжире и Мексике ген *vat* был идентифицирован в 6-40 % штаммов UPEC [52, 93, 189, 256]. Ген *sat*, согласно опубликованным данным, был детектирован в 33-61 % штаммов UPEC, а ген *usp* – в 3-59 % штаммов [14, 51, 52, 154, 174]. В исследовании Казанцева и соавт., 2019 среди штаммов UPEC в России встречаемость гена *hlyA* составляла 42 %, а гена *vat* – 23 % [14].

**Системы поглощения железа.** Одним из ключевых жизненно важных факторов для UPEC в мочевыводящих путях является содержание железа, для обеспечения которым бактерии используют несколько факторов вирулентности.

Основой комплексов, обеспечивающих *E. coli*  $Fe^{3+}$  являются специфические небелковые компоненты – сидерофоры, которые осуществляют поглощение ионов железа из внешней среды. У UPEC описаны сидерофоры энтеробактин, сальмохелин, иерсиниабактин и аэробактин [101, 215]. Энтеробактин (энтерохелин, ферриэнтерохелин) и сальмохелин являются производными катехолата, иерсиниабактин – тиазолина, а аэробактин – гидроксамата. Гены белки синтеза энтеробактина расположены на хромосомном опероне *entABCDEFGHI/fepAECGDB*, следует отметить, что данный сидерофор встречается у многих энтеробактерий. Оперон синтеза сальмохелина – *iroBCDEN* изначально описан у *Salmonella enterica*, позже найден у UPEC в составе островов патогенности PAI III<sub>536</sub> и PAI II<sub>CFT073</sub>. Гены синтеза иерсиниабактина первоначально описаны в составе острова высокой патогенности *Yersinia*, у UPEC включают в себя оперон синтеза сидерофора *ybtSETU*, оперон транспортных белков *ybtXQPA*, регуляторные гены *irp1* и *irp2*, а также ген рецептора *fyuA*, расположенные на острове патогенности PAI IV<sub>536</sub>. Синтез аэробактина осуществляется белками, закодированными в опероне *iucABCD*, а активация – рецептором *iutA*, расположенными на острове патогенности PAI I<sub>CFT073</sub> [101, 215].

Обеспечение *E. coli*  $Fe^{2+}$  осуществляется с помощью белковых продуктов хромосомного оперона *sitABCD*, однако вклад продуктов этого оперона в патогенез UPEC не ясен. При этом предполагается вклад продуктов данного оперона в резистентность к перекисным соединениям [92].

Кроме сидерофоров (переносчиков ионов железа) у UPEC имеются гемофоры – системы связывания и поглощения гема [21]. Самым распространенным гемофором является белок ChuA, который осуществляет захват и трансмембранный перенос гема с ионом железа. Предполагается высокий вклад этого фактора в колонизацию мочевыводящих путей, поэтому ген *chuA* используют для идентификации штаммов UPEC [57, 215, 232].

Ген рецептора иерсиниабактина *fyuA* описан у штаммов 11-81 % штаммов UPEC [51, 174, 190], ген рецептора аэробактина *iutA* – у 62-92 % штаммов, а ген рецептора сальмохелина *iroN* – у 36-68 % штаммов [51, 52, 61, 134, 154, 174, 190, 220]. Ген *sitA*

детектирован у 62 % штаммов UPEC [190]. В работе Казанцева и соавт., 2019 ген рецептора сальмохелина *iroN* описан у 36 % штаммов UPEC в России, ген оперона аэробактина *iuc* – у 77 %, ген оперона иерсиниабактина *irp2* – у 79 % штаммов [14].

**Факторы защиты от иммунной системы макроорганизма.** Совокупность факторов вирулентности, которые обеспечивают защиту патогенных бактерий от факторов иммунной системы макроорганизма-хозяина включает капсулы и некоторые белки внешней мембраны. Капсула защищает патогенные *E. coli*, в том числе UPEC, от действия фагоцитов и системы комплемента [96]. Согласно опубликованным данным, ген транспортера капсулы второй группы *kpsMTII* содержится в 13-67 % штаммов UPEC, а ген транспортера капсулы третьей группы *kpsMTIII* – в 0-47 % штаммов [14, 51, 61, 134, 174, 260]. TraT – липопротеин наружной мембраны *E. coli*, который обеспечивает устойчивость патогена к бактерицидному действию сыворотки крови путем вмешательства в комплемент-опосредованный лизис. Ген липопротеина TraT находится на F-плазмидах как необходимый компонент конъюгации [116]. OmpT – протеаза внешней мембраны *E. coli*, которая гидролизует иммуноглобулины или другие белки иммунной защиты. Ген синтеза протеазы OmpT локализуется на бактериальной хромосоме или на плазмидах. Предполагается наличие большого количества аллелей OmpT протеазы, однако на сегодняшний момент этот вопрос слабо изучен [82, 116]. Ген *traT* встречается у 59-73 % штаммов UPEC, а ген *ompT* – у 67-77 % штаммов [14, 51, 174, 190].

**Факторы вирулентности, обуславливающие принадлежность *E. coli* к патотипу UPEC.** На сегодняшний день нет общепризнанной системы идентификации штаммов UPEC по наличию у них определенного набора факторов вирулентности или их генетических детерминант. Согласно работе Spurbek et al., 2012, к патогруппе UPEC могут быть отнесены штаммы, несущие комбинацию генов *vat*, *yfcV*, *fyuA* и *chuA*, детерминирующих, соответственно, автотранспортный токсин Vat, адгезин Yfc, рецептор сидерофора иерсиниабактина и гемофора [232]. По мнению Marrs et al., 2002, к патогруппе UPEC принадлежат штаммы, несущие одну из комбинаций генов: *cnf1*, *hlyA* и *papGIII*; *cnf1*, *hlyA* и *sfaS/focG*; *iutA*, *hlyA* и *papGII*; *iutA*, *kpsMT*, *ompT* и *afa*; или *kpsMT* и *ompT* [163]. Названные работы противоречат друг другу, а также работе Sarowska et al., 2019, в которой не определена комбинация генов вирулентности в UPEC штаммах, однако показана важность наличия генов *fimH*, *iha*, *csgA*, *agn43*, *sit*, *pic* и *sat* [215].

#### 1.4 Оценка вирулентности уропатогенных *E. coli* на животных моделях

Для оценки вирулентных свойств штаммов UPEC используют лабораторных животных: млекопитающих, грызунов, рыб и насекомых [54, 93]. Развитие биоэтических требований ограничивает широкое использование высокоорганизованных животных, таких как собаки, обезьяны, свиньи и др. Анатомо-физиологическое строение мочевыводящих путей птиц (наличие клоаки, отсутствие мочевого пузыря, высокое содержание мочевой кислоты и низкое содержание мочевины) не позволяет их считать высоковалидной моделью ИМВП человека. Значительные недостатки есть и у модели на классических лабораторных животных – грызунах, а именно низкая восприимчивость к вирулентным штаммам UPEC, а также существенные различия с физиологией человека [54, 93, 177, 209]. Достаточно широко для моделирования ИМВП используют низкоорганизованных животных: рыб, нематод и насекомых, в частности личинок большой восковой моли *Galleria mellonella* [54, 195, 216, 244].

Несмотря на таксономическую удаленность насекомых и млекопитающих, инфекционные процессы у них имеют общие черты. Это объясняется тем, что иммунная система *G. mellonella* демонстрирует высокую степень сходства с иммунной системой млекопитающих [84, 244]. В частности, у личинок этого вида насекомых клеточный иммунитет обеспечивается гемоцитами гемолимфы, аналогами лейкоцитов млекопитающих, которые участвуют в фагоцитозе, а гуморальный иммунитет обеспечивается наличием в гемолимфе более 18 типов антимикробных пептидов [244]. Для ряда микроорганизмов была установлена корреляция между их вирулентностью для *G. mellonella* и млекопитающих [111, 122, 186]. На модели личинок *G. mellonella* производят оценку интегративной вирулентности штаммов UPEC, а также эффективность лечебных препаратов и бактериофагов [44, 162, 267]. В ряде исследований отмечена важность ЛПС UPEC как фактора патогенности для личинок *G. mellonella*: наибольшую вирулентность для личинок восковой моли имели штаммы UPEC серогрупп O2 и O6. В то же время, не было установлена корреляции вирулентности UPEC для личинок с какими-либо другими факторами патогенности UPEC. Интересно отметить, что для личинок *G. mellonella* наибольшей вирулентностью обладали штаммы UPEC широко распространенных в мире генетических групп: ST69, ST73 и ST127 [44].

### 1.5 Устойчивость уропатогенных *E. coli* к антимикробным препаратам

Антимикробные препараты (АМП) – это вещества, проявляющие бактерицидное или бактериостатическое действие на микробные клетки. К ним относят антибиотики, антисептики и дезинфектанты [6, 17]. Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности микроорганизмов-продуцентов и их модификации, обладающие высокой активностью против определенных групп микроорганизмов, избирательно задерживающих их рост либо полностью подавляющих развитие, воздействующие на специфичные для каждой группы антибиотиков молекулярные мишени в прокариотической клетке [9].

Для терапии бактериальных ИМВП используют препараты, доставляемые в мочевыделительную систему в активной форме – уросептики, к которым относят фторхинолоны, амоксициллин, амоксициллин/клавуланат, ампициллин, ампициллин/сульбактам, цефалоспорины II-IV поколений, фосфомицин, нитрофурантоин, ко-тримоксазол и аминогликозиды. Выбор препарата для лечения ИМВП осуществляют на основании анализа заболевания, его тяжести, а также чувствительности к нему возбудителя [12, 16, 18, 32].

Антисептики – вещества, применяемые для уничтожения микроорганизмов на биотических поверхностях (кожном покрове и слизистой оболочке). Дезинфектанты – вещества, применяемые для уничтожения микроорганизмов на абиотических поверхностях при уборке помещений, для обеззараживания медицинских изделий и биологических отходов, а также для обеззараживания питьевой воды [105]. Одно и то же вещество может быть использовано в качестве дезинфектанта или антисептика, в зависимости от концентрации [6]. К антисептикам/дезинфектантам относят окислители (перекиси, надкислоты и др.), альдегиды, бигуаниды, соединения тяжелых металлов (серебра и др.), спирты, третичные амины, четвертичные аммониевые соединения и другие вещества (фенолы, лактоны, акринидины, анилиды, диамидины, кислоты, щелочи, ПАВ, красители, эфирные масла и препараты растительного происхождения) [4].

**Устойчивость UPEC к антимикробным препаратам.** Уровни чувствительности бактерий к антибиотикам определяют с помощью значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) и интерпретации полученных значений в соответствии с рекомендациями [157, 181]:

- чувствительные штаммы (sensitive, S) или штаммы с S-фенотипом – чувствительные ко всем используемым для лечения данной инфекции антибиотикам;
- резистентные штаммы (resistant, R) или штаммы с R-фенотипом – устойчивые как минимум к одному антибиотику из одного или двух функциональных групп;
- полирезистентные штаммы (multidrug-resistant, MDR) – устойчивые как минимум к одному антибиотику из трех или более функциональных групп;
- экстремально резистентные (extensively drug-resistant, XDR) – устойчивые по крайней мере к одному антибиотику во всех классах, кроме одного или двух функциональных групп;
- панрезистентные (pandrug-resistant, PDR) – устойчивые ко всем антибиотикам всех функциональных групп, используемым для лечения данной инфекции.

Для оценки уровней чувствительности бактерий к антисептикам и дезинфектантам принят показатель *cut-off*, как пороговая концентрация для группы штаммов, и *ECOFF*, как эпидемическая значимая величина *cut-off*. В отличие от МПК значений антибиотиков, параметр *ECOFF* определяет не эффективность использования, а нормальность распределения МПК для данного вида бактерий, при этом все штаммы, у которых МПК находятся внутри этого распределения, считаются диким типом, а изоляты с МПК выше этого значения – устойчивыми мутантами [173, 243].

На сегодняшний день описаны молекулярные механизмы формирования устойчивости у бактерий для всех известных функциональных групп АМП. Выделяют 5 основных групп механизмов устойчивости к АМП: деградация или инактивация молекул антибиотика, модификация мишени действия, активное выведение АМП из микробной клетки (эффлюкс), изменение проницаемости внешних оболочек/клеточной стенки и активация метаболического шунта [42, 70, 110, 166]. Существует два генетических механизма формирования резистентности бактериального штамма к АМП: мутационные изменения собственного генома бактериальной клетки или приобретение генетических детерминант устойчивости в результате горизонтального переноса генов [37, 166]. Наличие данных механизмов приводит к необходимости не только анализа непосредственно детерминант резистентности, но и анализа мобильных генетических элементов (плазмид, интегронных кассет и др.). Кроме генетических механизмов резистентности к АМП, описана фенотипическая резистентность при формировании биопленки [21, 43]. При этом устойчивость к АМП возникает вследствие ограниченной

проницаемости АМП через матрикс биопленки, наличия большого количества физиологически неактивных клеток, активации эффлюксных насосов и других механизмов.

Показано, что UPEC инфекции зачастую ассоциированы с R- и MDR-штаммами *E. coli*. Доля штаммов с MDR-фенотипом в различных исследованиях составляла от 14 до 96 %, а с XDR-фенотипом – от 4 до 16 % [52, 76, 100, 181, 182, 267]. В публикации Ballesteros-Monrreal et al., 2020 из Мексики описан штамм UPEC с PDR-фенотипом [52]. Исследование NoDARS, проведенное в 2015-2017 гг., показало, что в России среди уропатогенных *E. coli*, выделенных от женщин с ИСМП, доля штаммов, устойчивых к ампициллину, составляла 44 %, к ципрофлоксацину – 29 %, к триметоприму – 28 %, к амоксициллину/клавуланату – 19 %, к цефуроксиму – 18 %, к цефотаксиму – 16 %, к цефтазидиму – 14 %, к гентамицину – 13 %, к цефокситину – 5 %, к фосфомицину и нитрофурантоину – по 1 %, к меропенему – 0 %. Доля MDR штаммов в данном исследовании составила 27 %. Общий уровень устойчивости среди штаммов UPEC, выделенных в России в данном исследовании, оказался выше, чем у штаммов, выделенных в Финляндии, Германии, Латвии, Польши и Швеции [181]. Многоцентровое проспективное эпидемиологическое исследование «ДАРМИС-2018», проведенное в 2017-2018 гг. в 32 медицинских центрах 24 городов России, показало, что среди уропатогенных *E. coli*, выделенных от взрослых пациентов, доля штаммов, устойчивых к ампициллину составляла 58 %, к амоксициллину/клавуланату – 43 %, к ципрофлоксацину – 39 %, к цефиксиму и цефотаксиму – по 25 %, к цефепиму и цефтазидиму – по 24 %, к тобрамицину – 22 %, к цефтибутену – 21 %, к нетилмицину – 17 %, к гентамицину – 14 %, к пиперациллину/тазобактаму – 13 %, к нитрофурантоину, фосфомицину и амикацину – по 2 %, к имипенему, меропенему и эртапенему – по 1 % [30].

В исследовании Morrissey et al., 2014 у *E. coli*, выделенных в Европейском Союзе, определены уровни *ECOFF* антисептиков: триклозана – 16 мг/л, хлоргексидина – 64 мг/л, бензалкония хлорида – 128 мг/л [173]. Уровни чувствительности UPEC к антисептикам определены в работе британских ученых, МПК полигексаметиленгуанидина находились в диапазоне от 0,2 до 1,0 мг/л, МПК триклозана – от 0,00001 до 0,20000 мг/л, МПК бензалкония хлорида – 15,6 мг/л [102].

Резистентный и полирезистентный фенотипы UPEC были ассоциированы с наличием генетических детерминант, определяющих устойчивость к бета-лактамам (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> и *bla*<sub>OXA</sub>), аминогликозидам (*aac*, *aad*, *ant* и *aph*), сульфаниламидам (*dfr* и *sul*) и другим АМП, а также наличием интегронов [175, 238]. Гены бета-лактамаз CTX-M-типа детектировали в 22-56 % штаммов UPEC, TEM-типа – в 15-75 %, OXA-типа – в 6-42 % [45, 77, 91, 100, 175, 180, 190, 263]. Гены бета-лактамаз SHV-, NDM-, KPC-, IMP- и VIM-типов детектировали в отдельных исследованиях у 1, 1, 2, 9 и 10 % штаммов UPEC, соответственно [91, 192, 259]. Гены интеграз классов 1 и 2 были идентифицированы у 9-65 % и 1-7 % штаммов UPEC, соответственно в работах Ebrahim-Saraie et al., 2018, Ochoa et al., 2016 и Oliveira-Pinto et al., 2017 [86, 182, 184]. При этом, самой распространенной в мире генной кассетой интегронов класса 1, встречающейся у *E. coli* разных патогрупп, являлась кассета *aadA5~dfrA17~qacE~sul1*, которая, кроме генов резистентности к аминогликозидам и сульфаниламидам, несла ген устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям [112, 209]. В штаммах UPEC детектировали и другие гены резистентности, так, в исследовании Nüesch-Inderbinen et al., 2017, в Швейцарии в 2 % штаммов *E. coli* детектировали ген резистентности к аминогликозидам и фторхинолонам *aac(6')-Ib-cr*, а в 14 % штаммов – ген резистентности к макролидам *mphA* [180]. В 2016 г. в Пекине из мочи пациента с ИМВП был выделен штамм *E. coli*, несущий ген устойчивости к колистину *mcr-1*, примечателен тот факт, что колистин не используется для лечения заболеваний мочевыводящих путей [259]. Кроме интегронов, в штаммах *E. coli* разных патогрупп, в том числе UPEC, встречаются генетические кластеры резистентности к антимикробным препаратам (комплексные области резистентности, complex resistance region, CRR), которые включают несколько генов резистентности, а иногда и интегронные структуры [112, 152, 169]. Следует отметить, что распространенность генетических детерминант резистентности к антибиотикам среди штаммов внебольничных уропатогенных *E. coli*, выделенных в России, изучена слабо.

**Альтернативные стратегии борьбы с уропатогенными *E. coli*.** Рост устойчивости к антимикробным препаратам, распространенность госпитальных инфекций, увеличение номенклатуры медицинских изделий, а также расширение знаний об инфекционных заболеваниях и патогенах привели к необходимости использования альтернативных и вспомогательных антимикробных препаратов, материалов и

стратегий [11, 62, 261]. Перспективным направлением считается использование новых конструкционных материалов (для медицинских изделий: катетеров и др.) [74, 150, 236, 237, 247, 258].

Разработка новых материалов – быстроразвивающееся направление в науке и перспективный рынок здравоохранения. Основной целью является получение материалов с антимикробным и антибиопленочным действием для костных, тканевых, дентальных и урологических имплантов, а также их высокая биосовместимость [74, 202, 258]. Подобное сочетание может быть получено при использовании специфической модификации поверхности имплантов, при которой реализуется один или несколько сценариев антимикробной активности [69]: ингибирование бактериальной адгезии и образования биопленки из-за электростатического взаимодействия с бактериями; генерирование активных форм кислорода, которые вызывают окислительный стресс у бактерий; формирование гальванической пары на поверхности, при этом уничтожение бактерий происходит за счет прямого наногальванического взаимодействия.

Иммобилизация ионов металлов на поверхности – один из возможных методов модификации поверхности импланта. В ряде работ были установлены минимальные бактерицидные концентрации ионов, обладающих антибактериальным эффектом (ионы Ag, Cu, Pt, Au и Pd) [150, 236, 237, 247], однако при этом было также показано токсическое действие этих ионов (например, ионов Ag) на клетки эукариот [266]. Менее опасным для эукариотических клеток считается вариант комбинации ионов металлов с многокомпонентными наноструктурированными пленками на основе TiCaPCON, которые прошли клинические исследования и были одобрены для использования в медицине [226, 246].

### **1.6 Геномы уропатогенных *E. coli***

Геном *E. coli* состоит из хромосомы и плазмид. Хромосома *E. coli* обычно имеет длину порядка 4,6-5,9 млн. п.н. и состоит из 4200-5500 генов, ГЦ состав порядка 50,6 % [239]. Плазмиды – молекулы ДНК, обособленные от основной хромосомы бактерии и способные к независимой репликации. Часто на плазмидах расположены гены вирулентности или антибиотикорезистентности, в этом случае плазмиды могут обозначаться как плазмиды вирулентности или плазмиды резистентности. Кроме того, некоторые плазмиды, называемые конъюгативными, несут гены системы независимого распространения с помощью половых пилей [66, 67]. Плазмиды классифицируются по

группам несовместимости, которые обусловлены особыми системами элиминирующие несовместимые плазмиды. В UPEC распространены плазмиды групп IncF, IncB/O и IncI, а также гомологи плазмиды Col156 (номер в базе данных GenBank NC009781) [66, 67, 83]. Кроме того, в штаммах UPEC идентифицированы плазида ColV (номер в базе данных GenBank AY545598.5), несущая опероны синтеза факторов вирулентности аэробактина, сальмохелина, колицина V, протеазы внешней мембраны; плазида Vir (номер в базе данных GenBank CP001162.1), несущая ген синтеза цитотоксического некротизирующего фактора и плазида pUTI89 (номер в базе данных GenBank CP000244.1) способствующая колонизации мочевыводящих путей и биопленкообразованию [121, 231].

Отличительной особенностью хромосомы *E. coli* считается высокая гетерогенность: установлено, что сходство геномов двух штаммов может составлять не более 20 % [208]. Гетерогенность геномов обусловлена высоким распространением переменных компонентов: мобильных генетических элементов и профагов [191, 90]. Мобильные генетические элементы (МГЭ) – это участки ДНК, которые способны к перемещению между разными участками хромосомы бактерии или между хромосомой и плазмидой в пределах одной клетки [191]. К МГЭ относят интегроны, IS-элементы, транспозоны и другие. Интегроны – это МГЭ способные к сайт-специфичной рекомбинации, состоящие из гена рекомбиназы (интегразы, *intI*), сайта рекомбинации *attC*, а также переносимого одного или нескольких генов антибиотикорезистентности. При этом гены антибиотикорезистентности, разделенные сайтами рекомбинации, называют интегронной кассетой или кассетным множеством. В зависимости от вида интеграз выделяют интегроны класса 1, 2 и 3 [191]. В *E. coli* обычно распространены интегроны класса 1 [86, 182, 184]. IS-элементы и транспозоны – это МГЭ способные к самостоятельному неспецифичному перемещению. IS-элементы состоят из двух инвертированных повторов, окружающих 1 или 2 гена транспозазы (и рекомбиназы). IS-элементы, при неспецифичном перемещении, способны блокировать отдельные гены, а также осуществлять сдвиг рамки считывания [191].

Профаги – участок хромосомы бактерий, происходящий из генома умеренного фага, часто деградированного, не способного к старту литического цикла. Профаги важный компонент горизонтального переноса генов в том числе генов вирулентности,

например, токсинов [90]. При этом связь генов вирулентности UPEC с профагами не установлена.

### 1.7 Внутривидовое типирование уропатогенных *E. coli*

Генетическая гетерогенность *E. coli* вызывает необходимость внутривидового типирования, и анализа связи генотипа с фенотипическими особенностями [73]. Первая филогенетическая классификация *E. coli* была разработана в конце 1980-х – начале 1990-х гг. на основе мультилокусного ферментативного электрофореза и позволила выделить 4 филогенетические группы: A, B1, B2 и D, а также группу неverified *E. coli* [22]. В дальнейшем группой исследователей во главе с O. Clermont этот метод был модифицирован на основе ПЦР-детекции специфичных генов [72]. Кроме филогенетического анализа по Clermont, существует еще несколько методов филогенетического анализа: мультилокусное сиквенс-типирование (Multi Locus Sequence Typing, MLST) по генам «домашнего хозяйства», типирование «случайными» праймерами (random amplified polymorphic DNA, RAPD), а также ограниченно применяемые *usp*-, Fim- и CN-типирование. Кроме того, внутривидовое типирование дополняется данными детекции генов вирулентности, антибиотикорезистентности и O-групп.

**Определение принадлежности штаммов *E. coli* к филогруппам по Clermont.** На основе мультилокусного ферментативного электрофореза в 2000-х гг. группа O. Clermont предложила для филогенетического анализа использовать ПЦР [72, 73]. Дальнейшие исследования показали практически 100 % корреляцию между результатами филогенетического анализа методами мультилокусного ферментативного электрофореза и ПЦР [72]. Метод детекции основан на квадриплексной ПЦР, которая включает детекцию четырех генов: гемофора внешней мембраны *chuA*, гипотетического протеина *yjaA*, анкирин-повторяемого белка A *arpA* и фрагмента ДНК предполагаемого гена липазы эстеразы TspE4.C2. Кроме того, в дополнительной ПЦР детектируют наличие гена триптофан синтетазы  $\alpha$ -SU *trpA*. На основании наличия или отсутствия данных генов все *E. coli* подразделены на 8 филогрупп, семь из которых относятся к *E. coli sensu stricto* (A, B1, B2, C, D, E, F), а одна соответствует *Escherichia* кладе I, штаммы которой не верифицируются [73]. Комменсальные *E. coli* чаще всего представлены группами A и B1; IPES-штаммы – в основном группами A, B1, D и E; а ExPEC и UPEC штаммы – группами B2, D, C и F [22, 215]. Однако, несмотря на

статистически значимое совпадение между филогруппой и патотипом, эта корреляция не абсолютна. В некоторых исследованиях было показано, что среди UPEC могут встречаться штаммы всех филогрупп [136]. При этом, часть штаммов *E. coli* на основании классификации по Clermont нельзя отнести ни к одной филогруппе. Кроме того, описаны случаи полного или частичного отсутствия детектируемых в данном анализе генов, а также их значимых мутаций [73].

Доля представителей филогруппы B2 среди штаммов UPEC составила 39-52 %; чаще всего эта группа являлась доминирующей среди штаммов UPEC. Филогруппа A среди UPEC встречалась у 1-17 % штаммов, C – у 1-6 %, B1 – у 3-11 %, D – у 3-20 %, E – у 9-12 %, F – у 3-30 % штаммов [14, 23, 136].

**Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST)** разработано на основе изучения нуклеотидных последовательностей высококонсервативных генов «домашнего хозяйства» *E. coli*. Описано несколько схем MLST *E. coli*, но наибольшее распространение получила схема по Ahtman, размещенная в базе данных Уорикского университета (Великобритания). MLST по схеме Ahtman основано на данных нуклеотидных последовательностей 7 генов «домашнего хозяйства»: *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* и *recA*, детерминирующих, соответственно, аденилат киназу, фумарат гидратазу, ДНК-гиразу, изоцитрат дегидрогеназу, малат дегидрогеназу, аденил-сукцинат дегидрогеназу и АТФ/ГТФ-связывающий мотив [253], с последующим определением аллельного профиля генов, сиквенс-типа (Sequence Typing, ST) и клонального комплекса (Clonal Complex, CC) на сайте EnteroBase (URL: [http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search), дата обращения 1.04.23).

Штаммы UPEC, выделенные в разных регионах мира, преимущественно отнесены к сиквенс-типам ST131, ST69, ST73, ST10, ST127, ST95 и ST393 [51, 179, 180, 209]. В Российской Федерации описаны штаммы UPEC сиквенс-типов ST10, ST12, ST38, ST46, ST80, ST101, ST117, ST127, ST131, ST155, ST167, ST372, ST405, ST420, ST453, ST636, ST648, ST1664 и ST4109 [26].

**RAPD-типирование** *E. coli* основано на данных, полученных в ПЦР со «случайными» праймерами. Сравнение RAPD-электрофореграмм изучаемых штаммов позволяет обнаруживать их генетическое родство или отсутствие такового. Этот метод является одним из лучших инструментов для генетического типирования штаммов в рамках одного эксперимента [159]. Метод RAPD достаточно чувствителен, хотя связан

со сложностями анализа результатов, для которого необходимо применение специальных математических методов. [149]. Методом RAPD-типирования было установлено высокое генетическое родство между урологическими и фекальными изолятами *E. coli*, выделенными от одного пациента, что подтверждает гипотезу о переносе *E. coli* из кишечника в урологический тракт [234].

Сравнение методов внутривидового типирования *E. coli* позволяет сделать вывод, что каждый из методов обладает как достоинствами, так и недостатками, поэтому целостную картину внутривидовой дифференциации можно сложить только на основании результатов нескольких методов типирования с дополнением данными детекции у штаммов генов вирулентности, антибиотикорезистентности и идентификации O-групповой принадлежности.

**Группы UPEC.** Высокая гетерогенность уропатогенных *E. coli* чаще всего не позволяла выявить эпидемиологические вспышки на общем фоне заболеваний ИМВП до распространения молекулярно-генетического типирования. В качестве уникального случая описания вспышки ИМВП можно привести описанное в декабре 1986 г. – феврале 1987 г. в г. Ламбет (Лондон, Великобритания) исследование, в ходе которого был выявлен возбудитель вспышки урологического заболевания затронувшей, по крайней мере, 349 пациентов, *E. coli* O15:H1:K52 [160, 209]. В дальнейшем штамм *E. coli* O15:H1:K52 распространился по всей Европе, и на сегодняшний день встречается во всем мире. Установлено, что все выделенные изоляты, как современные, так и сохраненные с 80-х годов, принадлежали к филогруппе D и сиквенс-типу ST393 (по схеме Ahtman) [160, 209]. Большинство штаммов группы O15-D-ST393 несли гены вирулентности *papGII*, *kpsMTII*, *iha* и *iutA*, при этом гены *papGIII*, *hly*, *sfa* и *cnf* отсутствовали. Кроме того, была описана «сестринская» группа *E. coli* O15-A-ND, несущая гены вирулентности *papGII*, *kpsMTII*, *iha*, *fyuA* и *iutA*; и описан ряд штаммов, принадлежащих к *E. coli* O15-D/A без одного или нескольких вышеуказанных генов вирулентности, или дополнительно несущих гены *hlyA* и *traT*. Современные и сохраненные с 80-х годов штаммы *E. coli* генетической группы O15-D-ST393, а также штаммы O15-A-ND и O15-D/A генетически близкородственны, что показано с помощью RAPD-типирования [120]. На сегодняшний день штаммы *E. coli* O15-D-ST393 выделяют не только от человека, но и от домашних собак как UPEC и SEPEC патогены. Сравнение генотипов современных штаммов O15-D-ST393 с аналогичными штаммами,

выделенными в 1980-х гг., показало совпадение их вирулентных профилей, при этом у современных штаммов отмечено большее количество генетических детерминант резистентности, в том числе высокая встречаемость генов бета-лактамаз CTX-M-типа [160, 209].

В 2008 г. впервые было зафиксировано появление штаммов UPEC группы O25-B2-ST131, ретроспективно было установлено, что эта ранее штаммы этой группы вызывали вспышки заболеваний во Франции, Канаде, Испании, Португалии, Кувейте и Швейцарии в 2000-2006 гг. [77]. Анализ коллекционных штаммов показал наличие этой группы среди штаммов *E. coli*, собранных из разных источников в 1985, 1992 и 1994 гг. На сегодняшний день установлено, что *E. coli* O25-B2-ST131 является распространенной во всем мире группой госпитальных и внебольничных UPEC и ExPEC штаммов, выделяемой от людей, домашних или диких животных, а также из внешней среды и продуктов питания. Установлено, что генетически близкими к группе O25-B2-ST131 являются O16-B2-ST131 и O157-B2-ST131, а также ряд штаммов с неидентифицированной серогруппой NT-B2-ST131 [209]. При этом, все штаммы O25/O16/O157-B2-ST131 несли гены вирулентности *iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsMII*, *usp*, *traT* и *ompT*. Отличительной особенностью данной генетической группы считается носительство генов бета-лактамаз CTX-M-типа и наличие мутаций хромосомных генов *gyrA* и *parC*, детерминирующих их фенотипическую устойчивость к бета-лактамам и фторхинолонам, соответственно. [45, 61, 89, 94, 106, 154, 180, 194, 209]. В ряде случаев штаммы *E. coli* группы O25-B2-ST131 были носителями генов карбапенемаз, в том числе металло-бета-лактамаз [209].

*E. coli* D-ST405 – вторая по частоте распространения генетическая группа ExPEC, включающая штаммы разных серотипов, и, в подавляющем большинстве случаев, несущих ген бета-лактамазы расширенного спектра *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, а также другие гены резистентности, в том числе ген металло-бета-лактамазы *bla*<sub>NDM</sub>. Интересно отметить, что в 2001-2002 гг. в Великобритании *E. coli* D-ST405 вызвали вспышку септических инфекций, при этом выделенные штаммы чаще всего характеризовались чувствительностью к бета-лактамам, но обладали резистентностью к фторхинолонам [160, 209]. Близкородственная группа *E. coli* D-ST648, выделенная в отдельных случаях в США, Китае, Канаде и Нидерландах, также несла гены резистентности *bla*<sub>CTX-M-15</sub> и *bla*<sub>NDM</sub> [176].

Генетическая группа *E. coli* D-ST69 («клональная группа А») широко распространена во всем мире как UPEC. К этой группе отнесены штаммы O11, O15, O17, O44, O73, O77, O86, O125ab и O25b. Первоначально эти штаммы были зафиксированы во время вспышки внекишечной инфекции в Беркли (Калифорния, США) в 1999-2000 гг., в основном с симптомами ИМВП. Позднее *E. coli* D-ST69 были идентифицированы во всем мире как внебольничные ExPEC, выделенные из продуктов питания, от диких птиц и из мочи людей с ИМВП [160, 209]. У части штаммы данной группы идентифицированы гены вирулентности *papGII*, *fyuA*, *iutA*, *iha*, *cdtB*, *kpsMTII* и *traT* [209], в других исследованиях они не были выявлены [160]. Подавляющее большинство штаммов *E. coli* D-ST69 обладали устойчивостью к сульфаметоксазол-триметоприму и несли интегроны класса 1 с интегронной кассетой *aadA5~dfrA17~qacE~sul1*, при этом гены бета-лактамаз у них встречались довольно редко [209].

*E. coli* A-CC10 – включает штаммы разных серогрупп сиквенс-типа ST10 и близкородственных сиквенс-типов. Это гетерогенная группа штаммов, в которую входили как чувствительные к антибиотикам комменсальные штаммы, так и госпитальные MDR штаммы [87, 99, 107, 160, 183, 204]. В 2000-2001 гг. представители этой генетической группы, несущие ген *bla<sub>CTX-M-14</sub>*, вызвали вспышку ИМВП в Калгари (Альберта, Канада), а на сегодняшний день данная группа *E. coli* распространена во всем мире [160, 196].

*E. coli* O75-B2-CC14 – генетическая группа, включающая штаммы близкородственных сиквенс-типов ST14 и ST1193, среди которых описаны как фторхинолон-чувствительные возбудители уросепсиса, выделенные в середине 1980-х гг. в Сиэтле (Вашингтон, США), так и фторхинолон-резистентные возбудители ИМВП, выделенные в 2007-2008 гг. в Брисбене, Сиднее и Мельбурне (Австралия). «Австралийские» штаммы, выделенные от людей и собак, несли гены вирулентности *papG*, *iha*, *fimH*, *sat*, *vat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsMTII*, *usp* и *ompT*; «американские» штаммы, выделенные только от людей, в большинстве случаев несли гены *fyuA*, *papG*, *fimH*, *kpsMTII*, *traT*, *iutA* и *cnf* [119, 180, 197].

Генетическая группа B1-ST58 была идентифицирована у комменсальных *E. coli* человека и других млекопитающих, но также и у патогенных *E. coli*, в том числе – у возбудителей ИМВП [109, 167, 205]. Интересно отметить, что UPEC штаммы группы

B1-ST58 в ряде исследований несли гены вирулентности *cvaC*, *iroN*, *iutA*, *fyuA* и *traT*, а штаммы этой же группы, выделенные из пищевых продуктов в Германии в 2016-2017 гг., не несли этих генов вирулентности [89, 109, 167, 180, 205].

*E. coli* O6-B2-ST73 – распространенная во всем мире группа UPEC, являющаяся основным ExPEC (UPEC и SEPEC) возбудителем в Великобритании и третьим по распространенности возбудителем ИМВП в США, в том числе и в госпитальной среде [160, 209]. Чаще всего эти штаммы продуцировали бета-лактамазы СТХ-М-типа и несли гены вирулентности *papG*, *sfa/foc*, *fimH*, *hra*, *hlyA*, *cnf1*, *pic*, *vat*, *iroN*, *fyuA*, *kpsMII*, *usp* и *ompT*. Интересно отметить, что штаммы *E. coli*, позднее отнесенные к O6-B2-ST73, были выделены еще в 1917 г. Кроме того, штаммы этой группы часто выделяли от домашних питомцев – кошек и собак. Высказано предположение об обмене патогенами между людьми и их домашними животными [209].

Штаммы *E. coli* группы B2-ST95 распространены во всем мире и отнесены к UPEC, APEC и NMEC [160, 209]. В 1990-х гг. во Франции и США была зафиксирована вспышка септических и менингитных инфекций, вызванных штаммами этой генетической группы. Серологически штаммы B2-ST95 были отнесены к O2-группе, однако среди них встречались штаммы других серогрупп – O1, O18 и O45. Интересно отметить, что штаммы B2-ST95 редко несут гены бета-лактамаз. Также в штаммах *E. coli* этой генетической группы идентифицированы гены вирулентности *fimH*, *papGII*, *iutA*, *iroN*, *kpsMII*, *cvaC*, *iss*, *traT* и *usp* [209].

В мире широко распространены и другие генетические группы возбудителей ИМВП: O2-B2-ST141, D-ST117, O86-ND-ST38, O6-B2-ST127 и O89-A-ST744. При этом, среди *E. coli* O2-B2-ST141 описаны IPEC, ExPEC и UPEC штаммы, среди *E. coli* D-ST117 – UPEC и APEC штаммы, среди *E. coli* O6-B2-ST127 – UPEC штаммы, а среди *E. coli* O89-A-ST744 штаммы ExPEC и UPEC [106, 118, 133, 142, 160, 209]. Штаммы *E. coli* O86-ND-ST38 описаны в 2002-2003 гг. в Японии как возбудители госпитальных инфекций. Они были выделены преимущественно из мочи и крови; обладали резистентностью к цефотаксиму, гентамицину и сульфаметоксазол/триметоприму, и, в подавляющем большинстве случаев, несли ген *bla*<sub>СТХ-М-9</sub> [209].

Данных о генетических группах штаммов UPEC, выделенных в России, нам найти не удалось.

### 1.8 Заключение по Главе 1

Уропатогенные *E. coli* – широко распространенные возбудители инфекций мочевыделительной системы человека. Штаммы UPEC могут передаваться фекально-оральным, половым и контактно-бытовым путем, персистировать в домашних животных и вызывать хронические заболевания. UPEC проявляют все характерные фенотипические свойства бактерий вида *E. coli*: для них характерна высокая биохимическая активность, специфичная антигенная структура, способность продуцировать бактериоцины и формировать биопленки. Эти особенности позволяют UPEC приспосабливаться к разнообразным условиям окружающей среды, сохраняться во внешней среде, персистировать в кишечнике, а также избегать воздействия иммунной системы макроорганизма.

UPEC характеризуются широким спектром факторов вирулентности, у них описано большое число адгезинов, токсинов, факторов поглощения железа и факторов защиты от иммунной системы макроорганизма. Однако на сегодняшний день нет общепризнанной системы идентификации штаммов UPEC по наличию у них факторов вирулентности или их генетических детерминант. Основной опасностью уропатогенных *E. coli* является всевозрастающая резистентностью к антибиотикам и дезинфектантам, появлению MDR, XDR и PDR штаммов. Носительство генов резистентности к бета-лактамам, в том числе эпидемически значимых металло-бета-лактамаз, интегронных кассет и регионов резистентности с множеством генов устойчивости, возможности длительной персистенции в организме хозяина – указывает на опасность распространения резистентности между патогенными бактериями разных видов. Широкое использование медицинских имплантов в урологии приводит к возрастанию значимости проблемы биопленкообразования возбудителями ИМВП. Наиболее перспективным направлением представляется использование новых медицинских материалов с антибактериальными и антибиопленочными свойствами. Высокая фенотипическая и генетическая пластичность UPEC вызывает необходимость во внутривидовом типировании молекулярно-генетическими методами. Однако, имеющихся на сегодняшний день данных недостаточно для однозначного типирования штаммов UPEC.

На основании вышесказанного, актуальными проблемами клинической микробиологии в отношении уропатогенных *E. coli* можно считать оценку потенциалов

вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов UPEC, изучение генетического разнообразия в целях внутривидового типирования, интегративную оценку вирулентности и ее корреляцию с факторами вирулентности, а также изучение новых конструкционных материалов с антибактериальными и антибиопленочными свойствами. В Российской Федерации недостаточно изучена этиологическая структура *E. coli* возбудителей ИМВП, поэтому целью данной работы было изучение фенотипических и молекулярно-генетических особенностей штаммов уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от людей с инфекциями мочевыводящих путей.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

## 2.1 Микробиологические методы

**Изоляты и штаммы микроорганизмов.** Клинические изоляты *E. coli* (n=303) выделены из образцов мочи 230 пациентов лечебных учреждений Российской Федерации в 2005-2020 гг. (таблица 2.1).

Таблица 2.1 – Изоляты *E. coli*, выделенные от пациентов с ИМВП в лечебных учреждениях разных регионов Российской Федерации в 2005-2020 гг.

Учреждение	Регион	Годы	Количество изолятов
Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России	г. Москва	2016-2019	161
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова» Минздрава России	г. Москва	2015-2019	50
ГБУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения Ярославской области	г. Ярославль	2016-2017	20
ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России	г. Москва	2005-2007	50
ГБУЗ «Троицкая центральная районная больница» Департамента здравоохранения Челябинской области	г. Троицк Челябинской области	2015-2020	10
Испытательный лабораторный центр ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора	п. Оболенск Московской области	2015-2019	6
ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ	г. Москва	2015 и 2017	5
ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения г. Москвы	г. Москва	2015	1
Всего			303

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.

В качестве референс-штаммов при определении чувствительности к антимикробным препаратам, подвижности и колициногенности использовали штаммы

*E. coli* ATCC25922 и *E. coli* С600, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» (регистрационные номера В-2393 и В-2409, соответственно).

***Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий.***

Культивирование микроорганизмов для подсчета численности КОЕ, получения накопительных и ночных культур проводили на твердых питательных средах в аэробных условиях при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Культивирование микроорганизмов для получения бульонной культуры проводили в жидкой питательной среде при температуре 37 °С и аэрации со скоростью 150 об/мин на шейкере Unimax 1010 (Heidolph Instruments, Швабах, Германия) в течение 4 ч (4-часовая бульонная культура) или 18-24 ч (суточная бульонная культура). Первоначальная суспензия для обеих бульонных культур имела мутность 0,5 ед. по стандарту МакФарланда ( $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл).

В работе использовали питательные среды: «Питательная среда №1 ГРМ-агар» (ГРМ 1), «ГРМ-бульон» (ГРМБ), «Агар Эндо-ГРМ», «Агар Клиглера-ГРМ», «Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной», «Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7» и «Ацетатный агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия); «Muller-Hinton agar», «Muller-Hinton broth» (Hiimedia, Мумбаи, Индия); «Luria Bertani broth» (Difco, Детройт, США).

Для получения полужидкого агара к жидкой питательной среде «ГРМ-бульон» добавляли «Агар микробиологический» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) до итоговой концентрации 0,3 % (для определения подвижности) или 0,6 % (для определения колициногенности), автоклавировали в течение 15 мин при температуре 121 °С и давлении 1 атм.

Для получения среды с конго красным к жидкой питательной среде «Luria Bertani broth» добавляли «Агар микробиологический» до итоговой концентрации 1 %, краситель конго красный (0,8 г/л) и сахарозу (50 г/л), согласно Bokranz et al. [59], автоклавировали в течение 15 мин при температуре 121 °С и давлении 1 атм.

Хранение бактериальных культур осуществляли в 20 %-ном глицерине при температуре минус 70 °С, а также в лиофильно высушенном виде.

***Выделение бактерий из клинического материала.*** Изоляты выделяли при посеве 0,2 мл нативной мочи на плотной питательной среде ГРМ 1, растирали стерильным шпателем. При высоком титре КОЕ в нативной моче,  $\approx 0,01$  мл мочи

отбирали стерильной петлей и осуществляли высев «истощающим штрихом» на плотной питательной среде ГРМ 1 [27]. Изоляты, полученные из других коллекций, отбирали из замороженного состояния и осуществляли высев «истощающим штрихом» на плотной питательной среде ГРМ 1. Культивировали при температуре 37 °С в течение 18-24 ч. Отбирали колонии, которые отличались по морфологии, каждую колонию рассеивали «истощающим штрихом» до единичных колоний трижды для получения чистой культуры.

**Видовую идентификацию культур** осуществляли по биохимическим особенностям с помощью высева на дифференциально-диагностические питательные среды «Агар Эндо-ГРМ», «Агар Клиглера-ГРМ», «Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной» и «Ацетатный агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), согласно инструкции производителя и методическим указаниям [27], с последующим подтверждением видовой принадлежности на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Карлсруэ, Германия).

**Морфологию колоний** определяли при посеве «истощающим штрихом» на плотную питательную среду ГРМ 1 после 24 ч культивирования при температуре 37 °С. Круглые выпуклые колонии с четкими ровными краями идентифицировали как S-форму, уплощенные колонии неправильной формы – как R-форму [35].

**Стринг-тест** для определения гипермукоидности культур проводили согласно Shon et al. с изменениями [223]. Культуры *E. coli* выращивали на плотной питательной среде ГРМ 1 при температуре 37 °С в течение 24 ч. Тест считали положительным, если биомасса колонии тянулась за бактериологической петлей на расстояние 5 мм и более.

**Оценку подвижности бактерий** проводили при посеве уколом в полужидкий агар 0,001 мл 4-часовой бульонной культуры [27].

**Определение колициногенности.** Продукцию колицинов клетками *E. coli* выявляли методом двухслойного агара [27]. На поверхность плотной питательной среды ГРМ 1 наносили 0,01 мл суточной бульонной культуры исследуемого штамма, культивировали 24 ч при температуре 37 °С. По окончании культивирования открытые чашки, перевернутые дном вверх, помещали в плотно закрытый эксикатор, в который наливали 10 мл хлороформа, выдерживали 40-60 мин. По окончании экспозиции, 0,1 мл 4-часовой бульонной культуры лабораторного штамма *E. coli* С600 вносили в 5 мл расплавленного 0,6 % полужидкого агара, охлажденного до 46-50 °С, перемешивали и

наслаивали на поверхность плотной питательной среды с исследуемым штаммом. После застывания, чашки культивировали 24 ч при температуре 37 °С. Степень чувствительности к колицинам оценивали по системе 4 полюсов: зона до 2 мм «+», от 2 до 4 мм «++», от 5 до 10 мм «+++» и более 10 мм «++++».

**Оценка гемолитической активности.** Наличие гемолитической активности у изучаемых штаммов определяли согласно Кузнецовой и соавт. [23]. В стерильную расплавленную и охлажденную до 48 °С плотную питательную среду ГРМ 1 добавляли «Дефибринированную баранью кровь» (E&O Laboratories Ltd, Бернхаус, Великобритания) до конечной концентрации 5 %, разливали в чашки Петри и давали застыть. Для исследуемого штамма готовили 4-часовую бульонную культуру, разводили в  $10^6$ - $10^7$  раз и высевали по 0,1 мл на подготовленную питательную среду с кровью. Культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °С. Наличии зоны просветления вокруг колоний свидетельствовало о гемолитической активности тестируемого штамма.

**Оценка биопленкообразования.** Способность штаммов к образованию биопленок оценивали в 96-луночных полистирольных планшетах в жидкой питательной среде «Muller-Hinton broth» по методике O'Toole [188]. Оптическую плотность экстрагированного из биопленки кристаллвиолета определяли на планшетном фотометре Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) при 595 нм. Каждый эксперимент проводили в 4 повторностях. Степень биопленкообразования определяли относительно контрольных лунок без бактериальной культуры по критериям, предложенным Rodrigues et al.: отсутствие биопленки при  $OD_t \leq OD_k$  и биопленкообразование при  $OD_k < OD_t$ , где  $OD_t$  – оптическая плотность тестируемого образца и  $OD_k$  – оптическая плотность контрольного образца [211].

**Образование курли-волокон.** Оценку продукции курли-волокон производили согласно Vokranz et al. [59]. На поверхность плотной питательной среды с красителем конго красным наносили «истощающим штрихом» биомассу ночной культуры исследуемого штамма. Инкубировали при 37 °С до 5 сут. Оценку производили по цвету колоний: колонии курли-положительных штаммов были окрашены в серый или серо-красный цвет, а колонии курли-отрицательных штаммов – в белый или бело-красный цвет.

**Моделирование бактериальных биопленок на плотной питательной среде** проводили согласно Слукину и соавт. [38]. Суспензию 4-часовой бульонной культуры

исследуемого штамма по 0,1 мл наносили в чашку Петри на поверхность плотной питательной среды ГРМ 1, растирали ватным тампоном и инкубировали в течение 72 ч при температуре 37 °С. По окончании культивирования, стерильным аппликатором (0,5 см<sup>2</sup>) из фильтровальной бумаги отбирали фрагмент биопленки и суспендировали ее ультразвуком на гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE Ltd, London, Великобритания) при амплитуде  $2 \times 10^{-6}$  м в течение 2 мин. Полученную суспензию клеток титровали десятикратно и делали высевы на плотную питательную среду. Плотность биопленки рассчитывали как количество КОЕ на единицу площади аппликатора.

**Определение чувствительности бактериальных культур** (планктонных и биопленочных) проводили по уровню минимальной подавляющей концентрации (МПК) 7 АМП 5 функциональных классов, применяемых в урологической практике (таблицы 2.2 и 2.3).

Таблица 2.2 – Антибиотики, использованные для оценки чувствительности штаммов *E. coli*

Класс	Препарат	Производитель, город, страна
Бета-лактамы	ампициллин	ОАО «Синтез», Курган, РФ
	амоксициллин-клавуланат	Sandoz, Хольцкирхен, Германия
	цефотаксим	Aventis Pharma Ltd, Мумбаи, Индия
Фторхинолоны	ципрофлоксацин	ОАО «Синтез», Курган, РФ
Аминогликозиды	гентамицин	РУП «Белмедпрепарат», Минск, РБ
Производные фосфоновых кислот	фосфомицин	Zambon Switzerland Ltd, Cadempino, Швейцария
Нитрофураны	нитрофурантоин	ОАО «Ирбитский химфармзавод», Ирбит, РФ

Все препараты, кроме триклозана, использовали в виде стоковых водных растворов. Триклозан использовали в виде стокового раствора в 50 % этиловом спирте. Стоковые растворы всех препаратов использовали в течение 2 недель, хранились в замороженном виде при температуре минус 20 °С.

МПК антибиотиков (таблица 2.2) для планктонных культур определяли методом микроразведений в жидкой питательной среде «Muller-Hinton broth» и интерпретировали в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST Breakpoint tables v 13.0 (URL: <http://www.eucast.org>, дата обращения 1.04.2023). МПК антисептиков/дезинфектантов и интравагинальных антибактериальных препаратов

(таблица 2.3) для планктонных культур определяли методом микроразведений в 96-луночной планшете в жидкой питательной среде «Muller-Hinton broth» согласно МУК 4.2.1890-04 [28]. Интерпретацию результатов для хлоргексидина, бензалкония хлорида и триклозана проводили относительно  $MПК_{ECOFF}$  согласно работе Morrissey et al. [173].

Таблица 2.3 – Антисептики/дезинфектанты, использованные для оценки чувствительности штаммов *E. coli*

Класс	Препарат	Производитель, город, страна	Используемые концентрации, мг/л
Гуанидины	хлоргексидин	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США	40,00-0,31
Бис-фенолы	триклозан	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США	8,00-0,06
ЧАС	бензалкония хлорид	Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США	80,00-1,25

Примечание: ЧАС – четвертичные аммониевые соединения

Определение  $MПК$  антимикробных препаратов для биопленок проводили методом аппликации фрагмента биопленки, полученной способом «biofilm mastocolony», на плотную питательную среду с антимикробным препаратом согласно Слукину и соавт. [38]. Культивировали в течение 72 ч при температуре 37 °С. За  $MПК$  для биопленки принимали минимальную концентрацию препарата, на которой отсутствовал рост биомассы исследуемого штамма.

**Материалы, содержащие наночастицы.** На штаммах *E. coli* тестировали перспективные материалы на основе наночастиц. Все материалы (таблица 2.4) получены из Национального исследовательского технологического университета «МИСиС», по акту передачи за подписью заведующего научно-исследовательской лабораторией «Неорганические наноматериалы» д.ф.-м.н., профессора кафедры порошковой металлургии и функциональных покрытий Штанского Д.В.

**Определение антибактериальной активности наноструктурированных пленок, иммобилизованных на твердом носителе против планктонных клеток и биопленок,** проводили в 24-луночной планшете. Ночную культуру штамма суспендировали в ФР до мутности 3 ед. по МакФарланду, разводили в 10000 раз ФР. По одной пластине каждого типа (таблица 2.4) поместили в 0,5 мл ФР, добавили по 0,03 мл разведенной суспензии. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 ч. Через 3, 8 и 24 ч отбирали по 0,04 мл суспензии, десятикратно титровали и высевали на плотную питательную среду.

Таблица 2.4 – Образцы наноструктурированных пленок, нанесенных на кремневую подложку, использованные для тестирования на штаммах *E. coli*

Обозначение	Особенности получения или строения
Fe	с имплантированными ионами Fe
Pt	с имплантированными ионами Pt
Pt+Fe	с имплантированными ионами Pt и Fe
Fe <sub>an</sub>	с имплантированными ионами Fe и отожженные в вакууме
Pt <sub>an</sub>	с имплантированными ионами Pt и отожженные в вакууме
(Pt+Fe) <sub>an</sub>	с имплантированными ионами Pt и Fe, и отожженные в вакууме
Pt <sub>an</sub> +Fe	с имплантированными ионами Pt, отожженные в вакууме и с добавочно имплантированными ионами Fe
TiCaPCON, контрольные	без имплантированных ионов

Примечание: TiCaPCON – наноструктурированные пленки; an – отметка об отжиге поверхности в вакууме

По окончании инкубирования, пластины дважды отмывали в ФР и обрабатывали ультразвуком на гомогенизаторе Soniprep 150 (MSE Ltd, Великобритания) при амплитуде  $2 \times 10^{-6}$  м в течение 2 мин. Полученную суспензию клеток десятикратно титровали и делали высевы на плотную питательную среду. Плотность биопленки рассчитывали, как количество КОЕ на единицу площади пластины (см<sup>2</sup>). Антибактериальную активность перспективных материалов при тестировании в жидкой питательной среде (против планктонных клеток или биопленок) оценивали по снижению уровня КОЕ, по сравнению с контрольным образцом.

## 2.2 Молекулярно-генетические методы

**Выделение бактериальной ДНК** проводили щелочным методом. Бактериологическую петлю (0,001 мл) ночной культуры суспендировали в 0,1 мл лизирующего раствора (0,25 % SDS, 0,05M NaOH). Пробы прогревали при температуре 100 °С на водяной бане в течение 30 мин., остужали, добавляли 0,9 мл деионизованной воды и центрифугировали при 13000 g в течение 5 мин. Супернатант отбирали в стерильные микропробирки и использовали в качестве матрицы 0,001 мкл для проведения реакции ПЦР.

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили на приборе Mini Amp Plus (Applied Biosystems Inc., Калифорния, США) с использованием реактивов Thermo Fisher Scientific (Уолтем, США). Для каждого образца 0,03 мл реакционной смеси содержали: 2,5 мкл 10×Taq-буфера с (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 2,0 mM хлорида магния; 0,8 mM смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ); 5 мкМ каждого праймера, 0,8 ед. Taq-

полимеразы или, в случае наработки ампликона для дальнейшего секвенирования, смеси *Taq*- и *Pfu*-полимераз (20:1) и 2 мкл матрицы ДНК. При каждом ПЦР-исследовании ставили отрицательный контроль, в котором находились все компоненты реакции кроме матрицы ДНК.

**Электрофорез в агарозном геле** проводили в однократном Трис-боратном буфере: 6,1 г Трис (молярная масса 121,1 г/моль), 2,5 г борной кислоты, 4 мл 250 мМ ЭДТА с рН 8,1-8,3 на 1 л дистиллированной воды. Разделение ПЦР-продуктов осуществляли в электрофоретической камере Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-RAD, Геркулес, США) в 1,2 % агарозном геле при напряжении 50 В. В лунки вносили 0,01 мл исследуемого образца с 0,005 мл утяжелителя, состоящего из 20 % глицерина в Трис-боратном буфере и 2 мг/л красителя бромфеноловый синий. Гель окрашивали раствором 0,5 мг/л бромистого этидия в течение 30 мин. Фиксацию результатов проводили с использованием системы гель-документирования «Взгляд» (Хеликон, Москва, Россия) в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм. Наличие изучаемого в реакции гена отмечали по наличию ПЦР-продукта с размером, соответствующим размеру амплифицированного ПЦР-продукта по маркеру «1 kb DNA Ladder» (Евроген, Москва, Россия), либо по контрольному штамму, наличие гена в котором подтверждено секвенированием ампликона.

**ПЦР-детекция генов.** В штаммах *E. coli* методом ПЦР со специфичными праймерами (Приложение Д) детектировали гены, кодирующие:

- факторы вирулентности UPEC – адгезин фимбрий типа 1 (*fimH*), адгезины Р-фимбрий (*papGI*, *papGII*, *papGIII*), адгезин S-фимбрий (*sfaS*), адгезин F1C-фимбрий (*focG*), Afa/Dr-адгезин (*afa/draBC*), гипотетический фимбриальный адгезин (*yfcV*); гемолизин (*hlyA*), цитотоксический некротический фактор (*cnfI*), уропатогенный специфический белок (*usp*), вакуолизирующий токсин (*vat*); рецепторы сидерофоров сальмохелина (*iroN*), иерсиниабактина (*fyuA*), аэробактина (*iutA*), рецептор гемофора (*chuA*); протеаза внешней мембраны (*ompT*), липопротеин наружной мембраны (*traT*), транспортеры капсулы 2 и 3 группы (*kpsMTII*, *kpsMTIII*);
- факторы антибиотикорезистентности – бета-лактамазы *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> и *bla*<sub>NDM</sub>, интегразы классов 1 и 2, и интегронные кассеты.

Детекцию генов специфичных белков участвующие в синтезе ЛПС проводили согласно работе Iguchi et al. [108]. Детекцию генов для филогенетического анализа по

Clermont, MLST и идентификации по Spurbeck проводили согласно стандартным протоколам [73, 232, 253]. RAPD-генотипирование проводили с помощью «случайного» праймера OPA-11 согласно Zimmer et al. [269].

**Секвенирование последовательностей генов.** При подготовке к секвенированию, ПЦР-продукты вырезали из агарозного геля под контролем системы визуализации в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм. Секвенирование нуклеотидных последовательностей изучаемых генов проводили методом Сенгера в ООО «Синтол» (Москва, Россия) на генетическом анализаторе «ABI Prizm 3130xl» с использованием набора реактивов «BigDye Terminator v.3.1 kit» (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), согласно протоколам производителя.

**Полногеномное секвенирование** штаммов *E. coli* проводили на платформе «Illumina MiSeq» с использованием наборов «Nextera DNA Library Preparation Kit» и «MiSeq Reagent Kits v3» (Illumina, Сан-Диего, США), согласно инструкции производителя. Полученные единичные прочтения собирали в контиги с использованием программного обеспечения «SPAdes 3.9.0» [53].

### 2.3 Биоинформатические методы

**Анализ амплифицированных последовательностей ДНК** осуществляли с помощью программ «Vector NTI9» (Life Technologies, Карлсбад, США) и «Chromas 2.6.2.» (Technelysium Pty Ltd, Брисбен, Австралия).

Идентификацию генов вирулентности, островов патогенности, антибиотикорезистентности, а также генов, ассоциированных с O-группами, осуществляли с помощью веб-ресурса BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, дата обращения 2.03.2022). Нуклеотидные последовательности ДНК размещали в базе данных GenBank (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, дата обращения 5.03.2022).

**Мультилокусное сиквенс-типирование** проводили по схеме Ahtman для *E. coli*, которая включала в себя амплификацию и секвенирование генов семи белков «домашнего хозяйства», с последующим определением аллельного профиля на сайте (URL: [http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele\\_st\\_search](http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search), дата обращения 13.02.2022) [253].

**Анализ RAPD-профилей** проводили с помощью программы «GelJ 2.0» [103]. RAPD-дендрограммы формировали методом невзвешенного попарного среднего на

основе коэффициента Дайса, согласно опубликованным работам [159, 242]. Значимым считали сходство более 70 % [159]. При сходстве 70-99 % штаммы считали относящимися к одному типу, при сходстве 100 % – к одному подтипу.

**Анализ полногеномных последовательностей ДНК.** Нуклеотидные последовательности полных геномов штаммов *E. coli* аннотировали с помощью веб-сервиса NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (URL: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/), дата обращения 10.01.2022) [97, 146, 240]. Выравнивание всего генома выполняли с использованием BRIG v. 0.95 (URL: <https://brig.sourceforge.net/>, дата обращения 24.02.2023) [46]. В работе использовали инструменты веб-сервиса Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>, дата обращения 22.01.2022): ResFinder 4.1 для определения нуклеотидных последовательностей генов устойчивости к антимикробным препаратам [60, 65, 264]; VirulenceFinder 2.0 для определения генов факторов вирулентности [65, 115, 158]; MLST 2.0 для определения сиквенс-типов по схеме Ahtman [65, 71, 113, 138, 253]; PlasmidFinder 2.1 для определения плазмидного профиля и групп несовместимости [65, 67]; Идентификацию профагов проводили с помощью веб-сервиса PHASTER (URL: <https://phaster.ca/>, дата обращения 20.02.2023) [49, 268].

В полных геномах изучаемых штаммов *E. coli*, с помощью веб-сервиса BLAST (URL: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, дата обращения 15.01.2022), детектировали гены и опероны вирулентности и резистентности (Приложение Е).

**Филогенетический анализ полных геномов** штаммов *E. coli* проводили на сайте Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>, дата обращения 22.01.2022) с помощью алгоритма NDtree 1.2 [115, 123, 141], на основании сравнения полногеномных последовательностей штаммов изученной коллекции и последовательностей типовых штаммов UPEC: *E. coli* 536 (NZ\_JAJART000000000.1)? *E. coli* CFT073 (NZ\_CP051263.1), *E. coli* UTI89 (NC\_007946.1) и *E. coli* J96 (ALIN000000000.2).

## 2.4 Биологические методы

**Культура личинок *Galleria mellonella*.** Личинки (гусеницы) большой восковой моли *G. mellonella* были получены из лабораторной культуры отдела дезинфектологии ФБУН ГНЦ ПМБ. Гусениц выращивали на искусственной питательной среде: кукурузная мука (ООО «Пудофф», Таганрог, Россия) – 9 частей, пшеничная мука (АО

«МАКФА», Москва, Россия) – 4 части, а также сухие пивные дрожжи (ООО «Стоинг», Санкт-Петербург, Россия), сухое молоко (ООО «Си-Продукт», Торжок, Россия), пчелиный воск (ЗАО «Коломенский Пчелокомбинат», Коломна, Россия), пчелиный мед (ЗАО «Коломенский Пчелокомбинат», Коломна, Россия) и глицерин (АО «ЛенРеатив», Санкт-Петербург, Россия) – по 5 частей; при температуре 27 °С в течение 25-27 сут, в эксперимент брали особей, находящихся на последней личиночной стадии развития [44].

**Заражение личинок.** Ночную культуру исследуемого штамма суспендировали в ФР до мутности 3 ед. по МакФарланду. Для заражения личинок готовили ряд последовательных десятичных разведений суспензии клеток штамма *E. coli* в ФР. При помощи инсулинового шприца (Becton Dickinson, Франклин Лейкс, США) 0,08 мл суспензии вводили гусенице между 2 и 3 члениками хвостового конца тела. В группе отрицательного контроля личинкам вводили 0,08 мл ФР. Обработанных личинок помещали в стерильные чашки Петри на подложку из фильтровальной бумаги, содержали без еды при температуре 27 °С в течение 7 сут. Ежедневно учитывали число погибших особей, таковой считали личинку, которая не реагировала на неоднократное прикосновение стерильной микробиологической петлей или встряхивание чашки Петри [44]. Все эксперименты проводили в трех повторностях. Контроль обсемененности осуществляли по высеву 0,010 мл гемолимфы из зараженных и контрольных личинок на плотную питательную среду ГРМ 1 с 100 мг/л ампициллина или 200 мг/л фуразолидона.

**Определение среднелетальной дозы штаммов *E. coli* для личинок *G. mellonella*** проводили с использованием трех групп животных по 80 особей в каждой, использовали заражающие дозы  $10^9$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$  и  $10^2$  КОЕ/особь. Оценку вирулентности для личинок *G. mellonella* проводили по величине LD<sub>50</sub>, которую вычисляли методом Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева [3].

## 2.5 Статистические методы

Статистическую обработку и графическую визуализацию экспериментальных данных проводили с помощью стандартных функций пакета «Microsoft Office 2010», и программ «SPSS Statistics 17.0», «GraphPad Prism 6» и «SnapGene Viewer». Различия сформированных групп подтверждали IQR методом, значимым считалось значение параметра меньше уровня 1 квартиля и больше уровня 3 квартиля.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. КОЛЛЕКЦИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ**3.1 Источники выделения изолятов *E. coli***

Клинические изоляты *E. coli* (n=303) выделены из образцов мочи 230 пациентов лечебных учреждений Российской Федерации в 2005-2020 гг. (таблица 2.1, страница 41). У пациентов были установлены диагнозы: инфекция мочевыводящих путей без определенной локализации (n=258), хронический цистит (n=26), бессимптомная бактериурия (n=4), острый пиелонефрит (n=4), цистит (n=3), хронический пиелонефрит (n=3), гестационный пиелонефрит (n=2), мочекаменная болезнь (n=2) и гиперактивный мочевого пузыря (n=1). Доля изолятов, выделенных от пациентов с осложненной ИМВП, составила более 95 %. В ходе исследования из 188 образцов мочи были выделены по одному изоляту *E. coli*, из 33 – по 2, из 7 – по 3, из одного – 4, из одного образца – 5 изолятов *E. coli*. 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.

**Штаммы *E. coli*, выделенные в ГБУЗ ЯО «ИКБ №1».** За период с 13.12.2016 г. по 09.01.2017 г. в ГБУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения Ярославской области в рамках пилотного одноцентрового клинического исследования от пациентов были выделены 89 штаммов бактерий, в том числе *Enterococcus faecalis* (n=26), *Escherichia coli* (n=20), *Klebsiella pneumoniae* (n=18), *Proteus mirabilis* (n=6), *Streptococcus agalactiae* (n=3) и других. Доля *E. coli* составила около четверти от общего количества выделенных штаммов (рисунок 3.1). У пациентов, от которых выделены штаммы *E. coli*, при поступлении в лечебное учреждение были установлены диагнозы: хронический цистит (n=12), инфекция мочевыводящей системы без определенной локализации (n=3), цистит (n=2), мочекаменная болезнь (n=2) и гиперактивный мочевого пузыря (n=1).

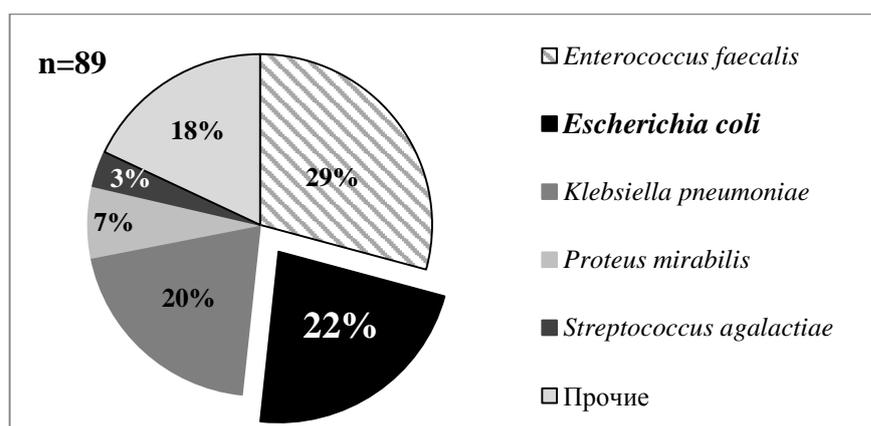
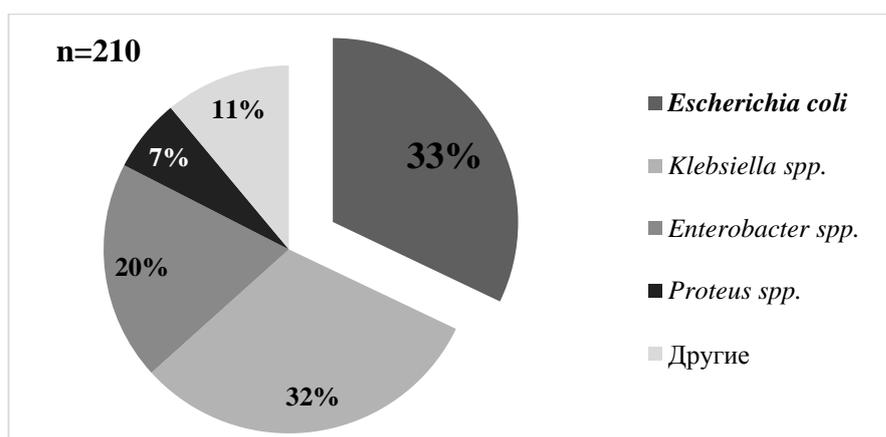


Рисунок 3.1 – Представленность видов бактерий, выделенных в рамках пилотного одноцентрового клинического исследования в Инфекционной клинической больнице №1 г. Ярославля

**Штаммы *E. coli*, выделенные в НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина.** Штаммы *E. coli* (n=161) выделены в рамках поискового клинического одноцентрового исследования по изучению чувствительности к бактериофагам штаммов UPEC в НИИ Урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина в 2016-2020 гг. из мочи пациентов с инфекцией мочевыводящих путей без определенной локализации (таблица 2.1, страница 41).

**Штаммы *E. coli*, выделенные в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова.** От пациентов многопрофильных стационаров Сеченовского университета в рамках поискового клинического одноцентрового исследования в период с 20.01.2005 г. по 22.11.2007 г. из мочи были выделены и идентифицированы 210 культур антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий, в том числе *E. coli* (n=70), *K. pneumoniae* (n=67), *Enterobacter cloacae* (n=34), *P. mirabilis* (n=12), *Enterobacter aerogenes* (n=7), *Morganella morganii* (n=7), *Citrobacter freundii* (n=2), *Providencia stuartii* (n=2), *Serratia plymuthica* (n=2), *Klebsiella oxytoca* (n=1), *Enterobacter amnigenus* (n=1), *Serratia liquefaciens* (n=1), *Citrobacter koseri* (n=1), *Kluyvera ascorbata* (n=1), *Proteus penneri* (n=1) и *Proteus vulgaris* (n=1). Доля *E. coli* составила более трети от общего количества выделенных штаммов (рисунок 3.2). В дальнейшем мы исследовали 50 штаммов *E. coli* (таблица 2.1, страница 41), выделенные от пациентов с диагнозами: инфекция мочевыводящих путей без установленной локализации (n=42), острый пиелонефрит (n=3), хронический пиелонефрит (n=2), хронический цистит (n=2) и бессимптомная бактериурия (n=1).



Другие – *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Providencia stuartii*, *Serratia plymuthica*, *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter koseri* и *Kluyvera ascorbata*

Рисунок 3.2 – Видовая принадлежность бактериальных штаммов в рамках поискового клинического одноцентрового исследования в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова

#### **Штаммы *E. coli*, выделенные в ФГБУ НЦАГИП им. академика В.И. Кулакова.**

Штаммы *E. coli* (n=50) выделены в 2015-2019 гг. в рамках поискового клинического многоцентрового исследования по изучению штаммов UPEC – возбудителей заболеваний мочеполовой системы у беременных и новорожденных (таблица 2.1, страница 41).

**Штаммы *E. coli*, выделенные в других учреждениях.** Штаммы *E. coli* получены в ходе клинических исследований от пациентов ГБУЗ Троицкая ЦРБ Челябинской области (n=10), ИЛЦ ФБУН ГНЦ ПМБ (n=6), ФГАУ НМИЦ НХ им. Н.Н. Бурденко (n=5) и ГБУЗ ИКБ №1 г. Москвы (n=1) (таблица 2.1, страница 41).

### **3.2 Культурально-морфологические и ферментативные свойства штаммов *E. coli***

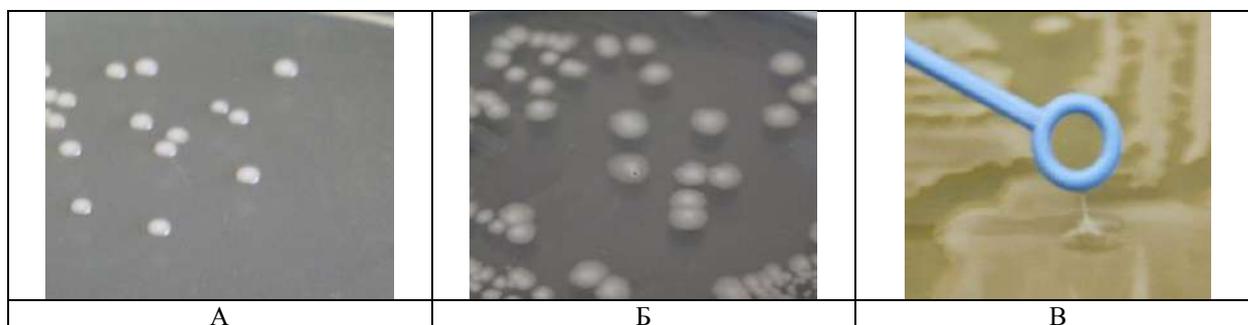
**Видовая идентификация.** Принадлежность всех 303 выделенных штаммов к виду *E. coli* была осуществлена с помощью культурально-ферментативных тестов и масс-спектрометрической идентификации. Определены ферментативные и культурально-морфологические свойства штаммов, которые отражают особенности изучаемой коллекции микроорганизмов. Большая часть изученных штаммов ферментировала лактозу (84 %) и выделяла газ при ферментации глюкозы (87 %), все штаммы росли на среде с ацетатом натрия в качестве единственного источника углерода, при этом штаммов, продуцирующих сероводород или расщепляющих мочевины не выявлено (таблица 3.1). Тестирование в полужидком агаре показало, что около половины бактерий нашей коллекции (53 %) обладали подвижностью (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Представленность штаммов, обладающих биохимическими и культурально-морфологическими признаками, характерными для *E. coli*

Фенотипический признак	Количество штаммов, шт.	Доля штаммов, %
Ферментация лактозы	256	84
Выделение газа при сбраживании глюкозы	265	87
Продукция сероводорода	0	0
Расщепление мочевины	0	0
Ферментация ацетата натрия	303	100
Подвижность	161	53
S-форма колоний	297	99
Стринг-тест	2	0,6
Гемолитическая активность	81	27
Колициногенность	98	32
Биопленкообразование	238	79
Продукция курли-волокон	275	92

Анализ культурально-морфологических и ферментативных свойств, изученных штаммов показал, что 42 % штаммов ферментировали лактозу, ферментировали глюкозу с выделением газа и обладали подвижностью. Оценка видовой принадлежности на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Карлсруэ, Германия) показала, что все штаммы отнесены к виду *E. coli* с Score Value 1,9-2,5.

**Морфология колоний и стринг-тест.** Показано, что 99 % штаммов *E. coli* нашей коллекции на плотной питательной среде ГРМ 1 образовывали колонии S-формы (рисунки 3.3А и 3.3Б). Для трех штаммов был отмечен положительный стринг-тест (длина нити 5 мм), что свидетельствует о фенотипе с повышенной мукоидностью (рисунок 3.3В).

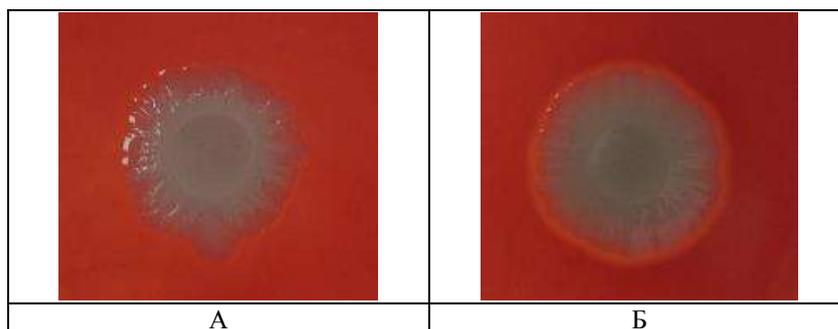


А – колонии S-формы штамма *E. coli* U100, Б – колонии R-формы штамма *E. coli* U99c, В – положительный стринг-тест штамма *E. coli* U153

Рисунок 3.3 – Морфология колоний и стринг-тест штаммов *E. coli*

**Гемолитическая активность.** Показано, что 27 % штаммов *E. coli* нашей коллекции обладали гемолитической активностью (таблица 3.1), что детектировали по

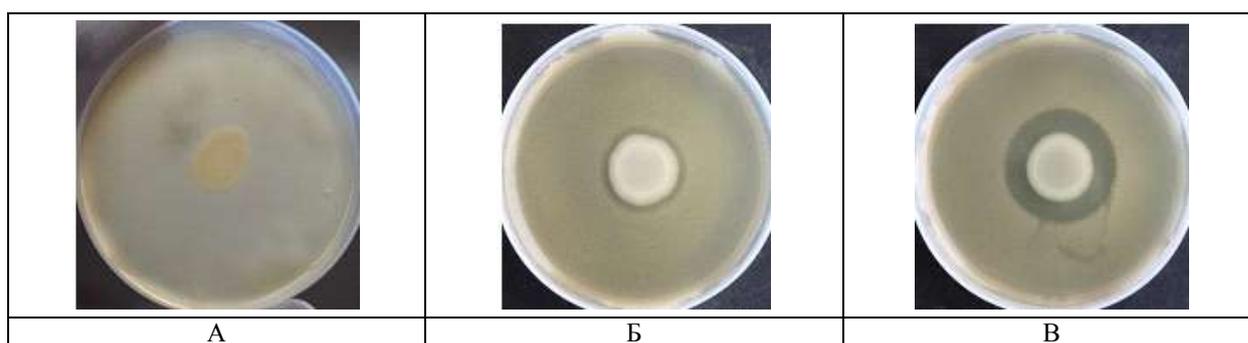
наличию зоны просветления вокруг колоний на плотной питательной среде с кровью (рисунок 3.4).



А – отсутствие гемолитической активности у штамма *E. coli* U13, Б – гемолитическая активность у штамма *E. coli* U20

Рисунок 3.4 – Результаты теста на наличие гемолитической активности у штаммов *E. coli*

**Продукция колицинов**, детектируемая с помощью тест-штамма *E. coli* С600, отмечена для 32 % штаммов *E. coli* нашей коллекции (таблица 3.1). Среди колициногенных штаммов для 52 отмечена ширина зоны подавления тест-штамма до 2 мм, для 19 – от 2 до 4 мм, для 21 – от 5 до 10 мм (рисунок 3.5).



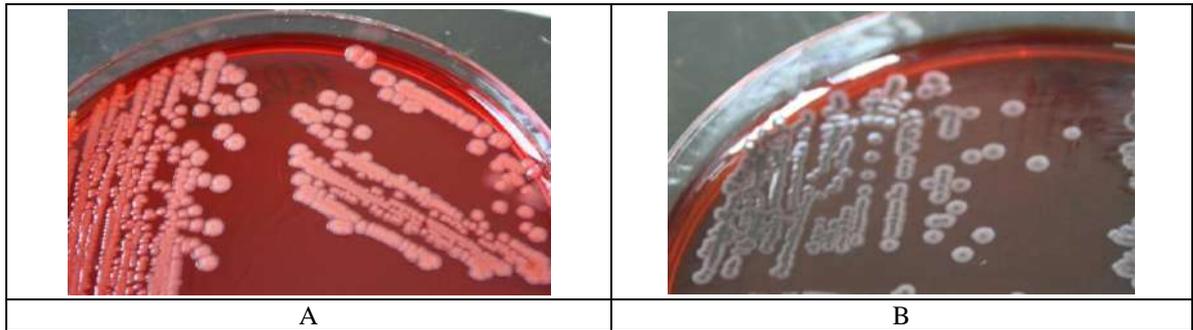
А – отсутствие колициногенности у штамма *E. coli* U23, Б – низкий уровень колициногенности у штамма *E. coli* U13, В – высокий уровень колициногенности у штамма *E. coli* U14

Рисунок 3.5 – Результаты теста на наличие колициногенности у штаммов *E. coli*

**Способность к биопленкообразованию** у штаммов *E. coli* изучаемой в данной работе коллекции оценивали при культивировании в стационарных условиях в 96-луночном полистирольном планшете в течение суток, как описано в работе O'Toole [188]. Показано, что 79 % штаммов обладали способностью к биопленкообразованию (таблица 3.1).

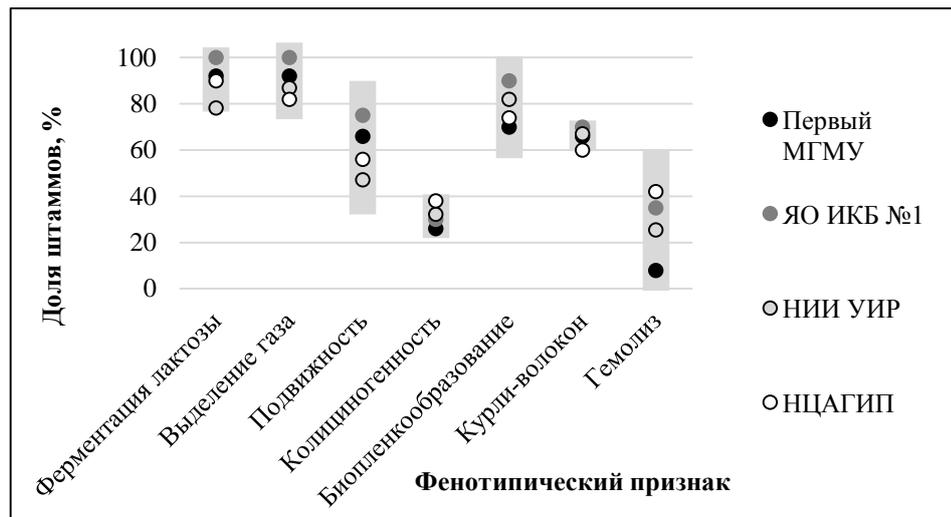
**Продукцию курли-волокон**, основного компонента матрикса биопленок, выявляли у штаммов *E. coli* с разными уровнями способности к биопленкообразованию методом, описанным в работе Vokranz et al. [59]. Показано, что 73 % изученных штаммов продуцировали курли-волокна, что выявляли по окрашиванию их колоний в серый цвет при культивировании на среде с конго красным, в отличие от курли-негативных

штаммов, колонии которых оставались не окрашенными – белые или красные (таблица 3.1, рисунок 3.7).



А – курли-негативный штамм *E. coli* U252, В – курли-позитивный штамм *E. coli* U10  
Рисунок 3.7 – Тест на продукцию курли-волокон штаммами *E. coli*

**Анализ встречаемости фенотипических свойств** среди штаммов *E. coli* выделенных от пациентов Сеченовского университета, Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова проводили IQR методом (рисунок 3.8).



Первый МГМУ – Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова; ЯО ИКБ №1 – Инфекционная клиническая больница №1 Ярославской области; НИИ УИР – Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина; НЦАГИП – Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова  
Рисунок 3.8 – Встречаемость фенотипических признаков (точки), относительно диапазона межквартильного расстояния (прямоугольники) у изучаемых штаммов *E. coli* полученных от пациентов разных лечебных учреждений

Показано, что доли штаммов с каждым из анализируемых признаков, от пациентов разных лечебных учреждений находятся в рассчитанном диапазоне между нижней границей 1 квартиля и верхней границей 3 квартиля, что свидетельствует о сходстве распространения каждого из признаков (рисунок 3.8).

### 3.3 Заключение по главе 3

В результате проведенного исследования охарактеризованы 303 штамма *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП в восьми лечебных учреждениях четырех регионов Российской Федерации в 2005-2020 гг.

Штаммы коллекции характеризовались значительным разнообразием биохимических и культурально-морфологических свойств, при этом 42 % штаммов ферментировали лактозу, выделяли газ при ферментации глюкозы и обладали подвижностью. Подавляющее большинство штаммов (99%) формировали колонии S-формы, для трех штаммов отмечен фенотип с повышенной мукоидностью, что свидетельствует о биохимической активности бактерий, характерной для острого периода заболевания [5]. Доля колициногенных штаммов в нашем исследовании (32 %) сопоставима с долей колициногенных штаммов в популяциях UPEC по данным других исследований (от 10 % до 25 %) [185, 213]. Наличие продукции колицинов говорит о возможности длительной персистенции этих бактерий в кишечнике [25]. Для 27 % штаммов нашей коллекции отмечена гемолитическая активность, что говорит о возможности данных штаммов обеспечивать потребность в железе за счет макроорганизма [22, 25].

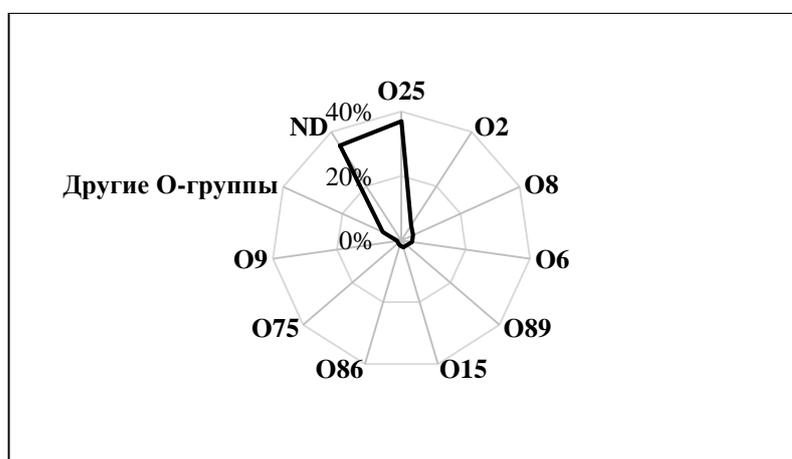
Доля биопленкообразующих штаммов в нашей коллекции (79 %) согласуется с аналогичными показателями (от 50 % до 96 %), полученными в работах других авторов для UPEC [153, 225]. Высокая доля курли-позитивных штаммов в нашей коллекции (73 %) также согласуется с данными, описанными в литературе (до 92 %) [222, 229]. Это подтверждает гипотезу, что способность формировать биопленки позволяет уропатогенным бактериям противостоять механизмам неспецифического иммунитета мочевыводящих путей [11, 50, 98].

Статистическое сходство распространения фенотипических признаков свидетельствует об идентичности выборок штаммов *E. coli*, полученных из разных лечебных учреждений по этим признакам.

## ГЛАВА 4. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

### 4.1 Определение О-групповой принадлежности штаммов *E. coli*

О-групповую принадлежность определяли методом ПЦР с использованием специфичных праймеров на гены *wzx*, *wzy*, *wzt*, *wzm*, *rfbE* или *orf469*, которые кодируют белки, участвующие в биосинтезе ЛПС, согласно работе Iguchi et al. [108]. В ходе исследования 197 штаммов изучаемой коллекции были отнесены к 23 О-группам *E. coli* (рисунок 4.1). Наиболее представленными были серогруппы O25 (n=112), 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). Серогруппы O4, O11, O17, O18, O22, O91, O100, O101, O102, O106, O115, O134 и O143 были представлены реже – идентифицированы у 3 и менее штаммов каждая. Интересно, что, у одного штамма детектированы генетические маркеры двух разных серогрупп: O9 и O21. Для 106 штаммов О-группы не идентифицированы с помощью использованного метода типирования (рисунок 4.1). Интересно отметить, что более 70 % штаммов *E. coli* в нашем исследовании либо имели O25-группу, либо она не была идентифицирована.



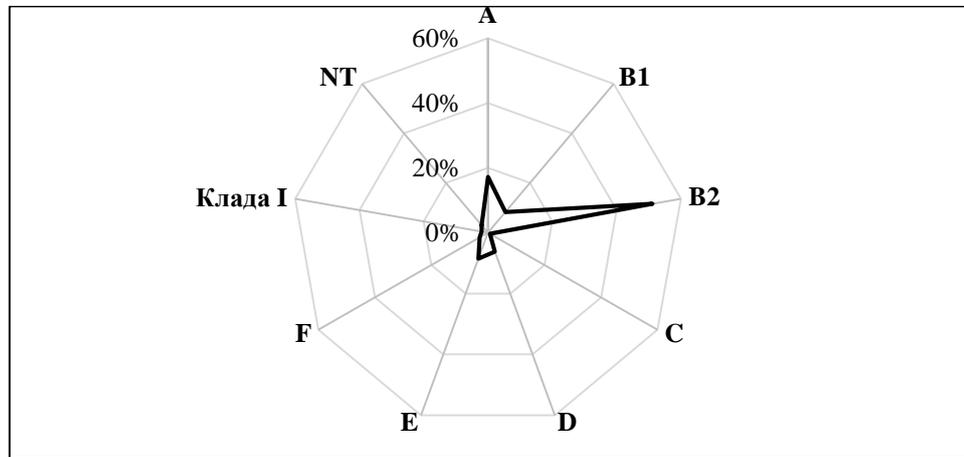
Другие О-группы – О-группы, идентифицированные у 1 % штаммов, каждая; ND – штаммы с неидентифицированными О-группами

Рисунок 4.1 – Представленность штаммов разных О-групп в коллекции *E. coli* (n=303)

В базе данных GenBank депонированы 9 генов, ассоциированных с серогруппами O9, O4 (*E. coli* K353), O4 (*E. coli* U125), O15, O6, O18, O102, O106 и O17, номера доступа ОК491814, ОК491815, ОР783983, ОК491816, ОК491817, ОК491818, ОК491819, ОК491820 и ОК491821, соответственно.

#### 4.2 Принадлежность штаммов *E. coli* к филогенетическим группам

Определена принадлежность 294 изучаемых штаммов *E. coli* к восьми филогенетическим группам: А, В1, В2, С, D, Е, F и кладе I. Для 9 штаммов принадлежность к филогенетической группе не определена (рисунок 4.2).



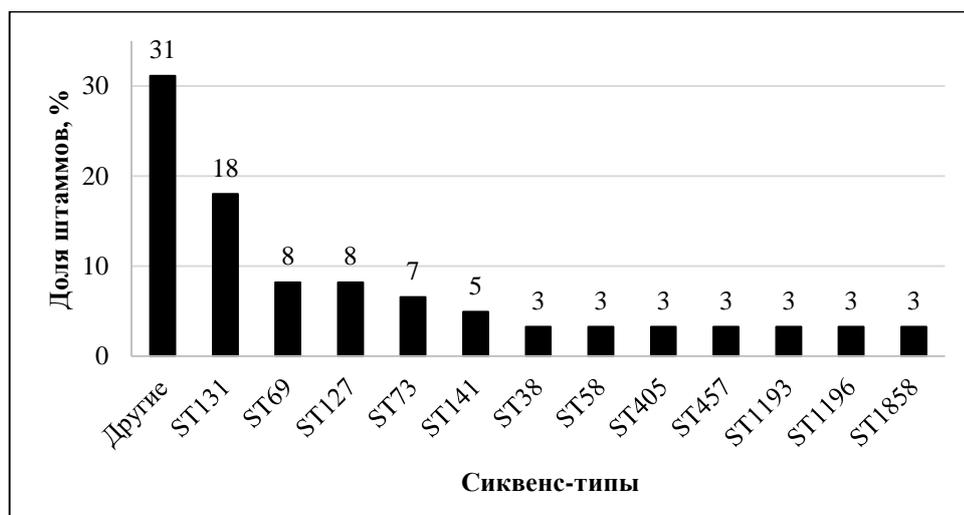
NT – нетипируемые штаммы

Рисунок 4.2 – Представленность штаммов разных филогрупп в коллекции *E. coli* (n=303)

Показано, что наиболее распространенной филогенетической группой являлась В2, сочетания генов которой описаны у 51 % штаммов *E. coli* нашей коллекции, на втором месте группа А – 17 % штаммов, группы В1, Е и D – по 6-9 % и группа С, F, клада I и нетипируемые штаммы – по 1-3 % (рисунок 4.2).

#### 4.3 Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *E. coli*

В ходе исследования 61 штамм *E. coli* отнесены к 31 сиквенс-типу 27 клональных комплексов (рисунок 4.3).



Другие – сиквенс-типы, идентифицированные у 1 штамма каждый

Рисунок 4.3 – Представленность штаммов разных сиквенс-типов в коллекции *E. coli* (n=61)

Показано, что 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, ST5958, ST9239, ST10102 и ST12358 – по 1 штамму. Большинство клональных комплексов штаммов *E. coli* изучаемой коллекции представлены одним сиквенс-типом. Клональный комплекс CC14 включал три сиквенс-типа: ST14, ST1193 и ST1858, и был представлен 5 штаммами. Клональный комплекс CC10 включал сиквенс-типы ST167, ST617 и ST12358, и был представлен 3 штаммами.

Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа, имеющих уникальные аллельные профили генов «домашнего хозяйства» (таблица 4.1).

Таблица 4.1 – 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

Следует отметить, что штаммы *E. coli* U26 и K369 отнесены к известным клональным комплексам CC446 и CC10, соответственно, а штамм *E. coli* U19 – формирует новый клональный комплекс CC10102 (таблица 4.1).

#### 4.4 Генотипирование штаммов *E. coli* методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК

В ходе исследования для всех штаммов *E. coli* изучаемой коллекции, относящихся к серогруппам O2, O6, O8, O9, O11, O15, O18, O25, O75, O86 O89, O91 и O101, проведено RAPD-типирование. Показано, что штаммы серогрупп O2, O4, O6, O8, O9, O15, O18, O25 и O91 в значительной степени были гетерогенны, у них идентифицировано 2 и более RAPD-типов (рисунки 4.4 и 4.5).

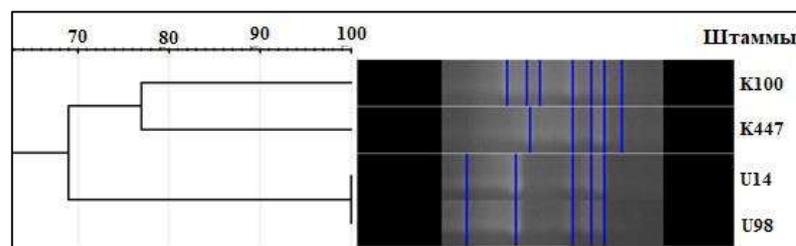


Рисунок 4.4 – RAPD-электрофореграмма/дендрограмма штаммов *E. coli* серогруппы O9, полученные с помощью программы GelJ 2.0

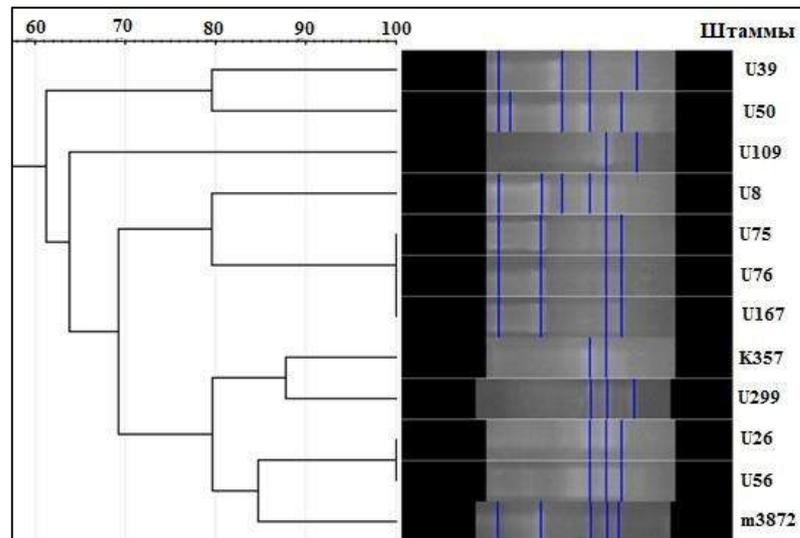


Рисунок 4.5 – RAPD-электрофореграмма/дендрограмма штаммов *E. coli* серогруппы O8, полученные с помощью программы GelJ 2.0

При этом среди штаммов серогрупп O11, O75, O86, O89, O101 и O102 внутри каждой из этих групп гетерогенности не выявлено: они отнесены к одному RAPD-типу, несмотря на то что выделены в разных лечебных учреждениях и в разные периоды времени, например, для 5 штаммов серогруппы O86 (рисунок 4.6).

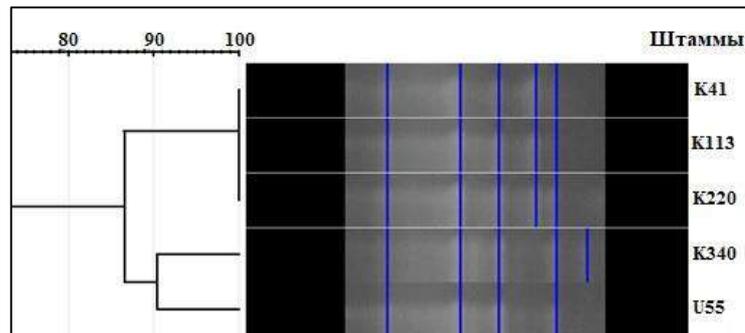


Рисунок 4.6 – RAPD-электрофореграмма/дендрограмма штаммов *E. coli* серогруппы O86, полученные с помощью программы GelJ 2.0

Таким образом, использование данного метода позволило получить дополнительную информацию о степени генетической гетерогенности штаммов *E. coli* в рамках отдельных O-серогрупп: значительную гетерогенность для серогрупп O2, O4, O6, O8, O9, O15, O18, O25 и O91, и отсутствие таковой – для серогрупп O11, O75, O86, O89, O101 и O102.

#### 4.5 Генетические группы штаммов *E. coli*

В ходе исследования 159 штаммов *E. coli* отнесены к 26 генетическим группам, на основании объединения данных по принадлежности штаммов к определенным O-серогруппам, филогруппам, сиквенс-типам и RAPD-типам (таблицы 4.2, 4.3 и 4.4). Показано, что 44 % *E. coli* штамма принадлежали к известным в мире группам UPEC,

при этом 29 % штаммов отнесено к O25-B2-ST131, к O89-A-ST744 и B1-ST58 – по 2 %, а O75-B2-CC14 – по 1 %. Интересно отметить, что штаммы B1-ST58 в нашем исследовании отнесены только к O8- или O9-серогруппам (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Представленность штаммов *E. coli* O8-, O9-, O25-, O75- и O89-серогрупп, с идентифицированными филогруппами, сиквенс-типами, клональными комплексами, RAPD-типами и генетическими группам

О-группа	Филогруппа	ST	CC	RAPD-тип*	Количество штаммов	Генетическая группа
O8	A	ND	ND	O8 <sub>1</sub> , O8 <sub>2</sub>	4	NI
	B1	58	155	O8 <sub>3</sub>	2	B1-ST58
		ND	ND		1	
		297	297		1	O8-B1-ST297
		9239	446	O8 <sub>1</sub>	1	O8-B1-ST9239
		ND	ND	O8 <sub>1</sub> , O8 <sub>4</sub>	2	NI
	D	ND	ND	O8 <sub>3</sub>	1	B1-ST58
E	ND	ND	O8 <sub>4</sub>	1	NI	
O9	A	46	46	O9 <sub>1</sub>	1	O9-A-ST46
		540	540		1	O9-A-ST540
	B1	58	155	O9 <sub>2</sub>	1	B1-ST58
		ND	ND		1	
O25	A	ND	ND	O25 <sub>6</sub> , O25 <sub>7</sub>	2	NI
	B2	131	131	O25 <sub>1</sub>	11	O25-B2-ST131
		ND	ND		78	
		ND	ND	O25 <sub>2</sub>	19	NI
	Клада I	ND	ND	O25 <sub>3</sub>	2	NI
D	ND	ND	O25 <sub>4</sub> , O25 <sub>5</sub>	2	NI	
O75	B2	1193	14	O75 <sub>1</sub>	2	O75-B2-CC14
		ND	ND		1	
O89	A	744	744	O89 <sub>1</sub>	1	O89-A-ST744
		ND	ND		6	

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

К группе A-CC10 отнесено 1 % штаммов *E. coli* нашей коллекции, причем эти штаммы отнесены только к O15 и O101 серогруппам, в том числе штамм с новым сиквенс-типом ST12358 (таблица 4.3).

Группа O6-B2-ST127 в нашем исследовании была представлена 3 штаммами (*E. coli* U66, A4 и U115), однако, на основании RAPD-типирования, к ним же предположительно отнесены дополнительно еще 2 штамма O6-серогруппы (*E. coli* U71 и U23) и 1 штамм O4-серогруппы (*E. coli* U114), таким образом, к группе O4/O6-B2-ST127 в нашей коллекции отнесены 2 % штаммов (таблица 4.3). К распространенной во всем мире группе UPEC D-ST69 в нашем исследовании отнесен только один штамм (*E. coli* U275), но, согласно RAPD-типированию, к этой же группе предположительно отнесены еще 4 штамма: K465 (O15-D-ND), U16 (O15-E-69), U252 (O15-E-ST69) и A5

(O15-E-ND). Таким образом, *E. coli* D-ST69 в нашей коллекции представлены 2 % штаммов (таблицы 4.3).

Таблица 4.3 – Представленность штаммов *E. coli* O2-, O4-, O6-, O15-, O86- и O101-серогрупп, с идентифицированными филогруппами, сиквенс-типами, клональными комплексами, RAPD-типами и генетическими группами

О-группа	Филогруппа	ST	СС	RAPD-тип*	Количество штаммов	Генетическая группа
O2	A	ND	ND	O2 <sub>3</sub>	1	NI
	B2	73	73	O6 <sub>2</sub>	2	O2/O6-B2-ST73
		ND	ND	O2 <sub>1</sub>	1	NI
		141	141	O2 <sub>2</sub>	2	O2-B2-ST141
		ND	ND		9	
	Клада I	ND	ND	O2 <sub>4</sub> , O2 <sub>5</sub>	2	NI
D	ND	ND	O2 <sub>6</sub>	1	NI	
O4	B2	127	127	O6 <sub>3</sub>	1	O4/O6-B2-ST127
	F	12	12	O2 <sub>1</sub>	1	O4-F-ST12
O6	B2	1858	14	O6 <sub>1</sub>	2	O6-B2-ST1858
		73	73	O6 <sub>2</sub>	1	O2/O6-B2-ST73
		127	127	O6 <sub>3</sub>	5	O4/O6-B2-ST127
		ND	ND	O6 <sub>4</sub> , O6 <sub>5</sub>	2	NI
O15	A	167	10	O15 <sub>1</sub>	1	A-CC10
	D	69	69		1	D-ST69
		ND	ND		1	
		69	69		2	
	E	ND	ND		1	
		38	38	O15 <sub>2</sub>	1	O15-E-ST38
O86	D	501	501	O86 <sub>1</sub>	1	O86-D-ST501
		ND	ND		2	
	E	ND	ND		2	
O101	A	617	10	O101 <sub>1</sub>	1	A-CC10
		12358	10		1	

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

К широко представленной во всем мире группе UPEC O6-B2-ST73 в нашем исследовании отнесен только один штамм (*E. coli* U17), однако, на основании RAPD-типирования, к этой группе были предположительно отнесены еще 2 штамма O2-серогруппы (*E. coli* U169 и U217) и один штамм с неидентифицированной серогруппой *E. coli* U292, таким образом, к *E. coli* O2/O6-B2-ST73 в нашей коллекции отнесен 1 % штаммов (таблица 4.3). Кроме вышеуказанных генетических групп, которые описаны в литературе как типичные UPEC, в нашей коллекции идентифицированы также другие группы *E. coli*, впервые выявленные для штаммов, выделенных от пациентов с ИМВП: O8-B1-ST297, O6-B2-ST1858, O8-B1-ST9239, O9-A-ST46, O9-A-ST540, O11-F-ST457, O15-E-ST38, O17-E-ST69, O18-A-ST1434, O18-B2-ST14, O86-D-ST501, O91-B1-ST1196,

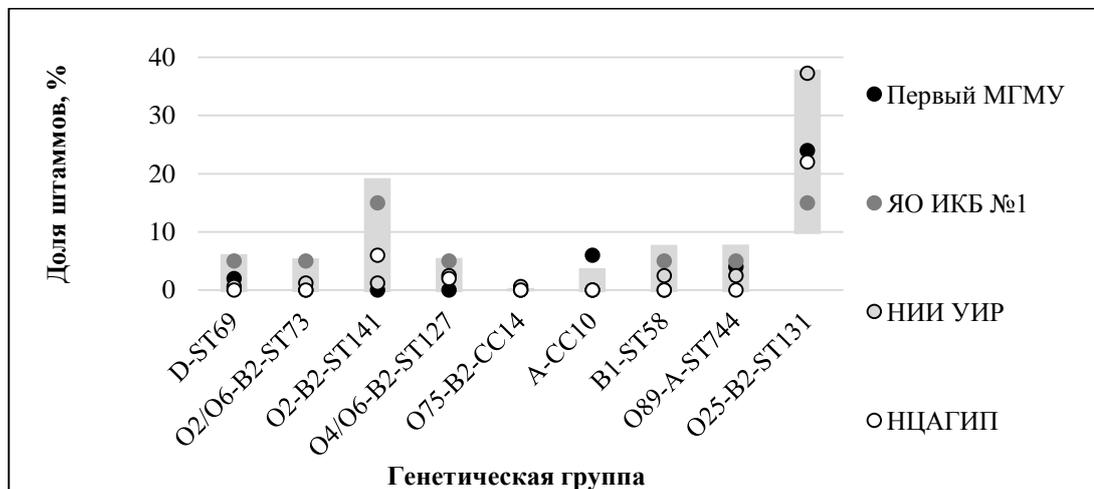
O4-F-ST12, O106-A-ST5958, O134-B2-ST569 и (O21/O9)-A-ST1429 (таблицы 4.2, 4.3 и 4.4).

Таблица 4.4 – Представленность штаммов *E. coli* O21/O9-, O11-, O17-, O18-, O91-, O102-, O106- и O134-серогрупп, с идентифицированными филогруппами, сиквенс-типами и генетическими группам

О-группа	Филогруппа	ST	Количество штаммов	Генетическая группа
O21/O9	A	1429	1	(O21/O9)-A-ST1429
O11	F	457	2	O11-F-ST457
O17	E	69	1	O17-E-ST69
O18	A	1434	1	O18-A-ST1434
	B2	14	2	O18-B2-ST14
O91	B1	1196	2	O91-B1-ST1196
	B2	ND	1	NI
O102	D	405	1	D-ST405
	E		1	
O106	A	5958	1	O106-A-ST5958
O134	B2	569	1	O134-B2-ST569

Примечание: ND – нет данных; NI – не идентифицирована; ST – сиквенс-тип

**Анализ встречаемости генетических групп** среди штаммов *E. coli* выделенных от пациентов Сеченовского университета, Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова проводили IQR методом (рисунок 4.7).



Первый МГМУ – Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ЯО ИКБ №1 – Инфекционная клиническая больница №1 Ярославской области; НИИ УИР – Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина; НЦАГИП – Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова  
 Рисунок 4.7 – Встречаемость генетической группы (точки), относительно диапазона межквартильного расстояния (прямоугольники) у изучаемых штаммов *E. coli* полученных от пациентов разных лечебных учреждений

Показано, что встречаемость восьми генетических групп штаммов от пациентов разных лечебных учреждений находятся в рассчитанном диапазоне, что свидетельствует

о сходстве распространения. При этом для генетической группы А-СС10 доля штаммов из Сеченовского университета (6,00 %) больше верхней границы диапазона межквартильного расстояния (3,75 %), что интерпретируется как выброс данных, зависящий от места выделения штамма (рисунок 4.7).

#### 4.6 Заключение по главе 4

В ходе исследования показана высокая внутривидовая гетерогенность штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП в Российской Федерации в 2005-2020 гг.: идентифицировано 8 филогрупп, 23 О-группы, 31 сиквенс-тип и 26 генетических групп. Показано, что большинство (57,0 %) штаммов принадлежали к типичным для UPEC серогруппам – O25, O2, O8, O15, O6, O75, O9, O18, O11, O4, O102 и O22 [34, 133, 179]. Для 37,0 % штаммов идентифицирована серогруппа O25, что согласуется с долей штаммов этой серогруппы среди UPEC в исследованиях других авторов (от 16,0 % до 56,0 %) в России, Мексике, Иране и Литве [13, 104, 171, 179, 198]. Реже (0,3-6,0 %) нами идентифицированы серогруппы O2, O8, O15, O6, O75, O9, O18, O11, O4, O102 и O22, что аналогично представленности UPEC штаммов этих серогрупп в исследованиях других авторов в России, Мексике, Чехии, Иране, Литве и Словакии [13, 34, 104, 133, 171, 179, 198, 227]. Серогруппы O89, O86, O17 и O134 идентифицированы нами у 2,0 %, 2,0 %, 0,3 % и 0,3 % штаммов *E. coli*, соответственно. По данным литературы, эти серогруппы не относятся к типичным для UPEC [34, 133, 179], однако, в базе данных EnteroBase (URL: <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, дата обращения 5.06.2021) размещены UPEC штаммы этих серогрупп, выделенные во Франции ( $n_{O89}=1$ ,  $n_{O86}=7$ ,  $n_{O17}=8$  и  $n_{O134}=2$ ), Германии ( $n_{O86}=1$  и  $n_{O17}=1$ ) и США ( $n_{O86}=1$  и  $n_{O17}=2$ ). Впервые у штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями, нами идентифицированы серогруппы O91, O100, O101, O106, O115 и O143 с уровнем представленности в коллекции от 1 до 3 % штаммов каждая. При этом, в научной литературе и в базе данных EnteroBase (URL: <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, дата обращения 5.06.2021) не были описаны штаммы *E. coli*, возбудители ИМВП, этих серогрупп.

В ходе исследования нами определена принадлежность изучаемых клинических штаммов к филогенетическим группам *E. coli*: B2 (51 % штаммов), A (17 %), B1 (9 %), E (7 %), D (6 %), клада I (3 %), F (2 %), C (1 %), представленность которых согласуется с

данными, опубликованными в научной литературе, в том числе исследователями из России [14].

Для части коллекции изучаемых штаммов *E. coli* (n=61) определены сиквенс-типы, при этом идентифицированы 31 сиквенс-тип, относящихся к 27 клональным комплексам. Наиболее представленным (18 % штаммов) был сиквенс-тип ST131, что согласуется с долей штаммов UPEC данного сиквенс-типа (от 20 до 55 %) в работах исследователей из Пакистана, Мексики, США и Австралии [45, 154, 161, 194]. Также были идентифицированы сиквенс-типы: ST12, ST14, ST38, ST46, ST58, ST69, ST73, ST93, ST127, ST141, ST167, ST405, ST569, ST617, ST744 и ST1193, которые, согласно опубликованным данным считаются типичными для штаммов UPEC [26, 45, 48, 89, 94, 106, 124, 128, 154, 161, 165, 180, 194, 197, 257]. Кроме того, нами идентифицированы сиквенс-типы ST457, ST297 и ST1196, которые ранее не были описаны в научных работах как возбудители ИМВП, однако в базе данных EnteroBase (URL: <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, дата обращения 5.06.2021) эти сиквенс-типы представлены несколькими UPEC-штаммами, выделенными во Франции (n<sub>ST457</sub>=1), Великобритании (n<sub>ST457</sub>=1 и n<sub>ST297</sub>=1) и Корею (n<sub>ST1196</sub>=1), в отличие от идентифицированных нами сиквенс-типов ST165, ST501, ST540, ST1140, ST1429, ST1434, ST1858 и ST5958, которые не были ассоциированы с возбудителями ИМВП ни в научной литературе, ни в базе данных EnteroBase (URL: <http://enterobase.warwick.ac.uk/species/index/ecoli>, дата обращения 5.06.2021).

Новизной данного исследования явилось описание трех новых сиквенс-типов: ST9239 (CC446), ST12358 (CC10102) и ST10102 (новый CC10102). Впервые для штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России, идентифицированы сиквенс-типы 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, и генетических группы 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.

Статистическое сходство встречаемости генетических групп свидетельствует об высокой идентичности выборок штаммов *E. coli*, полученных из разных лечебных учреждений.

## ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

### 5.1 Генетические детерминанты вирулентности *E. coli*, выделенных от пациентов с инфекцией мочевыводящих путей

Все штаммы *E. coli* изучаемой коллекции протестированы на наличие 20 генов, относящихся к четырем группам: гены адгезинов (*fimH*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *sfaS*, *focG*, *afa/draBC* и *yfcV*), гены факторов поглощения железа (*iroN*, *fyuA*, *iutA* и *chuA*), гены факторов защиты от иммунной системы макроорганизма (*ompT*, *traT*, *kpsMTII* и *kpsMTIII*) и гены токсинов (*hlyA*, *cnfI*, *usp* и *vat*). Выбор перечисленных генов обоснован тем, что, на основании данных литературных источников, они ассоциированы с проявлением вирулентных свойств уропатогенных *E. coli* в урологическом тракте. Показано, что каждый изученный нами бактериальный штамм имел хотя бы один ген вирулентности.

Гены *fimH* и *fyuA* детектированы у более 75 % штаммов, гены *chuA*, *traT*, *ompT*, *iutA*, *yfcV*, *usp* и *kpsMTII* – у 46-69 % штаммов, гены *hlyA*, *cnfI*, *papGII* и *iroN* – у 21-27 % штаммов, гены *vat*, *afa/draBC*, *papGIII*, *sfaS*, *focG* и *kpsMTIII* – у 4-14 % штаммов. Ген адгезина *papGI* в изучаемой коллекции не выявлен (рисунок 5.1).

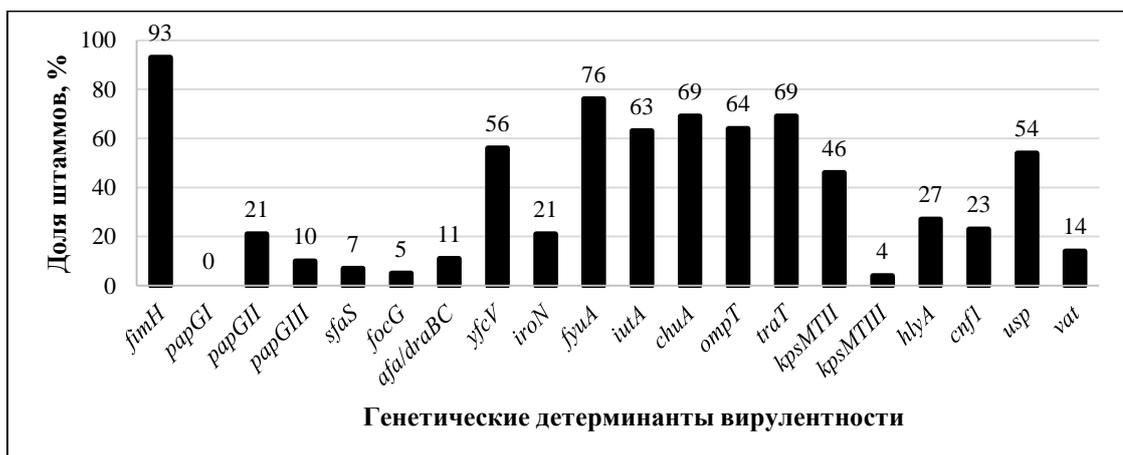
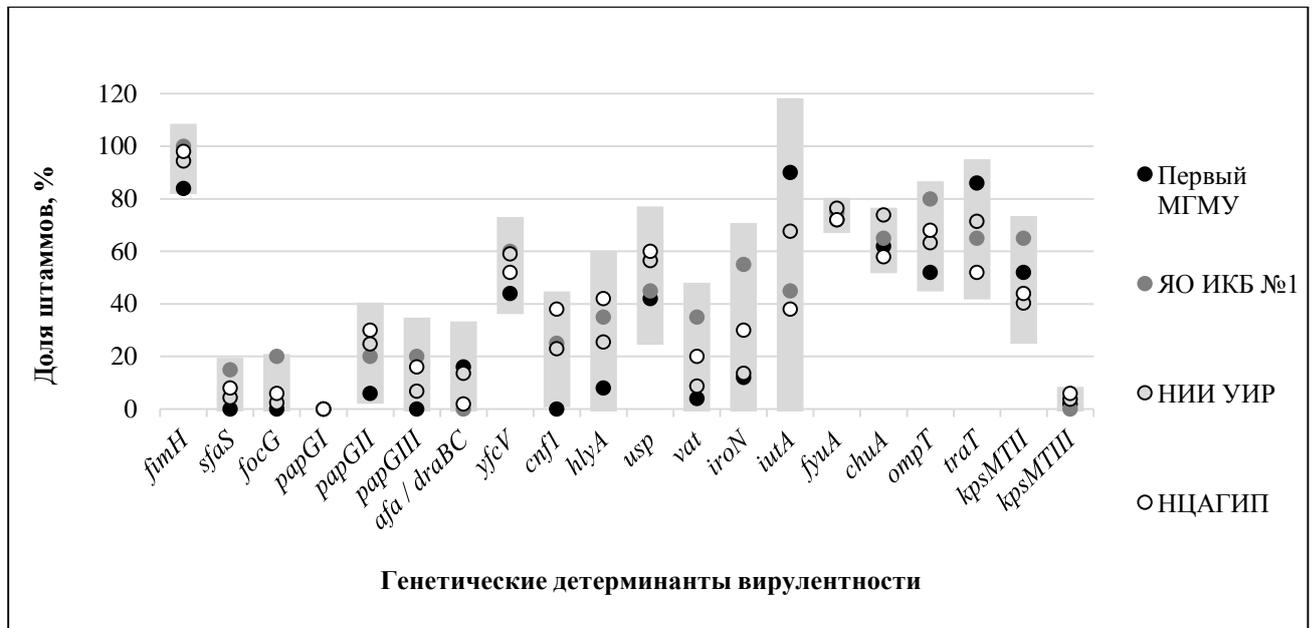


Рисунок 5.1 – Встречаемость генов, ассоциированных с вирулентностью UPEC, в штаммах *E. coli* изучаемой коллекции (n=303)

В базу данных GenBank депонированы 14 генов, ассоциированных с вирулентностью UPEC: адгезины *fimH* (KY007009.1), *afa* (MF495352.1), *focG* (OP783976), *sfaS* (OP783980) и *papGIII* (OP783981); сидерофоры *fyuA* (MF495347.1) и *iroN* (MF495346.1); факторов защиты от иммунной системы макроорганизма *kpsMTII*

(MF495349.1), *ompT* (MF495348.1) и *traT* (OP783978); и токсины *usp* (MF495350.1), *hlyA* (MF495345.1), *cnf1* (OP783979) и *cnf1* (OP783982).

**Анализ встречаемости генов факторов вирулентности UPEC** среди штаммов *E. coli* выделенных от пациентов Сеченовского университета, Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова проводили IQR методом (рисунок 5.2).



Первый МГМУ – Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова; ЯО ИКБ №1 – Инфекционная клиническая больница №1 Ярославской области; НИИ УИР – Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина; НЦАГИП – Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова  
Рисунок 5.2 – Встречаемость генетических детерминант вирулентности (точки), относительно диапазона межквартильного расстояния (прямоугольники) у изучаемых штаммов *E. coli* полученных от пациентов разных лечебных учреждений

Показано, что доля штаммов (0,00 %), от пациентов Сеченовского университета, несущих ген *cnf1* меньше нижней границы диапазона межквартильного расстояния (0,72 %), что интерпретируется как выброс данных, зависящий от места выделения штамма. Встречаемость других генов находится только в зависимости от количества штаммов, выделенных от пациентов этой клиники (рисунок 4.7).

**Сочетания факторов вирулентности генетических групп UPEC.** Для штаммов *E. coli*, отнесенных к широко распространенным в мире генетическим группам UPEC, определены преобладающие гены вирулентности (таблица 5.1).

Штаммы групп O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127 и O2/O6-B2-ST73 характеризовались высоким уровнем носительства генов адгезинов, токсинов и

факторов поглощения железа. Штаммы групп O75-B2-CC14 и O25-B2-ST131 несли гены двух адгезинов и 1-2 токсина. Штаммы B1-ST58, D-ST69, A-CC10 и O89-A-ST744 не несли генетических детерминант токсинов, а адгезины были представлены только геном *fimH*. Кроме того, штаммы группы O89-A-ST744 несли только один из генов сидерофоров, что резко отличает штаммы этой группы от остальных (таблица 5.1).

Таблица 5.1 – Сочетания генов вирулентности штаммов генетических групп UPEC, выделенных в 2005-2020 гг.

Генетическая группа	Гены факторов вирулентности*			
	Адгезины	Токсины	Факторы поглощения железа	Факторы защиты от иммунной системы
O2-B2-ST141 (n=11)	<i>fimH, papG, sfaS, focG, yfcV</i>	<i>cnf, hlyA, usp, vat</i>	<i>iroN, fyuA, chuA</i>	<i>ompT, kpsII</i>
O4/O6-B2-ST127 (n=6)	<i>fimH, papG, sfaS, yfcV</i>	<i>cnf, hlyA, usp, vat</i>	<i>iroN, fyuA, chuA</i>	<i>ompT, kpsII</i>
O2/O6-B2-ST73 (n=4)	<i>fimH, papG, focG, yfcV</i>	<i>cnf, hlyA, usp, vat</i>	<i>iroN, fyuA, iutA, chuA</i>	<i>ompT, kpsII</i>
O25-B2-ST131 (n=89)	<i>fimH, yfcV</i>	<i>usp</i>	<i>fyuA, iutA, chuA</i>	<i>ompT, kpsII, traT</i>
O75-B2-CC14 (n=3)	<i>fimH, yfcV</i>	<i>usp, vat</i>	<i>fyuA, iutA, chuA</i>	<i>ompT, kpsII</i>
D-ST69 (n=5)	<i>fimH</i>	–	<i>fyuA, chuA</i>	<i>traT, ompT, kpsII/III</i>
B1-ST58 (n=5)	<i>fimH</i>	–	<i>iroN, fyuA, iutA</i>	<i>traT</i>
O89-A-ST744 (n=7)	<i>fimH</i>	–	<i>iutA</i>	<i>traT</i>
A-CC10 (n=3)	–	–	<i>fyuA, iutA</i>	<i>traT</i>

Примечание: \* – указанные гены идентифицированы у более половины штаммов, «–» – гены отсутствуют

## 5.2 Определение принадлежности изучаемых *E. coli* к патогруппе UPEC

Согласно большинству медицинских и микробиологических исследований, принадлежность *E. coli* к патогруппе UPEC устанавливают по месту локализации возбудителя: выделение *E. coli* из мочи в концентрации  $>10^5$  КОЕ/мл [16, 79, 81, 85, 265]. По этому критерию все штаммы нашего исследования отнесены к патогруппе UPEC. В работе Marrs et al. к UPEC причисляют штаммы, несущие одну из четырех комбинаций генов вирулентности: *cnf1+hlyA+papGIII*; *cnf1+hlyA+sfaS/focG*; *iutA+hlyA+papGII*; и *iutA+kpsMT+ompT+afa* [163]. Анализ генов, ассоциированных с вирулентностью UPEC, у *E. coli* в нашем исследовании (n=303) показал, что к UPEC-штаммам отнесено только 60 (20 %) штаммов, остальные отнесены к не типизируемым, в

том числе штаммы, относящиеся к генетическим группам, характерным только для UPEC. В другой работе, Spurbeck et al., предложено относить к категории уропатогенных штаммов *E. coli*, несущие комбинацию генов *vat+yfcV+fyuA+chuA* [232]. Анализ штаммов *E. coli* (n=303) в нашем исследовании показал, что такую комбинацию генов несли только 40 (13 %) штаммов, тогда как большая часть штаммов, в том числе с O25-, O6- и O75-серогруппами и B2-филогруппой (относящихся к общепризнанным генетическим группам UPEC), не несли указанной комбинации генов. Таким образом, алгоритмы идентификации штаммов UPEC, описанные в литературе, не позволяют адекватно дифференцировать штаммы изученной коллекции.

**Генотипы вирулентности.** В ходе исследования определяли сочетание 20 генов, ассоциированных с проявлением вирулентности *E. coli* в урологическом тракте, относящихся к 4 функциональным группам: адгезинов, факторов поглощения железа, факторов защиты от иммунной системы макроорганизма и токсинов (таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Представленность генотипов вирулентности в коллекции изучаемых штаммов *E. coli*

GV-тип	А	С	П	Т	Количество, шт.
GV0	–	–	–	–	0
GV1	–	–	–	+	0
GV2	–	–	+	–	0
GV3	–	–	+	+	0
GV4	–	+	–	–	1
GV5	–	+	–	+	0
GV6	–	+	+	–	6
GV7	–	+	+	+	2
GV8	+	–	–	–	10
GV9	+	–	–	+	0
GV10	+	–	+	–	14
GV11	+	–	+	+	0
GV12	+	+	–	–	11
GV13	+	+	–	+	2
GV14	+	+	+	–	84
GV15	+	+	+	+	173

Примечание: 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*, *kpsMTIII* и *kpsMTIII*); Т – гены токсинов (*hlyA*, *cnf1*, *usp* и *vat*)

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 (таблица 5.2). При этом штаммы с генотипами GV0, GV1, GV2, GV3, GV5, GV9 и GV11 отсутствовали в

изучаемой коллекции. Большая часть штаммов *E. coli* изучаемой коллекции (57 %) была отнесена к типу GV15 и содержала хотя бы по одному гену из каждой функциональной группы. Среди штаммов GV15 большинство (86 %) принадлежали к филогруппе B2, а также к серогруппе O25 (63 %) (таблица 5.3 и 5.4).

Таблица 5.3 – Корреляция принадлежности изучаемых штаммов *E. coli* разных GV-типов к филогруппам

GV-тип	Филогенетическая группа								
	A	B1	B2	C	D	E	F	Клада I	NT
GV15 (n=173)	3	0	148	0	8	2	4	6	2
GV14 (n=84)	23	15	6	1	11	22	4	0	2
Другие (n=46)	26	10	0	1	1	2	0	1	5

Примечание: GV-тип – генотип вирулентности; NT – нетипируемый штамм; Другие – генотипы вирулентности GV4, GV6, GV7, GV8, GV10, GV12 и GV13; серым цветом выделены доминирующие значения

Интересно отметить, что штаммы «классических» для UPEC серогрупп – O4, O6, O75 и O102, присутствовали только в GV15 группе генотипов вирулентности (таблица 5.4).

Таблица 5.4 – Корреляция принадлежности изучаемых штаммов *E. coli* разных GV-типов к серогруппам

GV-тип	O-серогруппа							
	O25	O6	O75	O8	O86	O89	O9	O2
GV15 (n=173)	109	9	4	0	1	0	0	16
GV14 (n=84)	1	0	0	6	2	5	3	1
Другие (n=46)	2	0	0	6	2	2	1	0
GV-тип	O-серогруппа							
	O15	O91	O100	O101	O102	O106	O11	O115
GV15 (n=173)	1	1	1	0	1	0	0	0
GV14 (n=84)	5	2	0	2	0	0	2	0
Другие (n=46)	0	0	0	0	0	1	0	2
GV-тип	O-серогруппа							
	O134	O143	O17	O18	O21/O9	O22	O4	ND
GV15 (n=173)	1	0	0	1	0	0	2	26
GV14 (n=84)	0	0	1	0	0	0	0	54
Другие (n=46)	0	1	0	1	1	1	0	26

Примечание: GV-тип – генотип вирулентности; ND – серогруппа не идентифицирована; Другие – генотипы вирулентности GV4, GV6, GV7, GV8, GV10, GV12 и GV13; серым цветом выделены доминирующие значения

Подавляющее большинство штаммов GV15-типа несли гены *fyuA* (97 %), *usp* (94 %), *chuA* (94 %), *ompT* (94 %), *yfcV* (93 %), *iutA* (73 %) и *traT* (71 %). Кроме того,

только среди штаммов *E. coli* GV15-типа встречались штаммы, несущие гены адгезинов *sfaS*, *focG* и *papGIII*, а также гены токсинов *cnf1* и *vat* (таблица 5.5).

Таблица 5.5 – Корреляция принадлежности генов, ассоциированных с вирулентностью UPEC, с GV-типами изучаемых штаммов *E. coli*

GV-тип	Гены вирулентности				
	<i>fimH</i>	<i>papGI</i>	<i>papGII</i>	<i>yfcV</i>	<i>afa/draBC</i>
GV15 (n=173)	172	0	54	161	28
GV14 (n=84)	80	0	10	9	5
Другие (n=46)	36	0	0	0	0
GV-тип	Гены вирулентности				
	<i>papGIII</i>	<i>sfaS</i>	<i>focG</i>	<i>fyuA</i>	<i>chuA</i>
GV15 (n=173)	30	21	14	167	162
GV14 (n=84)	0	0	0	49	43
Другие (n=46)	0	0	0	14	3
GV-тип	Гены вирулентности				
	<i>iutA</i>	<i>iroN</i>	<i>traT</i>	<i>kpsMTII</i>	<i>ompT</i>
GV15 (n=173)	127	42	123	110	163
GV14 (n=84)	53	16	70	22	30
Другие (n=46)	10	5	15	8	2
GV-тип	Гены вирулентности				
	<i>kpsMTIII</i>	<i>usp</i>	<i>hlyA</i>	<i>cnf1</i>	<i>vat</i>
GV15 (n=173)	0	163	79	70	43
GV14 (n=84)	10	0	0	0	0
Другие (n=46)	1	2	2	0	0

Примечание: GV-тип – генотип вирулентности; Другие – генотипы вирулентности GV4, GV6, GV7, GV8, GV10, GV12 и GV13; серым цветом выделены доминирующие значения

В изучаемой коллекции *E. coli* четвертая часть (28 %) штаммов отнесены к GV14 типу (таблица 5.2), из них подавляющее большинство отнесены к неB2 филогруппам (92 %), а также принадлежали к неидентифицированным серогруппам (68 %). При этом, только к GV14 типу отнесены штаммы «классической» для UPEC серогруппы O11 и O15, а также штаммы часто встречающихся у UPEC серогруппы – O17 (таблица 5.4). Подавляющее большинство штаммов GV14-типа несли гены *traT* (83 %), *iutA* (63 %), *fyuA* (58 %) и *chuA* (51 %) (таблица 5.5).

К каждому из остальных GV-типов отнесено не более 5 % штаммов изучаемой коллекции *E. coli* (таблица 5.2). Следует отметить, что подавляющее большинство штаммов этих GV-типов отнесены к неB2 филогруппам и принадлежат к неидентифицированным серогруппам (таблицы 5.3 и 5.4). Кроме того, у этих штаммов не выявлены гены адгезинов, кроме *fimH*, которые встречаются у всех энтеробактерий [22].

На основании полученных в данном исследовании результатов, может быть высказано предложение об отнесении к патогруппе UPEC всех 257 штаммов *E. coli*, классифицированных нами в группы вирулентности GV14 и GV15 (85 % от общего числа штаммов). При этом, к ним относятся штаммы (n=133) 10 генетических групп O25-B2-ST131, D-ST69, B1-ST58, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, O75-B2-CC14, D-ST405, O2/O6-B2-ST73, A-CC10 и O89-A-ST744, многократно описанных в научной литературе как группы UPEC (таблица 5.6).

Таблица 5.6 – Принадлежность штаммов *E. coli* разных генетических групп к генотипам вирулентности

Генетическая группа	GV-тип			Генетическая группа	GV-тип		
	GV15 (n=121)	GV14 (n=30)	Другие (n=8)		GV15 (n=121)	GV14 (n=30)	Другие (n=8)
A-CC10	0	3	0	O8-B1-ST9239	0	1	0
B1-ST58	0	5	0	O8-B1-ST297	0	1	0
D-ST69	1	4	0	O9-A-ST46	0	1	0
D-ST405	1	1	0	O9-A-ST540	0	0	1
O2-B2-ST141	11	0	0	O11-F-ST457	0	2	0
O2/O6-B2-ST73	4	0	0	O15-E-ST38	0	1	0
O4/O6-B2-ST127	6	0	0	O17-E-ST69	0	1	0
O4-F-ST12	1	0	0	O18-A-ST1434	0	0	1
O6-B2-ST1858	2	0	0	O18-B2-ST14	2	0	0
O25-B2-ST131	88	1	0	(O21/O9)-A-ST1429	0	0	1
O75-B2-CC14	3	0	0	O91-B1-ST1196	0	2	0
O86-D-ST501	1	2	2	O106-A-ST5958	0	0	1
O89-A-ST744	0	5	2	O134-B2-ST569	1	0	0

Примечание: GV-тип – генотип вирулентности; Другие – генотипы вирулентности GV4, GV6, GV7, GV8, GV10, GV12 и GV13; серым цветом выделены доминирующие значения

Кроме того, представляется обоснованным классифицировать как UPEC дополнительно другие штаммы *E. coli* (n=18) из групп вирулентности GV14 (восьми генетических групп – O8-B1-ST9239, O8-B1-ST297, O9-A-ST46, O11-F-ST457, O15-E-ST38, O17-E-ST69 и O91-B1-ST1196) и GV15 (пяти генетических групп – O4-F-ST12, O6-B2-ST1858, O18-B2-ST14, O86-D-ST501 и O134-B2-ST569). Штаммы *E. coli* (n=7) еще пяти генетических групп O9-A-ST540, O18-A-ST1434, O106-A-ST5958, (O21/O9)-A-ST1429 и O86-D-ST501, на основании их принадлежности к другим GV-типам, не могут быть отнесены к патогруппе UPEC (таблица 5.6).

Следует заметить, что штаммы *E. coli* с сиквенс-типами ST165, ST1140 и ST1858, которые впервые выделенные от пациентов с урологическими заболеваниями, а также

штаммы с идентифицированными в нашем исследовании новыми сиквенс-типами ST9239, ST10102 и ST12358, на основании их принадлежности к генотипу вирулентности GV14 или GV15, отнесены к патогруппе UPEC (таблица 5.7).

Таблица 5.7 – Принадлежность штаммов *E. coli* разных сиквенс-типов к генотипам вирулентности

Сиквенс-тип	GV-тип			Сиквенс-тип	GV-тип		
	GV15 (n=33)	GV14 (n=22)	Другие (n=6)		GV15 (n=33)	GV14 (n=22)	Другие (n=6)
ST12	1	0	0	ST501	0	0	1
ST14	1	0	0	ST540	0	0	1
ST38	0	2	0	ST569	1	0	0
ST46	0	1	0	ST617	0	1	0
ST58	0	2	0	ST744	0	0	1
ST69	1	4	0	ST1140	0	1	0
ST73	4	0	0	ST1193	2	0	0
ST93	0	1	0	ST1196	0	2	0
ST127	5	0	0	ST1429	0	0	1
ST131	11	0	0	ST1434	0	0	1
ST141	3	0	0	ST1858	2	0	0
ST165	0	1	0	ST5958	0	0	1
ST167	0	1	0	ST9239	0	1	0
ST297	0	1	0	ST10102	1	0	0
ST405	1	1	0	ST12358	0	1	0
ST457	0	2	0				

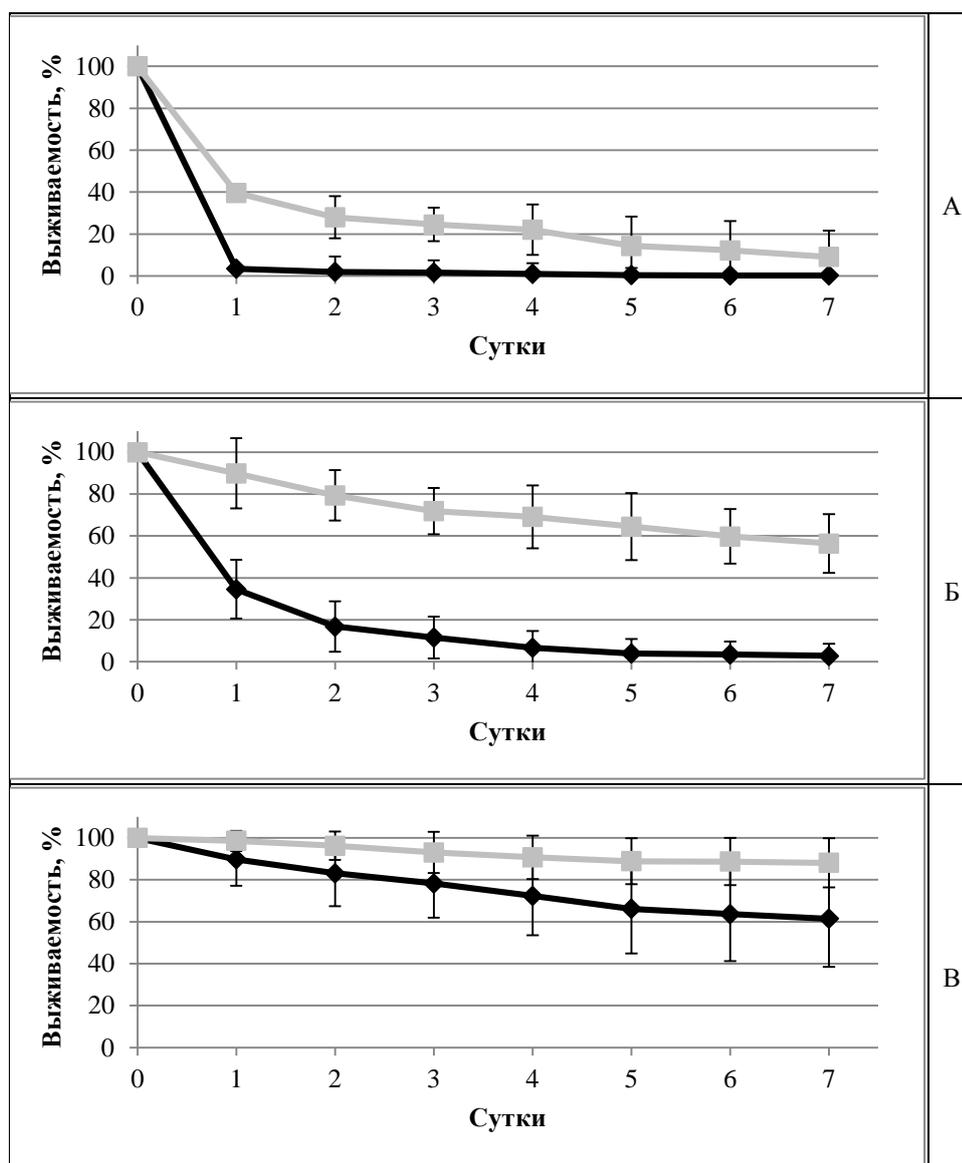
Примечание: GV-тип – генотип вирулентности; Другие – генотипы вирулентности GV7, GV8, GV10 и GV12; серым цветом выделены доминирующие значения

Таким образом, предложенная нами классификация штаммов *E. coli* на принадлежность к патогруппам UPEC и не-UPEC основана на оценке наличия у них генов, ассоциированных с факторами вирулентности, обеспечивающими бактериям выживание и размножение в урологическом тракте.

### 5.3 Оценка вирулентности штаммов *E. coli* на модели личинок *Galleria mellonella*

Вирулентность штаммов *E. coli* изучаемой коллекции (n=209) была протестирована на модели личинок *Galleria mellonella*. Показано, что все протестированные штаммы *E. coli* были вирулентными для гусениц большой восковой моли: они вызывали гибель 100 % личинок на седьмые сутки после заражения в дозе  $10^9$  КОЕ/особь, при этом дозы менее  $1 \times 10^3$  КОЕ гибели личинок не вызывали. Анализ кривых выживаемости личинок *G. mellonella* после заражения штаммами *E. coli* в дозах

$10^6$  и  $10^7$  КОЕ/особь позволил дифференцировать штаммы на высоко-, средне- и низковирулентные (рисунок 5.3).



А – высоковирулентные; Б – средневирулентные; В – низковирулентные

Рисунок 5.3 – Выживаемость личинок *Galleria mellonella* после заражения бактериями *E. coli* в дозах  $10^7$  КОЕ/особь (черный цвет) и  $10^6$  КОЕ/особь (серый цвет)

Заражение высоковирулентными штаммами *E. coli* (n=92) в дозах  $10^6$  и  $10^7$  КОЕ/особь вызывало гибель 80-100 % личинок на 4 сутки (рисунок 5.3А). Средневирулентные штаммы *E. coli* (n=76) при заражении в дозе  $10^7$  КОЕ/особь вызывали гибель 80-100 % личинок на 4 сутки, а при заражении в дозе  $10^6$  КОЕ/особь – гибель 50-70 % личинок на 4 сутки (рисунок 5.3Б). Низковирулентные штаммы *E. coli* (n=41) при заражении в дозах  $10^6$  и  $10^7$  КОЕ/особь вызывали гибель <50 % личинок на 4 сутки (рисунок 5.3В).

В тестируемой выборке (n=209) были штаммы UPEC, отнесенные к генотипам вирулентности GV14 (n=57) и GV15 (n=116), и генетическим группам A-CC10 (n=3), B1-ST58 (n=5), D-ST69 (n=4), O2/O6-B2-ST73 (n=2), O2-B2-ST141 (n=8), O4/O6-B2-ST127 (n=4), O25-B2-ST131 (n=57), O75-B2-CC14 (n=3) и O89-A-ST744 (n=7). Кроме того, были протестированы штаммы, для которых принадлежность к UPEC не установлена: типы GV4 (n=1), GV6 (n=8), GV7 (n=2), GV8 (n=7), GV10 (n=8), GV12 (n=8) и GV13 (n=2). Анализ кривых выживаемости личинок *G. mellonella* после заражения штаммами *E. coli* показал, что штаммы O75-B2-CC14, O89-A-ST744 и O4/O6-B2-ST127 более вирулентны для личинок *G. mellonella*, чем штаммы B1-ST58 и O25-B2-ST131 (таблица 5.8).

Таблица 5.8 – Представленность генетических групп штаммов *E. coli* с определенным уровнем вирулентности для личинок *G. mellonella*

Генетическая группа	Количество штаммов, проявляющих вирулентность на модели личинок <i>G. mellonella</i> , шт.		
	низко	средне	высоко
A-CC10 (n=3)	1	0	2
B1-ST58 (n=5)	1	3	1
D-ST69 (n=4)	1	0	3
O2/O6-B2-ST73 (n=2)	1	0	1
O2-B2-ST141 (n=8)	2	1	5
O4/O6-B2-ST127 (n=4)	0	2	2
O25-B2-ST131 (n=57)	12	32	13
O75-B2-CC14 (n=3)	0	1	2
O89-A-ST744 (n=7)	0	4	3

Примечание: серым цветом выделены значения отличные от нуля

Интересно отметить, что среди штаммов групп O2/O6-B2-ST73, O2-B2-ST141, D-ST69 и A-CC10 примерно в равных долях присутствовали как высоковирулентные, так и низковирулентные штаммы (таблица 5.8). При этом, корреляции между уровнем вирулентности для личинок *G. mellonella* и носительством генов вирулентности не выявлено.

Анализ бактериологических высевов гемолимфы личинок *G. mellonella*, после заражения, показал, что гемолимфа всех погибших личинок обсеменена бактериями *E. coli*. Напротив, гемолимфа выживших личинок, перешедших на стадию предкуколки и сформировавших кокон, не содержала бактерий *E. coli*. Это позволило высказать предположение, что гибель личинок в модельных экспериментах по оценке степени

вирулентности штаммов *E. coli* происходила по причине развития бактериальной инфекции.

#### **5.4 Разработка методических рекомендаций для оценки вирулентности на модели личинок *Galleria mellonella***

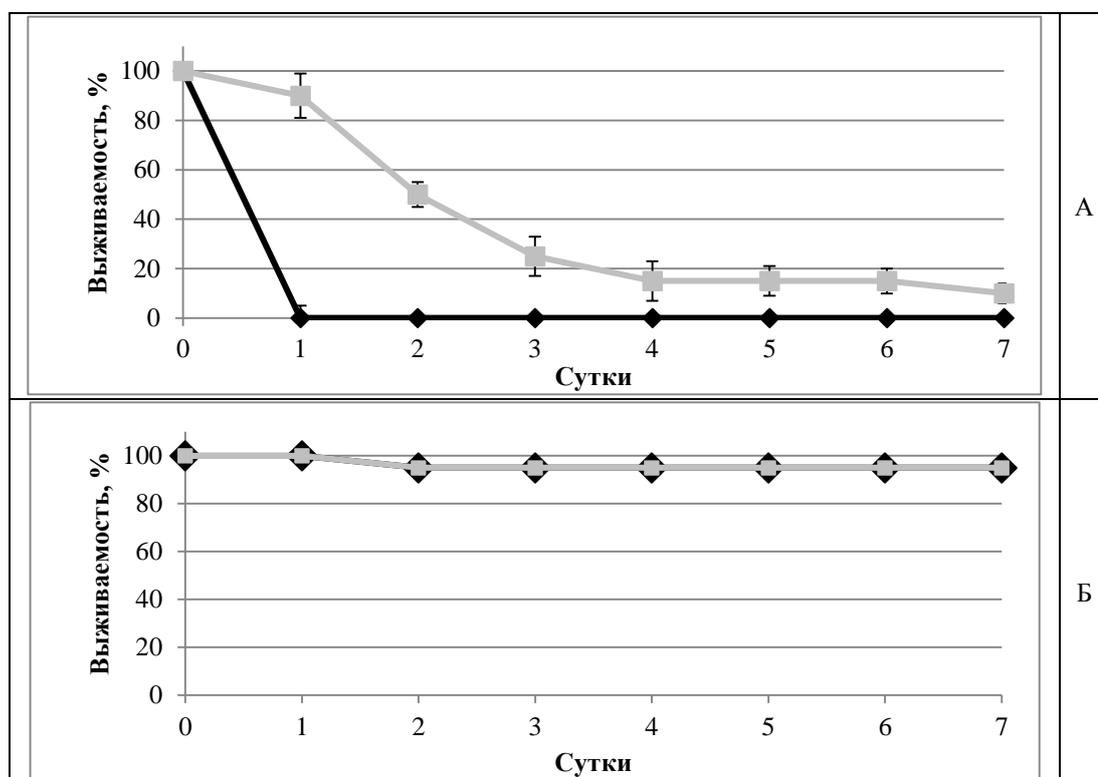
Использование модели насекомых имеет ряд практических и биологических преимуществ перед традиционными моделями млекопитающих, а именно: использование большого количества особей для получения статистически достоверных результатов, проведение сравнительного анализа между слабовирулентными штаммами, относительно низкие затраты на их разведение и утилизацию, отсутствие этических требований при использовании в экспериментах. Анализ результатов исследований вирулентности штаммов *E. coli* и других видов на модели личинок *G. mellonella* позволил обобщить полученные данные и разработать методические рекомендации учережденческого уровня, в которых изложен алгоритм оценки вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок *G. mellonella* (Приложение Г).

В качестве референсных предложены штаммы *E. coli* U15 и *E. coli* C600. Штамм *E. coli* U15 (Номер В-8431 в «ГКПМ-Оболенск») выделен 09.01.2017 в ИКБ №1 г. Ярославль из мочи пациентки с хроническим циститом; штамм лактозоположительный, подвижный, курлиположительный, колицин-продуцирующий, образует биопленку, чувствительный к антибиотикам, несет гены, ассоциированные с O2 серогруппой и B2 филогруппой, несет гены вирулентности *fimH*, *cnf1*, *hlyA*, *iroN*, *fyuA*, *sfaS*, *focG*, *ompT*, *papGIII*, *traT*, *kpsMTII* и *usp*. При этом штамм *E. coli* U15 отнесен к патогруппе UPEC GV15-типа. Штамм *E. coli* C600 (Номер В-2409 в «ГКПМ-Оболенск») получен в 1953 г. в Калифорнийском технологическом институте (Пасадена) последовательной мутацией из штамма *E. coli* K-12, который в свою очередь получен в 1922 г. из кала выздоравливающего пациента с дифтерией (Стэнфорд); штамм *E. coli* C600 лактозоположительный, неподвижный, курлиположительный, не колицин-продуцирующий, образует биопленку, чувствительный к антибиотикам, несет гены, ассоциированные с А филогруппой.

Кроме штаммов *E. coli*, в методических рекомендациях предложены референсные штаммы других видов: *K. pneumoniae* i261 (Номер В-7850 в «ГКПМ-Оболенск») – клинический штамм, выделен из легочной мокроты пациента ОРИТ ФГАУ НМИЦ НХ им. Н.Н. Бурденко г. Москвы в 2014 г.; *S. aureus* MW2 (Номер В-7362 в «ГКПМ-

Оболенск») – типовой патогенный штамм, выделен в Северной Дакоте в 1998 г.; и *B. cereus* F (Номер В-6822 в «ГКПМ-Оболенск») – непатогенный штамм, выделен из реликтовой породы Мамонтовой горы в 2009 г.

На модели личинок *G. mellonella* для референсных штаммов установлен уровень LD<sub>50</sub>: *E. coli* U15 – 10<sup>5</sup> КОЕ, *E. coli* C600 – 10<sup>7</sup> КОЕ, *K. pneumonia* i261 – 10<sup>5</sup> КОЕ, *S. aureus* MW2 – 5×10<sup>4</sup> КОЕ, и *B. cereus* F – 5×10<sup>5</sup> КОЕ. Показано изменение уровня выживаемости личинок *G. mellonella* для референсных штаммов, на основании которого *E. coli* U15 и *E. coli* C600 относят к высоко- и низковирулентным, соответственно (рисунок 5.4).



А – *E. coli* U15; Б – *E. coli* C600

Рисунок 5.4 – Выживаемость личинок *Galleria mellonella* после заражения бактериями *E. coli* в дозах 10<sup>7</sup> КОЕ/особь (черный цвет) и 10<sup>6</sup> КОЕ/особь (серый цвет)

Изучение выживаемости личинок *Galleria mellonella* после их заражения штаммами *E. coli* позволило оценивать вирулентность микроорганизмов, сравнивать полученные результаты между собой и с литературными данными, проводить эпидемиологический анализ инфекционных ситуаций в разных регионах и в разные периоды времени.

### 5.5 Заключение по главе 5

В результате проведенного исследования в 303 штаммов *E. coli* были детектированы гены вирулентности. Показана высокая гетерогенность штаммов *E. coli*

по наличию у них генов вирулентности. Гены *fimH*, *fyuA*, *chuA*, *iutA*, *yfcV*, *traT*, *ompT*, *kpsMTII* и *usp* детектированы у большей части штаммов коллекции. Ген *fimH* детектирован в подавляющем большинстве штаммов *E. coli* нашей коллекции, что согласуется с аналогичными результатами из опубликованных ранее работ исследователей из Южной Кореи, Мексики и Ирана [139, 154, 201, 220]. Более 75 % штаммов нашего исследования несли ген рецептора сидерофора иерсиниабактина *fyuA*, что соотносимо, согласно отечественной публикации Казанцева и соавт., 2019, со встречаемостью другого гена этого же оперона – *irp2*, который был детектирован у 79 % штаммов UPEC [14]. Следует заметить, что по данным литературы, в мире встречаемость гена *fyuA* в штаммах UPEC очень вариабельна, и колеблется от 11 % в исследованиях из Мексики до 70 и 81 % из Монголии и Колумбии [51, 174, 190]. Более чем у половины штаммов изучаемой коллекции встречались гены *iutA*, *traT* и *ompT*, что соответствует данным из разных регионов мира [14, 51, 174, 190]. Ген *usp* выявлен примерно у половины штаммов *E. coli* нашей коллекции, а по литературным данным (из России, Колумбии, Турции и Монголии) его встречаемость составляет от 3 % до 59 % [14, 51, 61, 174]. Гены *papGII*, *iroN* и *cnfI* встречались примерно у 20 % наших штаммов, в то время как, по данным литературы, ген *papGII* детектировали у 33-57 % штаммов UPEC, ген *iroN* – у 36-68%, а ген *cnfI* – у 7-83 % [14, 61, 134, 154, 220]. Гены *afa*, *papGIII*, *sfaS* и *focG* были описаны примерно у 10 % штаммов нашей коллекции, а по данным литературы, в мире эти гены обнаруживали у 5-23 %, 0-57 %, 5-64 % и 8-58 % штаммов UPEC, соответственно [14, 134, 174, 201, 220, 260]. Ген *papGI* в штаммах нашей коллекции не обнаружен. Ген *hlyA* детектировали у 27 % штаммов *E. coli* нашей коллекции, а по литературным данным его встречаемость составляла от 4 % до 76 % в работах исследователей из России, Турции, Словакии, Мексики и Ирана [14, 61, 134, 154, 220]. Гены *kpsMTII* и *kpsMTIII* были описаны у 46 % и 4 % штаммов *E. coli* нашей коллекции, а по литературным данным встречаемость этих генов составляла 13-67 % и 0-47 % в штаммах UPEC, соответственно [14, 51, 61, 134, 174, 201, 220, 260].

Статистическое сходство встречаемости генов вирулентности в штаммах *E. coli*, полученных из Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова свидетельствует об идентичности выборок штаммов. Атипично низкий уровень штаммов, несущих ген *cnfI* в коллекции из Сеченовского университета предположительно связан с отбором штаммов по принципу антибиотикорезистентности.

В изучаемой коллекции штаммов *E. coli* описаны 9 вариантов сочетаний 4 функциональных групп генов, ассоциированных с вирулентностью в урологическом тракте – генотипов вирулентности или GV-типов. Наиболее распространенной являлась группа GV15 (57 %), штаммы которой отнесены преимущественно к B2-филогруппе, O25-серогруппы (встречаются O4-, O6-, O75- и O102-серогруппы), и несут гены *fyuA*, *usp*, *chuA*, *ompT*, *yfcV*, *iutA* и *traT*. Только среди *E. coli* GV15-типа встречаются штаммы несущие гены *cnf1*, *vat*, *sfaS*, *focG* и *papGIII*. Штаммы GV14-типа (28 %) преимущественно отнесены к неB2 филогруппам и не выявленным серогруппам (встречаются O11-, O15- и O17-серогруппы), и несут гены *traT*, *iutA*, *fyuA* и *chuA*. На основании анализа генов, ассоциированных с вирулентностью в урологическом тракте, штаммы генотипов вирулентности GV14 и GV15 отнесены к патогруппе UPEC.

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.

Штаммы UPEC групп O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127 и O2/O6-B2-ST73 нашей коллекции характеризовались наличием большого разнообразия адгезинов и токсинов, присутствием сидерофоров, капсулы 2 группы и протеазы внешней мембраны. Детекция в штаммах O2-B2-ST141 и O4/O6-B2-ST127 генов *fimH*, *papGIII*, *cnf1* и *fyuA* соответствует литературным данным [89, 94, 106, 142, 180]. Интересно отметить, что высокая встречаемость гена гемолизина в штаммах O4/O6-B2-ST127 изучаемой коллекции согласуется с данными полученными от европейских исследователей и противоречит данным иранских исследователей [89, 94, 106, 180]. Детекция в штаммах O2/O6-B2-ST73 нашей коллекции генов *papG*, *sfa/foc*, *fimH*, *hlyA*, *cnf1*, *vat*, *iroN*, *fyuA*, *kpsMIII*, *usp* и *ompT* отвечает описанному в литературе [209]. При этом штаммы UPEC нашей коллекции отнесенные к группе O4/O6-B2-ST127 характеризовались высокой вирулентностью на модели личинок *G. mellonella*, а штаммы групп O2-B2-ST141 и O2/O6-B2-ST73 были представлены как высоко-, так и низковирулентными штаммами.

Штаммы UPEC генетических групп O75-B2-CC14 и O25-B2-ST131 в нашей коллекции характеризовались наличием небольшого разнообразия адгезинов,

сидерофоров, капсулы 2 группы и протеазы внешней мембраны, а для штаммов O25-B2-ST131 также характерно наличие антисывороточного липопротеина. При этом разнообразие токсинов в обеих группах было незначительное. На модели личинок *G. mellonella* штаммы O75-B2-CC14 и O25-B2-ST131 нашей коллекции отличались высокой и средней вирулентностью, соответственно. Высокая встречаемость в штаммах группы O25-B2-ST131 нашей коллекции генов вирулентности *fimH*, *iutA*, *kpsMII*, *usp*, *traT* и *ompT* соответствует литературным данным [45, 61, 89, 106, 154, 180, 209]. Интересно, что в нашем исследовании более половины штаммов O25-B2-ST131 несли гены рецептора иерсиниабактина (*fyuA*), а треть штаммов гены гемолизина (*hlyA*), что соответствует работам из Мексики, Турции, Швейцарии, Франции и Испании [61, 89, 154, 180], но в тоже время резко отличается от данных английских и иранских авторов, у которых гены этих оперонов встречаются в менее четверти штаммов каждый [45, 94, 106]. Кроме того, большая часть (>50 %) штаммов группы O25-B2-ST131 нашей коллекции несли гены *kpsMII* и *ompT*, что соответствует испано-французскому исследованию [89], между тем как в работах других авторов эти гены встречаются крайне редко – 21-26 % и 0 %, соответственно [45, 61, 94]. В нашем исследовании штаммы группы O75-B2-CC14 несли гены вирулентности *fimH*, *iutA*, *fyuA* и *kpsMII*, что аналогично литературным данным. Однако при этом, штаммы нашей коллекции, отнесенные к O75-B2-CC14, несли гены *vat*, *usp* и *ompT*, при полном отсутствии генов *cnf1* и *traT*, что характерно исключительно для австралийского подтипа [119, 180, 197]. При этом в наших штаммах отсутствовали гены адгезина Р-фимбрий, а у штаммов выделенных в США и Австралии эти гены преобладали [180, 197].

Штаммы UPEC групп B1-ST58 и D-ST69 в изучаемой коллекции характеризовались и наличием большого разнообразия сидерофоров и антисывороточного липопротеина, при полном отсутствии токсинов и капсулы. При этом для штаммов D-ST69 характерно наличие протеазы внешней мембраны. Отсутствие в штаммах B1-ST58 генов всех детектируемых токсинов и капсул аналогично литературным данным исследователей из Испании, Республики Конго, Австралии и Швейцарии [89, 109, 167, 180]. Интересно отметить, что штаммы, выделенные с пищевых продуктов в Германии в 2016-2017 гг. и относящиеся к группе B1-ST58 не несли генов вирулентности *iroN*, *iutA*, *fyuA* и *traT* [205]. В нашем исследовании штаммы D-ST69 несли гены вирулентности *fimH*, *fyuA* и *traT* что

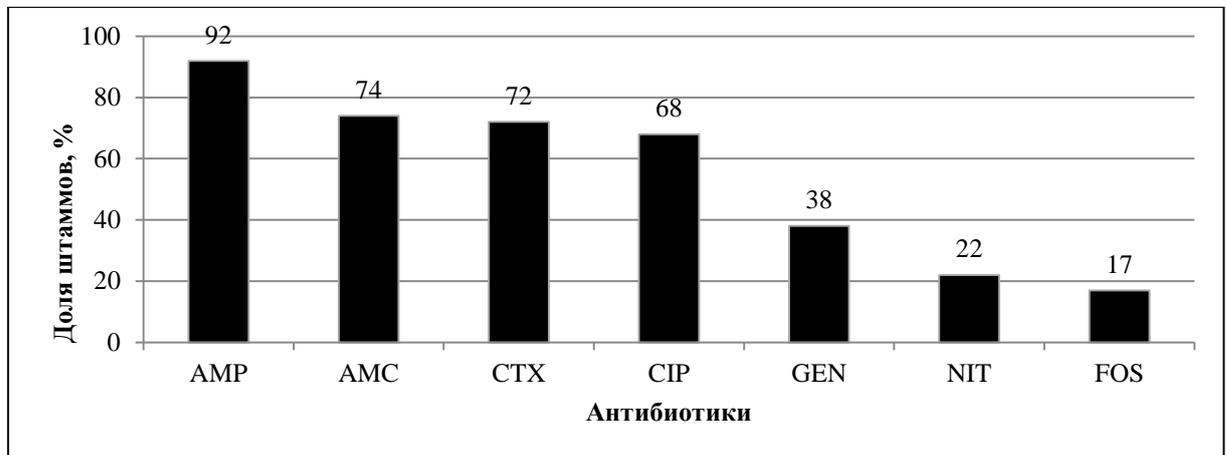
аналогично литературным данным. При этом в штаммах нашей коллекции редко встречались гены *papGII*, *iutA* и *kpsMTII*, что резко отличает их от представителей *E. coli* «клональной группы А», идентифицированных в США и распространенных во всем мире [160, 209]. Следует отметить, что группа D-ST69 в нашей коллекции была представлена как высоко-, так и низковирулентными для личинок *G. mellonella* штаммами, а B1-ST58 – только средневирулентными.

Штаммы UPEC групп А-CC10 и O89-A-ST744 в изучаемой коллекции характеризовались относительной бедностью содержания генов факторов вирулентности: полным отсутствием токсинов и капсулы, небольшим количеством адгезинов и сидерофоров, наличием антисывороточного липопротеина. Следует отметить, что профили генов вирулентности для штаммов А-CC10 и O89-A-ST744 нашей коллекции в основном соответствует описанному в литературе [89, 99, 133, 180, 204]. Однако, в штаммах O89-A-ST744 изучаемой коллекции не выявлен ген гемолизина, а по литературным данным он характерен для этой генетической группы [133]. При этом, к А-CC10 в изучаемой коллекции были отнесены как высоко-, так и низковирулентные для личинок *G. mellonella* штаммы, а к O89-A-ST744 – преимущественно высоковирулентные.

## ГЛАВА 6. ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ ШТАММОВ *E. COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

### 6.1 Чувствительность штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам

**Чувствительность планктонных культур к антибиотикам.** Изучена чувствительность 303 штаммов *E. coli* к 7 антибиотикам 5 функциональных классов, применяемых для лечения урологических заболеваний: бета-лактамам (ампициллин, амоксициллин/клавулановая кислота и цефотаксим), фторхинолонам (ципрофлоксацин), аминогликозидам (гентамицин), производные фосфоновой кислоты (фосфомицин) и нитрофуранам (нитрофурантоин) (рисунок 6.1).



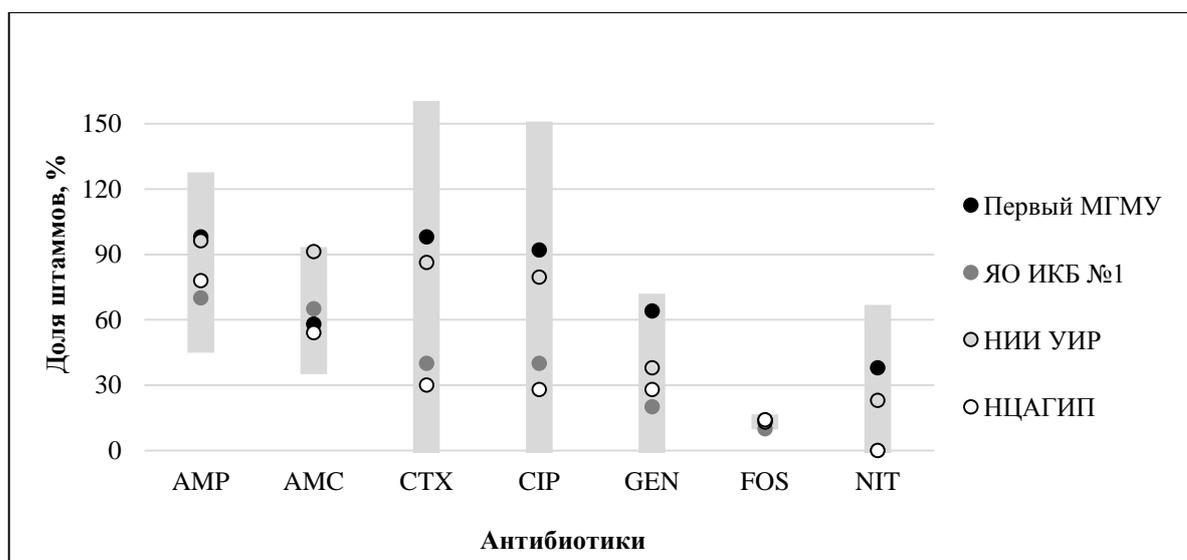
AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – цiproфлоксацин, GEN – гентамицин, NIT – нитрофурантоин, FOS – фосфомицин  
 Рисунок 6.1 – Представленность штаммов *E. coli* (n=303), устойчивых к антибиотикам

Показано, что более 50 % штаммов изучаемой коллекции были устойчивы к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму и цiproфлоксацину; более 30 % – к гентамицину, а 20 % – к нитрофурантоину.

Согласно градации уровней устойчивости Magiorakos et al., в нашей коллекции 5 % штаммов *E. coli* обладали S-фенотипом (чувствительные), 49 % – R-фенотипом (устойчивые) и 46 % – MDR-фенотипом (множественно устойчивые).

**Анализ встречаемости резистентности к антибиотикам** среди штаммов *E. coli* выделенных от пациентов Сеченовского университета, Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова проводили IQR методом (рисунок 6.2). Показано, что для каждого из антибиотиков встречаемость резистентных штаммов, от пациентов разных лечебных учреждений, находятся в рассчитанном

межквартильном диапазоне, что свидетельствует о сходстве антибиотикорезистентности штаммов из всех анализируемых учреждений (рисунок 6.2).



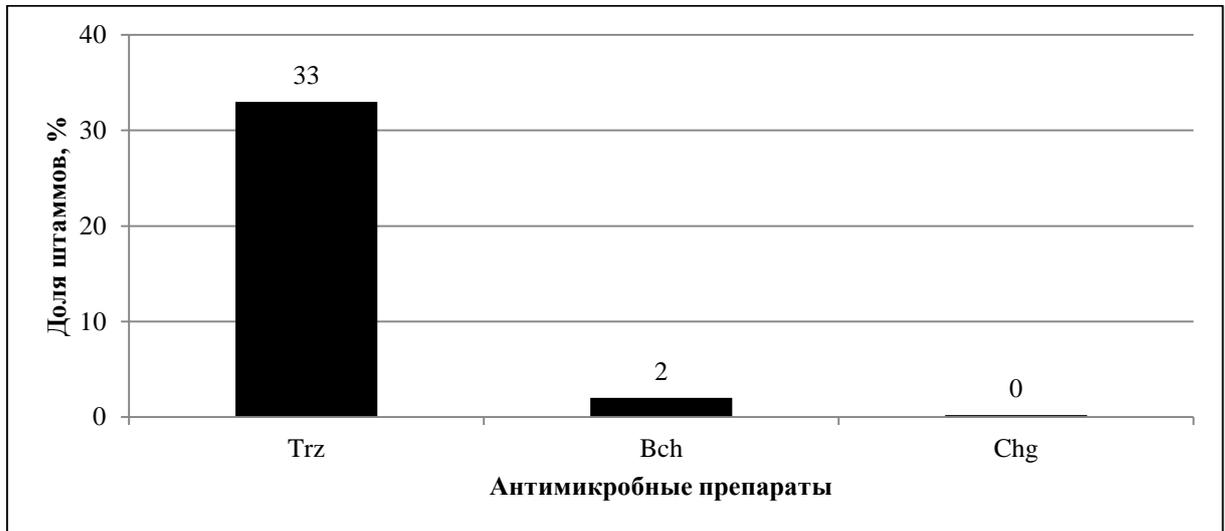
AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – ципрофлоксацин, GEN – гентамицин, NIT – нитрофурантоин, FOS – фосфомицин, Первый МГМУ – Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова; ЯО ИКБ №1 – Инфекционная клиническая больница №1 Ярославской области; НИИ УИР – Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина; НЦАГИП – Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова

Рисунок 6.2 – Встречаемость резистентности к антибиотикам (точки), относительно диапазона межквартильного расстояния (прямоугольники) у изучаемых штаммов *E. coli* полученных от пациентов разных лечебных учреждений

**Чувствительность планктонных культур к антисептикам/дезинфектантам.** Изучена чувствительность 303 штаммов *E. coli* к применяемым в медицинских учреждениях Российской Федерации антисептикам/дезинфектантам классов бигуанидинов – хлоргексидину, бисфенолов – триклозану и четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) – бензалконию хлориду (рисунок 6.3). Уровень устойчивости определяли относительно МПК<sub>ECOFF</sub> согласно работе Morrissey et al. [173].

Показано, что треть штаммов была устойчива к триклозану, и незначительное количество к бензалконию хлориду (рисунок 6.3). Следует отметить, что три штамма показали устойчивость как к триклозану, так и к бензалконию хлориду. При этом все штаммы *E. coli* изученной коллекции были чувствительны к хлоргексидину. Следует отметить, что из 98 изученных штаммов, устойчивых согласно МПК<sub>ECOFF</sub> только к триклозану, 55 % обладали MDR-фенотипом, 36 % – R-фенотипом, а 3 % – S-фенотипом. Все 3 штамма, устойчивых только к бензалконию хлориду, обладали R- и

MDR-фенотипом (1 и 2 штамма, соответственно). Из штаммов *E. coli* устойчивых согласно МПК<sub>ЕСОFF</sub> к триклозану и бензалконию хлориду 1 штамм обладал MDR-фенотипом, 1 штамм – R-фенотипом и 1 штамм – S-фенотипом.



Trz – триклозан, Bch – бензалконий хлорид, Chg – хлоргексидин

Рисунок 6.3 – Представленность штаммов *E. coli* (n=303), устойчивых к антисептикам/дезинфектантам

**Чувствительность к АМП биопленочных культур.** Все штаммы *E. coli* нашей коллекции, которые обладали чувствительностью к используемым антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам, были протестированы на устойчивость биопленок к этим же препаратам. Оценку чувствительности биопленок проводили методом аппликации фрагмента биопленки, полученной способом «biofilm macrocolony», на плотную питательную среду с АМП (рисунок 6.4) [38].

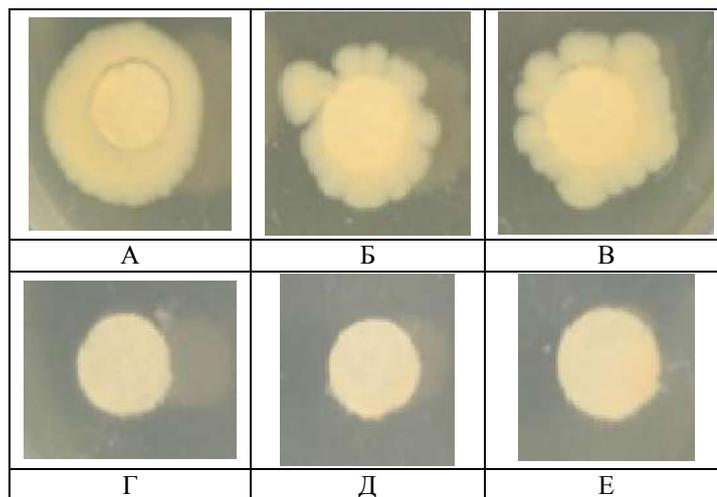


Рисунок 6.4 – Результаты тестирования биопленок штамма *E. coli* U8 на плотной питательной среде с ципрофлоксацином 1 (Б), 2 (В), 4 (Г), 8 (Д) и 16 мг/л (Е), а также на контрольной чашке без ципрофлоксацина (А)

Показано, что более 90 % штаммов, чувствительных в планктонном виде к ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму, гентамицину, фосфомицину и нитрофурантоину, а также бензалконию хлориду, хлоргексидину и триклозану, в виде биопленок были устойчивы к этим препаратам. В то же время только чуть более трети штаммов показали устойчивость к цiproфлоксацину (таблица 6.1).

Таблица 6.1 – Представленность штаммов *E. coli* с R- и S-фенотипами планктонных культур и 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)
<i>планктонные культуры</i>										
R	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
S	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
<i>биопленки</i>										
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

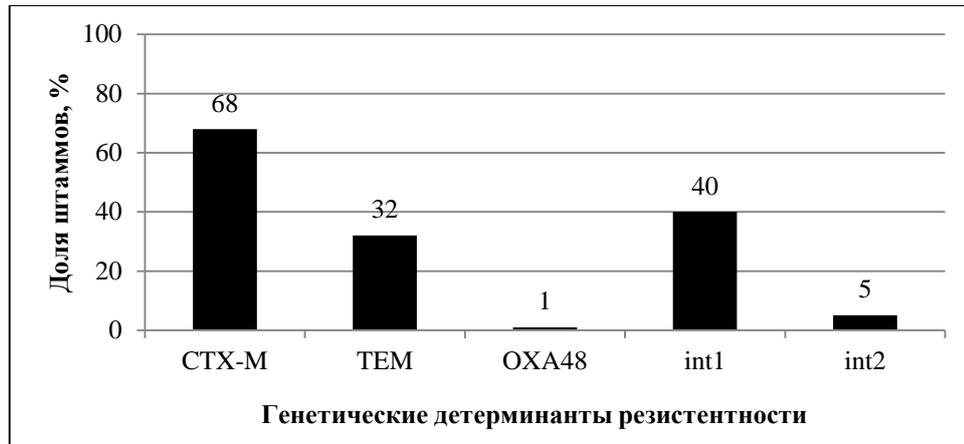
Примечание: AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – цiproфлоксацин, GEN – гентамицин, FOS – фосфомицин, NIT – нитрофурантоин, Trz – триклозан, Bch – бензалконий хлорид, Chg – хлоргексидин; R – устойчивость (резистентность) к АМП, S – чувствительность к АМП

Сравнение чувствительности к антибиотикам для планктонных культур и биопленок штаммов *E. coli* показало, что МПК ампициллина для биопленок в 4-128 раз выше, чем для планктонных клеток, для амоксициллин/клавулановой кислоты – в 2-128 раз выше, для цефотаксима – в 2-2048 раз выше, для фосфомицина – в 2-1024 раза выше, для нитрофурантоина – в 2-256 раз выше, для цiproфлоксацина – в 2-1024 раза выше, для гентамицина – в 2-512 раз выше, для хлоргексидина – в 2-16 раз выше, для триклозана – в 2-4 раз выше, для бензалкония хлорида – в 2-4 раз выше. При этом следует отметить, что для 18 % штаммов изученной коллекции МПК цiproфлоксацина для биопленок и планктонных клеток были равны.

## 6.2 Генетические детерминанты резистентности штаммов *E. coli*

Все штаммы *E. coli* изучаемой коллекции протестированы на наличие у них генов бета-лактамаз: *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> и *bla*<sub>NDM</sub>. Данные гены в разных комбинациях выявлены у 77 % штаммов, причем гены *bla*<sub>SHV</sub> и *bla*<sub>NDM</sub> не найдены (рисунок 6.5). Фенотипы резистентности штаммов *E. coli* к бета-лактамам антибиотикам коррелируют с наличием у них генов бета-лактамаз CTX-M-, TEM- и OXA-типов. Однако, у 16 % штаммов, устойчивых к данному классу антибиотиков, с

помощью используемого набора праймеров генов бета-лактамаз не обнаружено, что указывает на присутствие в их геномах бета-лактамаз других типов.



CTX-M – ген бета-лактамазы *bla*<sub>CTX-M</sub>, TEM – ген бета-лактамазы *bla*<sub>TEM</sub>, OXA48 – ген бета-лактамазы *bla*<sub>OXA-48</sub>, int1 – ген интегразы 1 класса *intI1*, int2 – ген интегразы 2 класса *intI2*  
 Рисунок 6.5 – Представленность генетические детерминанты резистентности в штаммах *E. coli* (n=303)

В геномах изучаемых штаммов *E. coli* также выявлены интегронные структуры, которые могут определять фенотипическую устойчивость к антимикробным препаратам других функциональных классов (аминогликозидам, сульфаниламидам, фениколам, четвертичным аммониевым соединениям и др.). Показано, что ген интегразы класса 1 выявлен в 40 % штаммов, ген интегразы класса 2 – в 5 % штаммов, одновременно гены интеграз классов 1 и 2 – в 2 % штаммов, у 57 % штаммов генов интеграз классов 1 и 2 не выявлено (рисунок 6.5).

Генетические детерминанты резистентности идентифицированы в штаммах *E. coli* нашей коллекции в разных комбинациях. Наиболее часто выявлялись гены бета-лактамаз совместно с интегронными структурами, по сравнению с частотой выявления интегронных структур в отсутствие генов бета-лактамаз (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Представленность сочетаний генетических детерминант резистентности в штаммах *E. coli* (n=303)

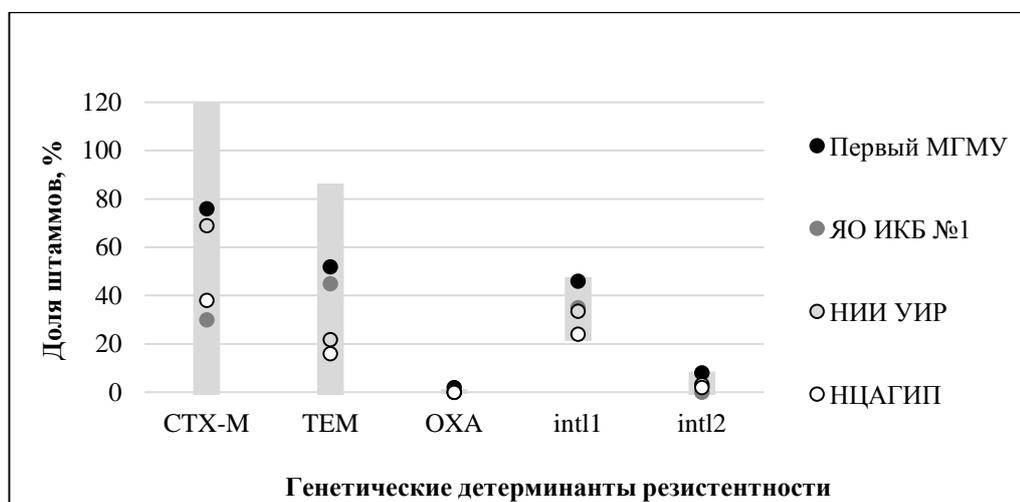
Количество интеграз	Доля штаммов, %			
	количество бета-лактамаз			
	0	1	2	3
0	18,5	27,1	11,2	0
1	4,3	26,4	10,6	0,3
2	0,3	0	1,3	0

Примечание: серым цветом выделены доминирующие значения

Полученные данные показывают широкую распространенность генетических детерминант резистентности, с доминированием детерминант устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

В базе данных GenBank депонированы 5 генов резистентности *intI1*, *bla<sub>СТХ-М</sub>*, *bla<sub>ТЕМ</sub>* (*E. coli* K447), *bla<sub>ТЕМ</sub>* (*E. coli* A6) и *bla<sub>ТЕМ</sub>* (*E. coli* K261), номера доступов OP589811, OP584996, OP584998, OP584997 и OP491309, соответственно.

**Анализ встречаемости генов резистентности к антибиотикам** среди штаммов *E. coli* выделенных от пациентов Сеченовского университета, Ярославской ИКБ №1, НИИ УИР им. Н.А. Лопаткина и НЦАГИП им. В.И. Кулакова проводили IQR методом (рисунок 6.6).



СТХ-М – ген бета-лактамазы *bla<sub>СТХ-М</sub>*, ТЕМ – ген бета-лактамазы *bla<sub>ТЕМ</sub>*, ОХА48 – ген бета-лактамазы *bla<sub>ОХА-48</sub>*, *int1* – ген интегразы 1 класса *intI1*, *int2* – ген интегразы 2 класса *intI2*;

Первый МГМУ – Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова; ЯО ИКБ №1 – Инфекционная клиническая больница №1 Ярославской области; НИИ УИР – Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина; НЦАГИП – Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова

Рисунок 6.6 – Встречаемость генетических детерминант резистентности к антибиотикам (точки), относительно диапазона межквартильного расстояния (прямоугольники) у изучаемых штаммов *E. coli* полученных от пациентов разных лечебных учреждений

Показано, что встречаемость генетических детерминант резистентности аналогична для всех анализируемых учреждений (рисунок 6.6).

**Фенотипы и генотипы резистентности к АМП штаммов отдельных генетических групп UPEC.** Анализ фенотипов и генотипов резистентности к антимикробным препаратам показал у штаммов *E. coli* нашей коллекции, отнесенных к группам O25-B2-ST131, O89-A-ST744 и A-CC10, высокую распространенность MDR-фенотипа, устойчивости к бета-лактамам и ципрофлоксацину, а также встречаемости

гена бета-лактамазы *bla*<sub>CTX-M</sub> и интегразы класса 1 с интегронной кассетой (таблица 6.3). Штаммы нашей коллекции, отнесенные к O2-B2-ST141 и O75-B2-CC14, обладают преимущественно R-фенотипом с резистентностью к ампициллину и цiproфлоксацину (таблица 6.3). Штаммы *E. coli* групп D-ST69 и O2/O6-B2-ST73 в нашей коллекции обладают преимущественно R-фенотипом с высоким уровнем резистентности к ампициллину и амоксициллин/клавуланату с высокой встречаемостью гена *bla*<sub>TEM</sub> и интегразы 1 класса с генной кассетой (таблица 6.3). Штаммы B1-ST58 в нашей коллекции обладали S-, R- или MDR-фенотипом, при этом большинство штаммов обладали резистентностью к бета-лактамам и несли гены бета-лактамаз CTX-M- или TEM-типа, а также ген интегразы класса 1 (таблица 6.3). Штаммы группы O4/O6-B2-ST127 в нашей коллекции обладали преимущественно S-фенотипом без генов резистентности (таблица 6.3).

Таблица 6.3 – Фенотипы и генотипы резистентности генетических групп UPEC штаммов, выделенных в 2005-2020 гг.

Генетическая группа	Спектр резистентности*	MDR/R/S	Генотип резистентности*
O25-B2-ST131 (n=89)	AMP, AMC, CTX, CIP	51/38/0	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>int11</i>
O75-B2-CC14 (n=3)	AMP, AMC, CTX, CIP	0/3/0	<i>bla</i> .
A-CC10 (n=3)	AMP, CTX, CIP, NIT	2/1/0	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>int11</i>
O2-B2-ST141 (n=11)	AMP	1/9/1	–
O4/O6-B2-ST127 (n=6)	–	0/2/4	–
B1-ST58 (n=5)	AMP, AMC, CTX	1/2/2	<i>bla</i> ., <i>int11</i>
O89-A-ST744 (n=7)	AMP, AMC, CTX, CIP	4/3/0	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>int11</i>
D-ST69 (n=5)	AMP, AMC	1/4/0	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>int11</i>
O2/O6-B2-ST73 (n=4)	AMP, AMC, CTX	0/4/0	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>int11</i>

Примечание: \* – указанный признак идентифицирован у более половины штаммов, «–» – указанный признак отсутствует; AMP – ампициллин, AMC – амоксициллин/клавулановая кислота, CTX – цефотаксим, CIP – цiproфлоксацин; MDR – множественно резистентный фенотип, R – резистентный фенотип, S – чувствительный фенотип;

### 6.3 Оценка антибактериального действия наноструктурированных пленок

#### TiCaPCON на штаммы *E. coli*

Анализ антибактериального действия наноструктурированных пленок TiCaPCON с имплантированными ионами Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup> проводили на двух штаммах UPEC: *E. coli* K261 и U20 (таблица 6.4).

Таблица 6.4 – Фенотипические свойства штаммов *E. coli* выбранной панели для тестирования наноструктурированных пленок TiCaPCON

Признак	Штаммы	
	<i>E. coli</i> K261	<i>E. coli</i> U20
Ферментация лактозы	+	+
Подвижность	+	–
Выделение газа при сбраживании глюкозы	–	+
Колициногенность	–	–
Продукция курли-волокон	+	+
Уровень резистентности	MDR	R

Примечание: MDR – полирезистентный штамм; R – резистентный штамм.

**Противодействие биоупленкообразованию.** Антибактериальное действие образцов наноструктурированных пленок TiCaPCON, нанесенные на кремневую подложку, с имплантированными ионами Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup>, тестировали на штаммах *E. coli* K261 и U20. Показано, что образцы Pt<sup>+</sup>+Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup><sub>an</sub>, (Pt<sup>+</sup>+Fe<sup>2+</sup>)<sub>an</sub> и Pt<sup>+</sup> блокировали формирование биоупленки штаммом *E. coli* U20 и ингибировали ее образование штаммом *E. coli* K261, а образцы Fe<sup>2+</sup>, Pt<sup>+</sup><sub>an</sub>+Fe<sup>2+</sup> и Pt<sup>+</sup><sub>an</sub> полностью блокировали формирование биоупленки для обоих штаммов (рисунок 6.7).

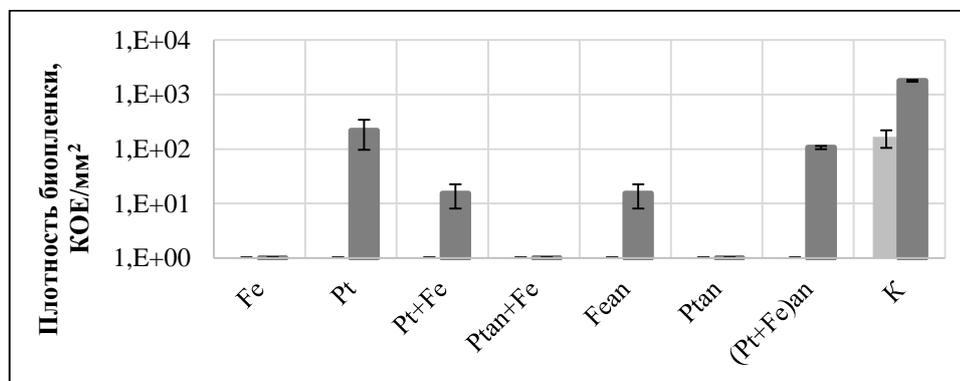
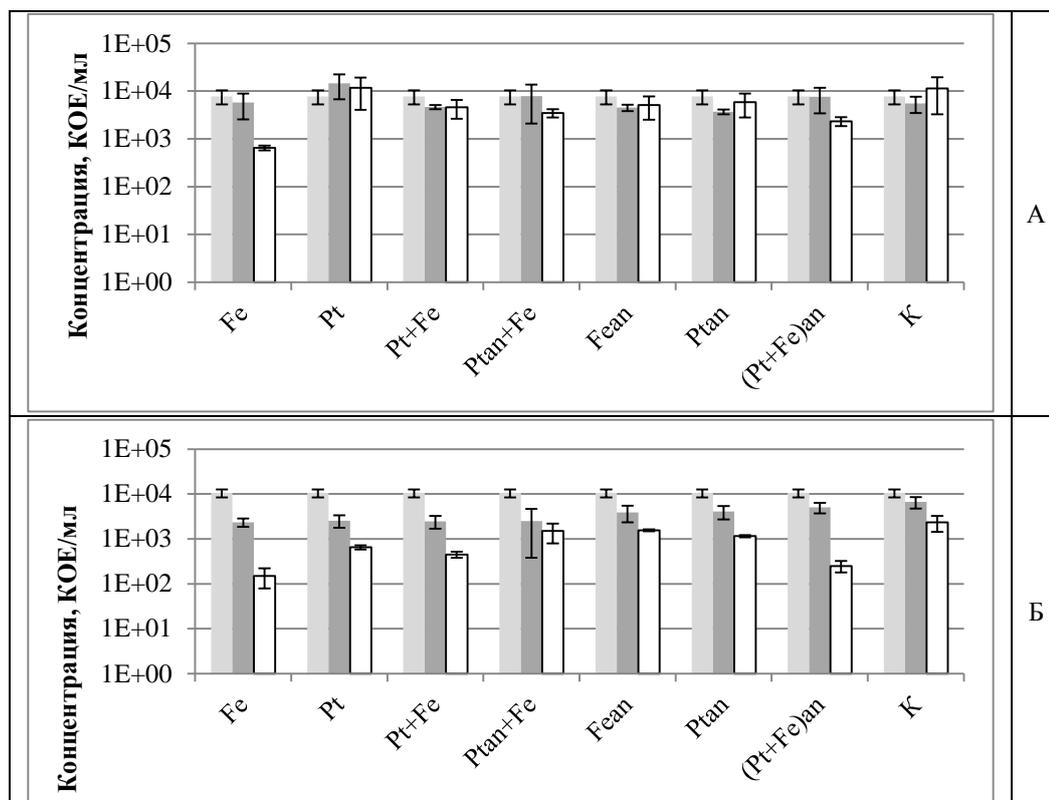


Рисунок 6.7 – Уровень плотности биоупленок штаммов *E. coli* K261 (темно-серый график) и U20 (светло-серый график), формируемых на кремниевых пластинах наноструктурированных пленками TiCaPCON с имплантированными ионами Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup>

При этом, концентрация планктонных клеток для обоих тест-штаммов за 8 ч инкубирования изменилась не более чем на 2 порядка (рисунок 6.8).



Светло-серый график – концентрация в момент посева; темно-серый график – концентрация через 3 ч; белый график – концентрация через 8 ч

Рисунок 6.8 – Динамика концентрации планктонных клеток штаммов *E. coli* K261 (А) и U20 (Б), при взаимодействии с образцами наноструктурированных пленками TiCaPCON

Анализ полученных данных свидетельствует, что ионы железа обладают большей антибиопленочной активностью чем ионы платины, в тоже время образование интерметаллических соединений, усиленная графитизация и сниженное образование окислов – повышает антибиопленочные эффекты.

#### 6.4 Заключение по главе 6

В результате проведенного исследования для 303 штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП в восьми лечебных учреждениях четырех регионов Российской Федерации в 2005-2020 гг., была проведена оценка чувствительности к АМП (антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам) и детекция генов резистентности. 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. Сравнение данных по устойчивости к антибиотикам штаммов *E. coli* в нашей работе и в других российских

исследованиях: NoDARS, ДАРМИС-2018 и RESOURCE, показало, что для всех антибиотиков нашего исследования доли устойчивых штаммов выше, чем в других исследованиях, предположительно это связано с более высокой долей осложненных ИМВП в нашем исследовании и целенаправленным отбором антибиотикорезистентных штаммов в рамках поискового клинического одноцентрового исследования по изучению генетических детерминант антибиотикорезистентности, проведенного в Первом Московском государственном медицинском университете им. И.М. Сеченова с 20 января 2005 г. по 22 ноября 2007 г. [30, 181, 200]. Следует отметить, что, хотя штаммы нашего исследования имели более высокий уровень устойчивости к антибиотикам, по сравнению с другими исследованиями, однако доля штаммов с MDR-фенотипом в нашем исследовании сопоставима с долей MDR-штаммов в российском исследовании NoDARS – 27 % [181], в тоже время в работах авторов из других стран доля MDR-штаммов UPEC составляла от 14 % до 96 % [100, 182].

В изучаемой коллекции 33 % штаммов характеризовались устойчивостью к триклозану, а 2 % – к бензалконию хлориду. Сравнение полученных данных по устойчивости к антисептикам/дезинфектантам штаммов *E. coli* нашей коллекции и штаммов UPEC в работе Henly et al. показало, что более высокий уровень устойчивости к хлоргексидину имеют 63 % штаммов нашего исследования, к триклозану – 98 %, а к бензалконию хлориду – 11 % штаммов нашего исследования [102]. При этом резистентностью к триклозану обладали 54 MDR-штамма *E. coli*, к бензалконию хлориду – 2 MDR-штамма, к триклозану и бензалконию хлориду – 1 MDR-штамм. Полученные данные свидетельствуют о высоком распространении среди *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП, резистентных штаммов, а также о встречаемости штаммов резистентных одновременно к антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам.

Большая часть чувствительных штаммов коллекции (>90 %) в виде биопленок обладали устойчивости к антибиотикам: ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму, гентамицину, фосфомицину и нитрофурантоину, более трети штаммов – к ципрофлоксацину. Полученные данные, по чувствительности биопленок штаммов *E. coli* к антибиотикам, в основном совпадают с литературными. Во многих исследованиях показана низкая степень проникновения бета-лактамов и аминогликозидов в биопленки [98, 203]. Данные по чувствительности биопленок к представителям фторхинолонов разнятся, в большинстве исследований показана

высокая степень проникновению фторхинолонов в биопленки [203], однако в исследованиях Nagos et al. показана 100 % устойчивость биопленок штаммов UPEC к одному из фторхинолонов – норфлоксацину [98]. Кроме того, согласно этому же исследованию, 100 % биопленок штаммов UPEC обладали чувствительностью к нитрофурантоину [98], а в нашей коллекции доля штаммов чувствительных в виде биопленок к нитрофурантоину составляла всего несколько процентов. Кроме того, биопленки всех исследованных штаммов показали устойчивость к триклозану, хлоргексидину и бензалконию хлориду. При этом МПК антимикробных препаратов при формировании биопленок возрастал в 2-2048 раз.

Штаммы коллекции обладали высоким уровнем (81 %) носительства генов резистентности. Самые распространенные комбинации (39 % штаммов) включали в себя гены бета-лактамаз и интегронные структуры. Выявленный нами уровень распространенности генов бета-лактамаз *bla*<sub>CTX-M</sub> типа в штаммах *E. coli* – 68 %, несколько выше, чем аналогичный показатель в опубликованных ранее работах зарубежных авторов – от 22 % до 56 %. Доля штаммов *E. coli*, несущих гены *bla*<sub>TEM</sub> типа, в нашей коллекции составила 32 %, в то время как в работах других авторов этот показатель составил от 15 % до 75 % [45, 78, 100, 175, 190]. Интересно, что ген карбапенемазы *bla*<sub>OXA-48</sub> в нашем исследовании выявлен у 1 % штаммов *E. coli*, а в исследованиях авторов из Ирана был отмечен более высокий уровень (42 %) встречаемости этого гена [263]. Гены интеграз классов 1 и 2 идентифицированы в нашем исследовании у 40 % и 5 % штаммов, что приблизительно соответствует уровню представленности данных генов (9-65 % и 1-7 %, соответственно) в штаммах UPEC, описанных в зарубежных работах [86, 182, 184].

Штаммы *E. coli* генетических групп A-CC10, O25-B2-ST131 и O89-A-ST744 нашей коллекции характеризовались высокой распространенностью MDR-фенотипа, а также носительством большого количества генов резистентности, что соответствует литературным данным полученным из разных регионов мира: Пакистана, Ирана, Испании, Англии, Китая, Мексики, США и многих других [45, 61, 87, 89, 94, 99, 106, 107, 154, 160, 180, 183, 194, 196, 204, 209]. Штаммы *E. coli* групп D-ST69 и O2/O6-B2-ST73 в нашей коллекции характеризовались преимущественно R-фенотипом с резистентностью к ампициллину и амоксициллин/клавуланату, с высокой встречаемости генов резистентности и интегронных структур, что соответствует работам американских

исследователей [160, 209]. При этом, высокая встречаемость в нашем исследовании у штаммов D-ST69 и O2/O6-B2-ST73 гена бета-лактамазы TEM-типа противоречит литературным данным [160, 209]. Штаммы *E. coli* генетических групп O2-B2-ST141 и O75-B2-CC14 нашей коллекции характеризовались преимущественно R-фенотипом с небольшим количеством детерминант резистентности. В литературе штаммы O2-B2-ST141 описаны преимущественно с S-фенотипом без генов резистентности [89, 142, 180]. Высокое распространение резистентности к представителю фторхинолонов – ципрофлоксацину, у штаммов *E. coli* O75-B2-CC14 нашего исследования подтверждает предположение об их принадлежности к «австралийской» подгруппе этой генетической группы [161, 180, 197]. Носительство бета-лактамаз CTX-M- или TEM-типов штаммами B1-ST58 нашей коллекции соответствует исследованиям других авторов из Испании, Австралии, Швейцарии и США [89, 167, 180, 205]. Штаммы *E. coli* группы O4/O6-B2-ST127 нашей коллекции характеризовались преимущественно S-фенотипом без генов резистентности, что противоречит работам авторов из Австралии, Испании, Англии и Ирана, согласно которым для штаммов этой группы показана высокая доля R- и MDR-фенотипов с различными генами резистентности [80, 89, 94, 106].

Произведенная оценка антибактериальной и антибиопленочной активности наноструктурированных пленок TiCaPCON с имплантированными ионами Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup> показала, что изучаемые материалы оказывали угнетающее действие на формирование биопленки штаммами уропатогенных *E. coli*, но практически не оказывали антимикробного действия на планктонные клетки. Материалы на основе наночастиц перспективное направление при противодействии резистентным и мультирезистентным уропатогенным *E. coli*, позволяющие снизить распространение планктонных и биопленочных форм UPEC.

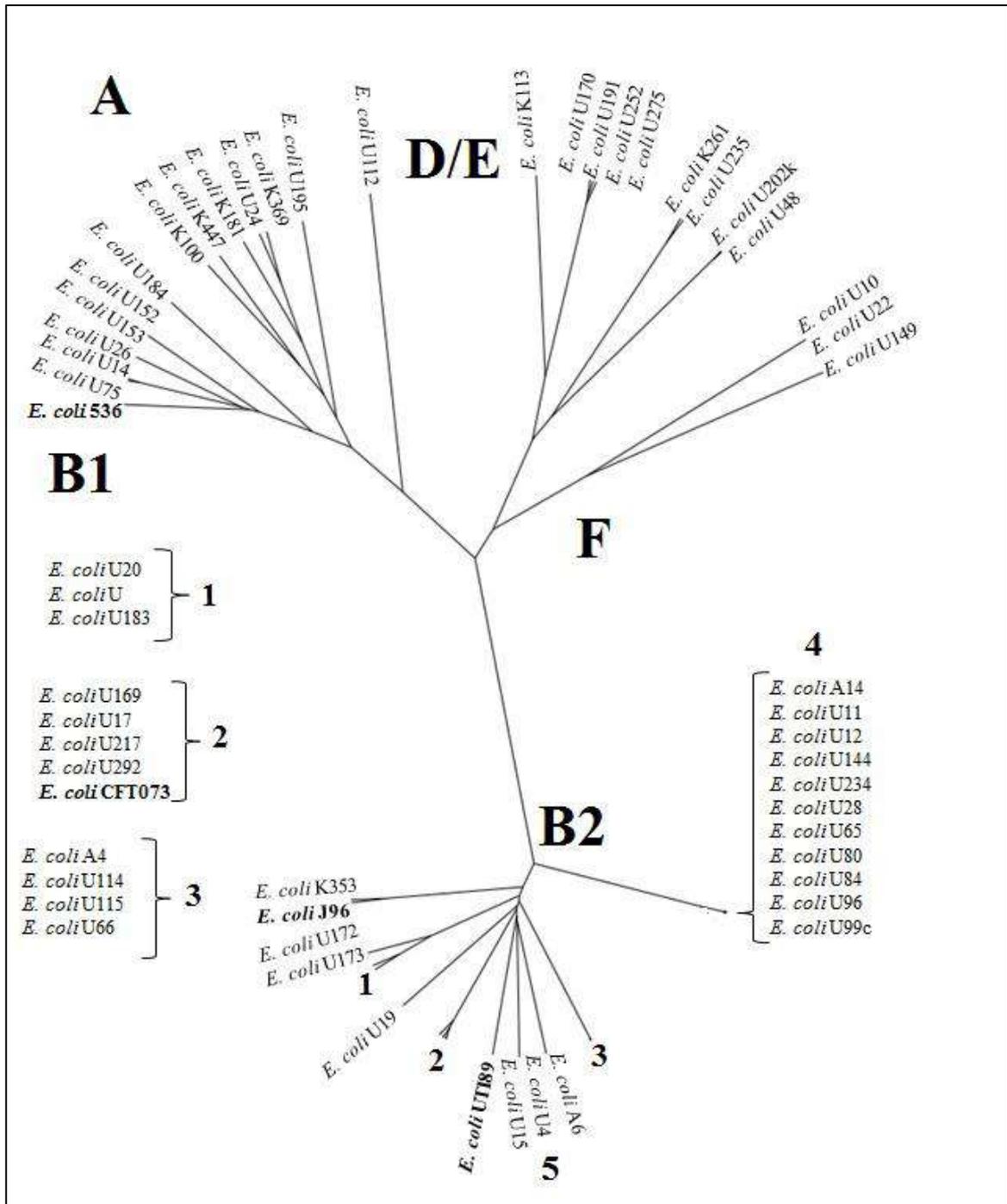
Выявление резистентности к антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам, а также носительства генов резистентности к антимикробным препаратам является важной информацией для клиницистов при разработке мер профилактики, лечения и сдерживания распространения инфекционных заболеваний.

## ГЛАВА 7. ПОЛНЫЕ ГЕНОМЫ ШТАММОВ *E. COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ИНФЕКЦИЕЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ

Из коллекции изучаемых штаммов *E. coli* (n=303) отобрано 54 штамма (18 %) для изучения полных нуклеотидных последовательностей. Отобраны штаммы, относящиеся к распространенным генетическим группам UPEC O25-B2-ST131 (n=11), O4/O6-B2-ST127 (n=4), O2/O6-B2-ST73 (n=4), O2-B2-ST141 (n=2), O75-B2-CC14 (n=2), B1-ST58 (n=2), D-ST69 (n=2), A-CC10 (n=2) и O89-A-ST744 (n=1), а также штаммы филогрупп А (n=4), В1 (n=3), В2 (n=6), D (n=8) и F (n=3) других генетических групп. Проанализированы последовательности полных геномов штаммов *E. coli* характеризовались ГЦ-составом от 50 до 52 %, размером генома от 4,26 до 5,50 млн п.н., количеством контигов от 112 до 1270, количеством генов от 4508 до 5616 (Приложение Ж).

С помощью алгоритма Ntree 1.2 на сайте Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>) для всех изучаемых полных геномов было построено филогенетическое дерево. Показано, что полные геномы штаммов филогенетической группы В2 образовали обособленный кластер с двумя субкластерами: в первый входили геномы штаммов группы O25-B2-ST131, во второй – все остальные геномы филогруппы В2, включая обособленный субкластер группы O2-B2-ST141 (рисунок 7.1). Следует отметить, что в кластер филогруппы В2 также входили полные геномы контрольных типовых UPEC штаммов *E. coli* J96 (ALIN00000000.2), UTI89 (NC\_007946.1) и CFT073 (NZ\_CP051263.1), выделенных в США в 1981, 2001 и 2016 гг., соответственно. Интересно, что полные геномы штаммов O75-B2-CC14 и O18-B2-ST14 (CC14) образовали единую ветвь на филогенетическом древе, при этом с помощью RAPD-типирования эти группы были четко дифференцированы. Единые ветви были образованы полными геномами штаммов групп O6-B2-ST73 и O2-B2-ST73 (рисунок 7.1, группа «2»), а также O4-B2-ST127 и O6-B2-ST127, (рисунок 7.1, группа «3»), что согласуется с результатами RAPD-типирования и предположением о близком родстве генетических групп *E. coli* O2/O6-B2-ST73 и O4/O6-B2-ST127. Полные геномы штаммов, относящихся к филогенетическим группам А, В1, D, Е и F, образовали отдельный кластер. При этом, хотя каждая филогруппа обособлена, геномы штаммов

*E. coli* U112 и U184, отнесенные к филогруппам D и A, расположены на дереве ближе к филогруппам A и B1, соответственно.



1 – группа O18-B2-ST14 и O75-B2-CC14; 2 – группа O2/O6-B2-ST73; 3 – группа O4/O6-B2-ST127; 4 – группа O25-B2-ST131; 5 – группа O2-B2-ST141

Жирным шрифтом выделены геномы штаммов сравнения *E. coli* 536 (NZ\_JAJART000000000.1), CFT073 (NZ\_CP051263.1), UTI89 (NC\_007946.1) и J96 (ALIN000000000.2)

Рисунок 7.1 – Филогенетическое дерево полных геномов штаммов *E. coli*, изученных в данном исследовании, построенное с помощью алгоритма NDtree 1.2 на сайте Center for Genomic Epidemiology (URL: <http://www.genomicepidemiology.org/>)

Полные геномы штаммов *E. coli* U26, K369 и *E. coli* U19 новых сиквенс-типов ST9239, ST12358 и ST10102 расположены на филогенетическом древе в кластерах филогрупп В1, А и В2, соответственно (рисунок 7.1).

Таким образом, на основании филогенетического анализа полных геномов изучаемых нами штаммов, выявлено совпадение результатов кластеризации с распределением по филогенетическим группам, полученным на основании анализа по Clermont. При этом показана обособленность штаммов группы O25-B2-ST131 и их близкое родство, относительно штаммов других генетических групп.

### 7.1 Полные геномы штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131

Поскольку стандартные уропатогенные референс-штаммы (*E. coli* J96, UTI89 и CFT073) не отнесены к группе O25-B2-ST131, поэтому анализ полных геномов штаммов *E. coli* (n=11) этой группы из изученной коллекции проводили относительно размещенных в базе данных GenBank полных геномов референс-штаммов *E. coli* (n=7), выделенных из мочи пациентов с ИМВП и также отнесенных к этой же генетической группе (таблица 7.1).

Таблица 7.1 – Штаммы *E. coli* группы O25-B2-ST131, выделенные от пациентов с ИМВП, из базы данных GenBank

Штамм	Страна	Год выделения	Номер доступа в GenBank
SA186	Саудовская Аравия	2012	NZ_CP022730.1
DAEZYU01	США	2013	DAEZYU000000000.1
ZRUEC11	Пакистан	2013	NZ_QICE000000000.1
DABVAN01	Швеция	2013	DABVAN000000000.1
UTI_PT7	Шри Ланка	2015	NZ_JAGKSI000000000.1
24EC	Колумбия	2017	NZ_JADPYZ000000000.1
52246	Чехия	2019	NZ_JAPJVB000000000.1

В полных геномах штаммов *E. coli* (n=11) группы O25-B2-ST131 идентифицированы профаги и группы несовместимости плазмид (Приложение Ж), а также гены вирулентности и резистентности.

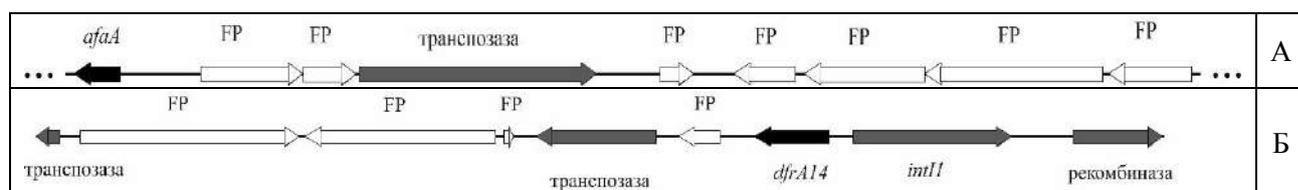
**Плазмиды.** В полных геномах изучаемой выборки штаммов *E. coli* (n=11) идентифицировано 35 плазмиды. В каждом штамме выявлено от 2 до 5 плазмид (Приложение Ж). Идентифицированы 21 высокомолекулярная плазида 4 групп несовместимости и 14 низкомолекулярных плазмид 4 семейств. Наиболее представлены были F-плазмиды IncFI-группы, которые были идентифицированы во всех исследуемых штаммах *E. coli* (n=11) группы O25-B2-ST131 (таблица 7.2).

Таблица 7.2 – Представленность плазмид, идентифицированных по группам несовместимости, в геномах изучаемых штаммов *E. coli*

Семейство	Группа	Размер, тыс. п.н.	Количество	Штаммы
<i>высокомолекулярные плазмиды</i>				
F	IncFI	99,1	11	A14, U11, U12, U234, U144, U28, U65, U80, U84, U96, U99c
	IncFII	92,3	8	A14, U12, U234, U28, U80, U84, U96, U99c
N	IncN	51,0	1	U11
I	IncII	120,8	1	U234
<i>низкомолекулярные плазмиды</i>				
Col (MG828)	-	1,9	7	U11, U12, U234, U144, U65, U80, U84
Col156	-	5,1	5	U11, U234, U28, U65, U99c
Col (BS512)	-	2,1	1	U12
ColpVC	-	2,0	1	U96

Примечание: «-» – группа отсутствует

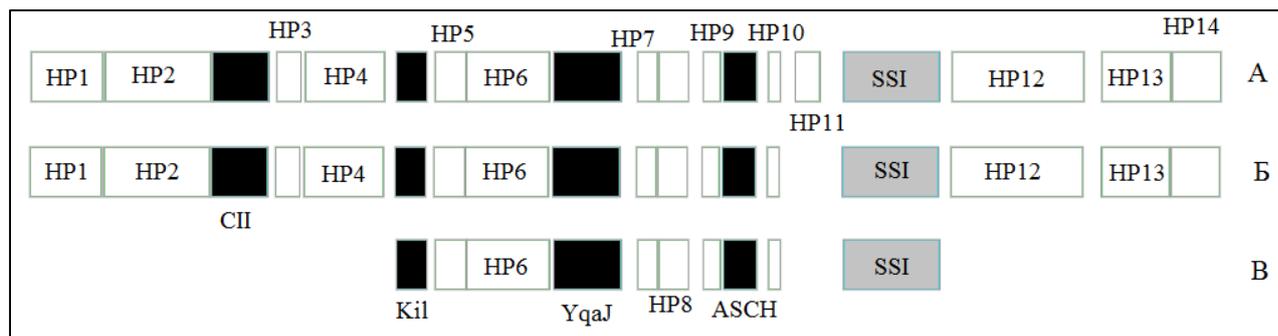
**Профаги.** В полных геномах изучаемых штаммов *E. coli* (n=11) выявлены участки, отнесенные веб-сайтом PHASTER (доступ <https://phaster.ca/>, дата обращения 20.02.2023) к профагам. В каждом геноме идентифицировано от 2 до 10 профагов длиной 3008-43482 п.н. (Приложение Ж). Подавляющее большинство профагов (n=67) содержали только гены фагов, кроме того профаги в геномах *E. coli* изучаемой коллекции несли IS-элементы и транспозоны (n=17), эффлюксные насосы (n=2), гены факторов вирулентности (n=6), а также гены резистентности или их наборы (n=3) (рисунок 7.2).



Черные фигуры – гены вирулентности или резистентности, серые фигуры – гены транспозиции, белые фигуры – другие гены; FP – фаговый белок (белки капсида или хвостовой части фага)  
 Рисунок 7.2 – Строение профага SH2026Stx1-1 (NC049919) в геноме штамма *E. coli* U80 (А) и профага RCS47 (NC042128) в штамме *E. coli* U11 (Б), полученные с помощью программы SnapGene Viewer

Сравнение нуклеотидных последовательностей профагов с размещенными в базе данных GenBank показало, что в штаммах *E. coli* группы O25-B2-ST131 изучаемой коллекции содержались профаги 34 фагов. Большинство профагов (n=19) выявлено только в одном штамме. Во всех штаммах *E. coli* группы O25-B2-ST131 изучаемой

коллекции были идентифицированы профаги Enterobacteria phage P88 (NC\_026014), профаг Escherichia phage SH2026Stx1 (NC\_0499198) и профаг Pectobacterium phage ZF40 (NC\_019522), при этом, эти же профаги чаще всего встречались и в референс-штаммах: в 5, 4 и 6 штаммах, соответственно. Анализ строения показал высокое сходство профагов Enterobacteria phage P88, Escherichia phage SH2026Stx1 и Pectobacterium phage ZF40 как в штаммах *E. coli* изучаемой коллекции, так и в референс-штаммах (рисунок 7.3).



Черные фигуры – установленные фаговые гены, серые фигуры – гены транспозиции, белые фигуры – другие гены; HP – гипотетический белок, CII – фаговый репрессор, Kil – ингибитор деления, YqaJ – фаговая нуклеаза, ASCH – регулятор трансляции, SSI – сайт-специфичная интеграза

Рисунок 7.3 – Строение профага SH2026Stx1-2 (NC049919) в геноме штамма *E. coli* U99c (А), в штаммах *E. coli* U11, U12, U234, U28, U80, U84, 24EC, UTI\_PT7 и ZRUEC11 (Б), в штамме *E. coli* U96 (В), полученные с помощью сайта PHASTER (<https://phaster.ca/>)

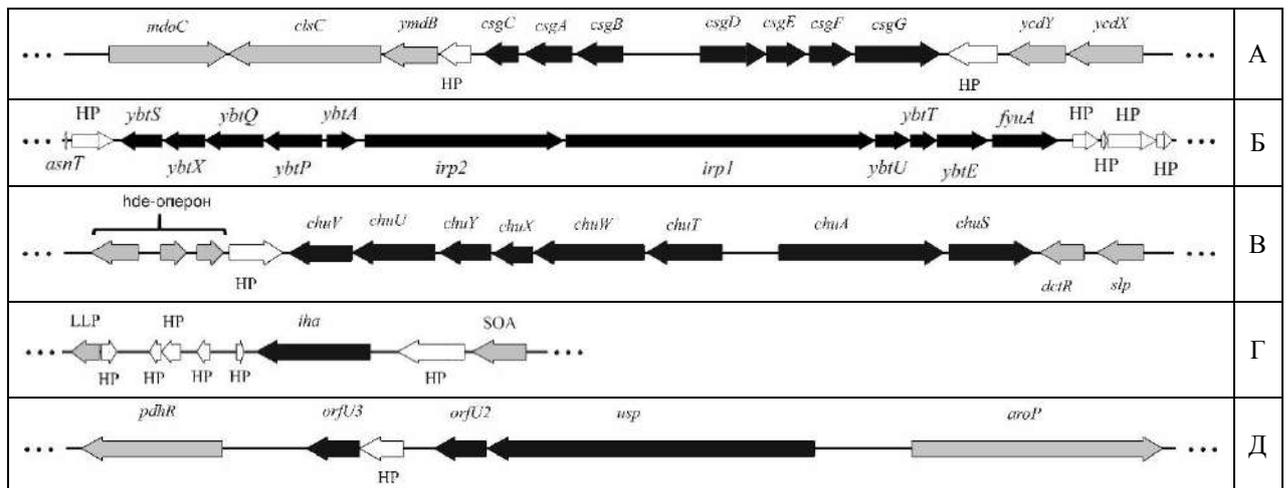
#### **Генетические детерминанты вирулентности UPEC в полных геномах *E. coli*.**

В полных геномах штаммов *E. coli* изучаемой коллекции (n=11) и референс-штаммов *E. coli* из базы данных GenBank (n=7) идентифицированы опероны и гены детерминант вирулентности. Показано, что во всех штаммах *E. coli* изучаемой коллекции и референс-штаммов присутствовали опероны синтеза фимбрии типа I, F9-фимбрии, Usp-токсина, энтеробактина, гемофора, иерсиниабактина и курли-волокон, а также гены адгезина *fdeC* (таблица 7.3). Показано, что во всех полных геномах штаммов *E. coli* изучаемой коллекции, отнесенных к группе O25-B2-ST131, и референс-штаммов, опероны синтеза курли-волокон (*csg*), гемофора (*chu*), Usp-токсина (*usp*) и иерсиниабактина (*ybt/irp/fyu*), а также гены адгезина *iha* имели одинаковые нуклеотидные последовательности и схожее расположение относительно других генов в геноме (рисунок 7.4). При этом, оперон синтеза иерсиниабактина *ybt/irp/fyu* идентифицирован в составе острова патогенности (PAI IV<sub>536</sub>), расположенного рядом с геном *asnT* (рисунок 7.4Б).

Таблица 7.3 – Представленность генетических детерминант вирулентности в полных геномах штаммов *E. coli* изучаемой коллекции (n=11) и референс-штаммах (n=7)

Штаммы	Гены и опероны вирулентности																	
	<i>fim</i>	<i>pap</i>	<i>F9</i>	<i>dra</i>	<i>fdeC</i>	<i>hly</i>	<i>cnf</i>	<i>sat</i>	<i>pic</i>	<i>ent/sep</i>	<i>usp</i>	<i>ybt/irp</i>	<i>iuc</i>	<i>chu</i>	<i>csg</i>	<i>traT</i>	<i>yfc</i>	<i>iha</i>
<i>штаммы E. coli, изучаемой коллекции</i>																		
A14	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–
U11	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
U12	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
U144	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–
U234	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U28	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U65	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U80	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U84	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U96	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
U99c	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
<i>референс-штаммы E. coli</i>																		
SA186	+	–	+	–	+	–	–	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	–
DAEZY01	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ZRUEC11	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DABVAN01	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UTI_PT7	+	–	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24EC	+	+	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
52246	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	+	–	+	+

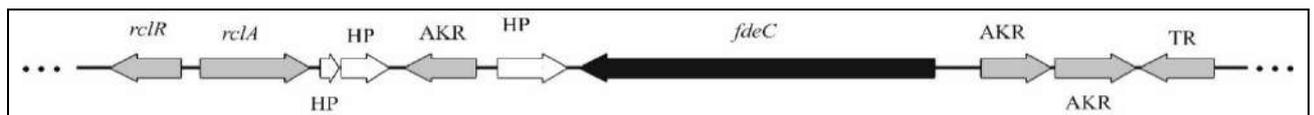
Примечание: серым цветом выделены детерминанты, выявленные во всех штаммах; «+» – детерминанта найдена; «–» – детерминанта отсутствует; опероны синтеза: *fim* – фимбрии I типа, *pap* – P-фимбрии, *F9* – F9-фимбрии, *dra* – Afa/Dra-фимбрии, *fdeC* – FdeC-адгезина, *hly* – гемолизина, *cnf* – Cnf-токсина, *sat* – Sat-токсина, *pic* – Pic-токсина, *ent/sep* – энтеробактина, *usp* – Usp-токсина, *ybt/irp* – иерсиниабактина, *iuc* – аэробактина, *chu* – гемофора, *csg* – курли-волокон, *traT* – липопротеина внешней мембраны, *yfc* – Yfc-фимбрии, *iha* – Iha-адгезина



Черные фигуры – гены вирулентности, серые фигуры – прочие гены; HP – гипотетический белок, *ymdB* – деацетилаза, *clsC* – кардиолипин синтаза, *mdoC* – глюкоза синтаза, *ycdY* – белок-шаперон, *ycdX* – фосфатаза, *hde*-оперон – оперон устойчивости к кислотам, *dctR* – регулятор, *slp* – липопротеин, LLP – L-лактат пермеаза, SOA – сиалат O-эстераза, *aroP* – транспортер ароматических аминокислот, *pdhR* – репрессор;

Рисунок 7.3 – Строение оперона синтеза курли-волокон *csg* (А), иерсиниабактина *ybt/irp/fyuA* (Б), гемофора *chu* (В), Iha-адгезина *iha* (Г) и Usp-токсина *usp/orfU* (Д) в геноме штамма *E. coli* U28, полученные с помощью программы SnapGene Viewer

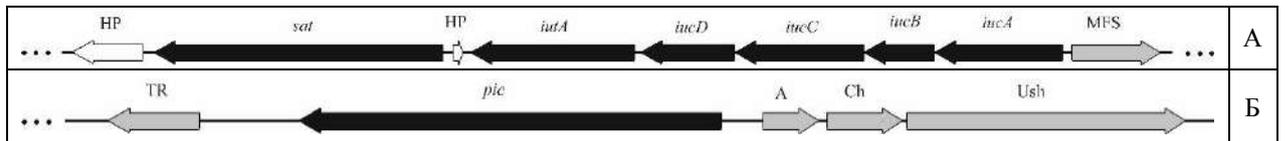
Показано, что в полных геномах всех штаммов *E. coli* изучаемой коллекции и всех референс-штаммов ген *fdeC* имел одинаковое расположение в геноме (рисунок 7.4). При этом, в нуклеотидной последовательности данного гена для всех *E. coli* изучаемой коллекции, отнесенных к группе O25-B2-ST131 и референс-штаммов *E. coli* ZRUEC11, UTI\_PT7, 24EC и 52246 в положении 2246 локализован тимин, что определяет аминокислотный остаток треонин в положении 749 белковой последовательности. Напротив, у референс-штаммов *E. coli* SA186, DAEZYY01 и DABVAN01 в положении 2246 локализован цитозин, что определяет аминокислотный остаток изолейцин в положении 749 белковой последовательности. Аминокислотный остаток 749 входит в состав β-складчатой структуры Ig-подобного домена, ответственного за адгезию к коллагенам. Предполагается, что замена Ile749Thr не приводит к нарушению β-складчатой структуры, но может изменять адгезивные способности белка.



Черные фигуры – гены вирулентности, серые фигуры – прочие гены; HP – гипотетический белок, *rclR* – регулятор, *rclA* – оксидоредуктаза, AKR – альдо/кето редуктаза, TR – транскрипционный регулятор;

Рисунок 7.4 – Строение участка генома штамма *E. coli* U28 с геном FdeC-адгезина, полученные с помощью программы SnapGene Viewer

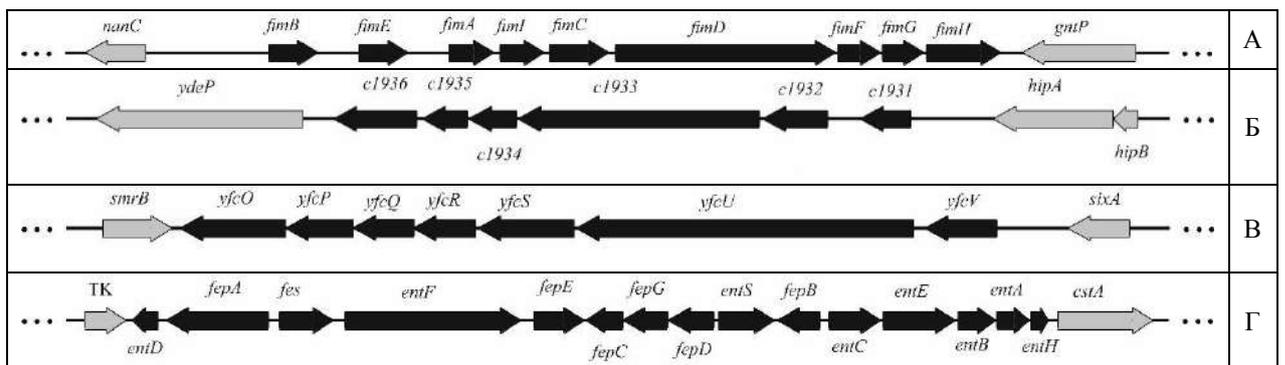
Опероны синтеза аэробактина *iuc* и сериновых протеаз *sat* и *pic* идентифицированы в большинстве полных геномов штаммов *E. coli* изучаемой коллекции, отнесенных к группе O25-B2-ST131 и в референс-штаммах. Показано, что во всех референс-штаммах и в штаммах изучаемой коллекции опероны *iuc* и гены *sat* и *pic* расположены в геномах идентично (рисунок 7.5). При этом, нуклеотидная последовательность гена *sat* одинакова для всех референс-штаммов и большинства *E. coli* изучаемой коллекции, за исключением штамма *E. coli* U234, в котором обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене Glu622Asp. В гене *iucD* штамма *E. coli* U65 выявлена делеция 601 нуклеотида, приводящая к появлению стоп-кодона вместо 211 аминокислотного остатка. Нуклеотидная последовательность гена *pic* для всех изучаемых *E. coli*, отнесенных к группе O25-B2-ST131, и референс-штаммов ZRUEC11, UTI\_PT7, 24EC и 52246, была также идентична.



Черные фигуры – гены вирулентности, серые фигуры – прочие гены; HP – гипотетический белок, MFS – эффлюксный насос, TR – транскрипционный регулятор, А – адгезин, Ch – шаперон, Ush – ашер;

Рисунок 7.5 – Строение оперона синтеза аэробактина *iut/iuc* и Sat-токсина (А) и Pic-токсина (Б), в геноме штамма *E. coli* U28, полученные с помощью программы SnapGene Viewer

Опероны синтеза фимбрий типа I, F9 и Yfc, а также энтеробактина выявлены во всех полных геномах *E. coli* изучаемой коллекции, отнесенных к группе O25-B2-ST131, и в референс-штаммах (рисунок 7.6).



Черные фигуры – гены вирулентности, серые фигуры – прочие гены; *nanC* – канал внешней мембраны, *gntP* – глюконат пермиаза, *ydeP* – оксидоредуктаза, *hipA* – Hip-токсин, *hipB* – Hip-антитоксин, *smrB* – эндонуклеаза, *sixA* – фосфогистидин фосфотаза, ТК – транскетолаза, *cstA* – пируват/протонный симпорт

Рисунок 7.6 – Строение оперона синтеза фимбрии I типа (А), F9-фимбрии (Б), Yfc-фимбрии (В) и энтеробактина (Г) в геноме штамма *E. coli* U28, полученные с помощью программы SnapGene Viewer

Показано, что расположение оперонов во всех штаммах было идентично (рисунок 7.6), при этом нуклеотидные последовательности генов большинства штаммов были аналогичны друг другу и таковым в референс-штаммах. Ген *fimA*, кодирующий основную субъединицу фимбрии, в штамме *E. coli* U84 содержал мутации, приводящие к аминокислотным заменам Asp85Gly и Thr106Pro, а в штамме *E. coli* U144 – мутацию в гене *fimD*, кодирующем белок-ашер, приводящую к замене Ile320Ser.

Проведенный анализ не выявил значительных различий между генетическими детерминантами вирулентности в штаммах группы O25-B2-ST131, выделенных в разных лечебных учреждениях в разные периоды. Следует отметить, что в большинстве генов вирулентности изученных штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131 отсутствовали мутации, не приводящие к нуклеотидным заменам, а также нуклеотидные замены в межгенных областях оперонов.

**Генетические детерминанты резистентности в полных геномах штаммов *E. coli*.** В полных геномах 11 штаммов *E. coli* изучаемой коллекции, отнесенных к группе O25-B2-ST131, идентифицированы генетические детерминанты резистентности к бета-лактамам (n=26), сульфаниламидам (n=16), аминогликозидам (n=13), четвертичным аммониевым соединениям (n=7), макролидам (n=7), тетрациклинам (n=7) и фениколам (n=6) (таблица 7.4).

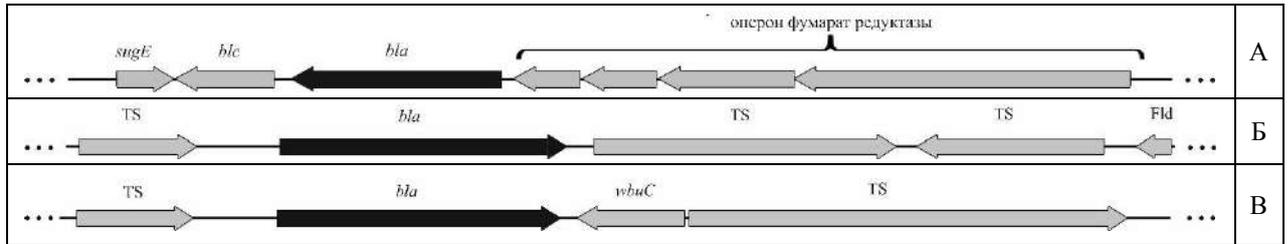
Таблица 7.4 – Представленность генетических детерминант резистентности к классам antimicrobных препаратов в полных геномах штаммов *E. coli* (n=11)

Ген резистентности	Количество штаммов, шт.	Ген резистентности	Количество штаммов, шт.	Ген резистентности	Количество штаммов, шт.
<i>бета-лактамы</i>		<i>аминогликозиды</i>		<i>сульфаниламиды</i>	
<i>bla<sub>ampC</sub></i>	11	<i>aph(3'')-Ib</i>	1	<i>sul2</i>	1
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	7	<i>aph(6)-Id</i>	1	<i>sul1</i>	7
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	5	<i>aac(3)-IIa</i>	3	<i>dfrA17</i>	7
<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i>	1	<i>aac(6')-Ib3</i>	1	<i>dfrA14</i>	1
<i>bla<sub>CTX-M-27</sub></i>	2	<i>aadA5</i>	7	<i>фениколы</i>	
<i>тетрациклины</i>		<i>интегроны</i>		<i>catB3</i>	5
<i>tet</i> -оперон	7	<i>intI1</i>	8	<i>cmlA1</i>	1
<i>макролиды</i>		<i>четвертичные аммониевые соединения</i>		<i>аминогликозиды и фторхинолоны</i>	
<i>mphA</i>	7	<i>qacE</i>	7	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	7

Кроме того, в 7 штаммах детектированы гены, обуславливающих резистентность одновременно к аминогликозидам и фторхинолонам. Гены резистентности к этим же группам antimicrobных препаратов выявлены и в полных геномах референс-штаммов,

при этом в штаммах *E. coli* SA186 и *E. coli* DAEZYY01 выявлены только гены бета-лактамазы ampC-типа.

Во всех полных геномах выборки изучаемых штаммов *E. coli* (n=11) и референс-штаммов (n=7) детектированы гены бета-лактамазы *bla*<sub>ampC</sub>, которые имеют классическое расположение в геноме между геном липокалина и опероном фумарат-редуктазы (рисунок 7.7А).



Черные фигуры – гены резистентности, серые фигуры – прочие гены; *sugE* – эффлюкс насос, *blc* – липокалин, *wbuC* – купин, TS – транспозаза, Fld – флаводоксин  
Рисунок 7.7 – Строение участка генома штамма *E. coli* U28 с геном *bla*<sub>ampC</sub> (А) и *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (Б), штамма *E. coli* U12 с геном *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (В), полученные с помощью программы SnapGene Viewer

Анализ генов *bla*<sub>ampC</sub> показал, что во всех изучаемых и референс-штаммах эти гены имеют идентичную нуклеотидную последовательность и отнесены к ЕС-типу. Среди других бета-лактамаз встречались отнесенные к типу CTX-M (n=10) и OXA (n=5), бета-лактамазы других типов в штаммах группы O25-B2-ST131 не выявлены, при том, что в референс-штаммах идентифицированы гены *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> и *bla*<sub>KPC-3</sub>. Показано, что гены *bla*<sub>CTX-M-15</sub> в штаммах изученной коллекции и в референс-штаммах расположены в идентичных участках генома и имеют одинаковую нуклеотидную последовательность (рисунок 7.7Б). При этом, другие бета-лактамаз CTX-M-типа имеют отличающееся от *bla*<sub>CTX-M-15</sub> расположение в геноме штаммов изученной коллекции, а в референс штаммах не встречаются вовсе.

Гены и опероны генов резистентности в геномах *E. coli* могут располагаться как по одиночке, так и входить в состав группы – интегронов или кластеров резистентности [112, 152, 169]. Интегроны способны к сайт-специфичной рекомбинации и перемещению между клетками при помощи плазмид или фагов.

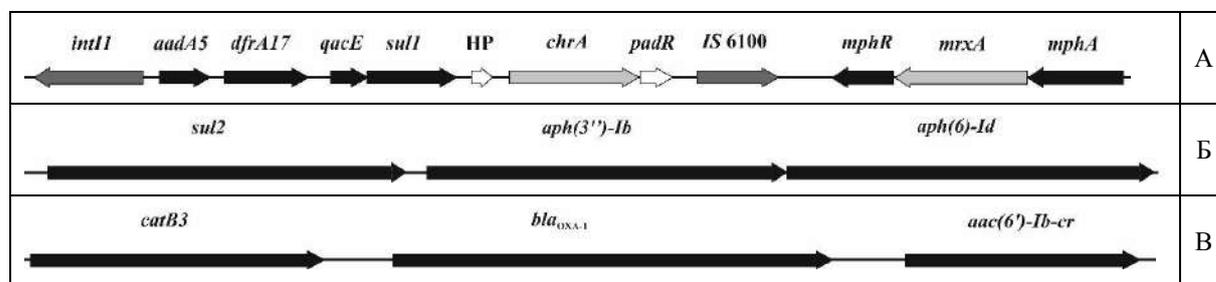
В полных геномах всей выборки штаммов *E. coli* (n=11) и референс-штаммов, с помощью инструментария web-сервиса BLAST, детектировали гены интеграз 1, 2 и 3 класса. Показано, что интегразы класса 2 и 3 не обнаружены ни в изучаемых, ни в

референс-штаммах, а интегразы класса 1 выявлены в восьми штаммах изученной коллекции и в трех референс-штаммах (таблицы 7.4 и 7.5).

Таблица 7.5 – Представленность совокупностей генетических детерминант резистентности в полных геномах штаммов *E. coli* изученной коллекции (n=11) и в референс-штаммах (n=7)

Кластеры генов резистентности	Количество штаммов	
	изученная коллекция	референс
<i>intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA</i>	7	2
<i>intI1~aadB~aadA1~cmlA1</i>	0	1
<i>intI1~dfrA14</i>	1	1
<i>sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id</i>	1	1
<i>sul2~aph(3'')-Ib~bla<sub>TEM-1B</sub></i>	0	1
<i>aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXA-1</sub>~catB3</i>	5	3
<i>bla<sub>OXA-1</sub>~catB3~ARR-3~qacE~sul1</i>	0	1
<i>aph(3'')-Ib~aph(6)-Id~orf513</i>	0	1

Из 8 штаммов с интегразой 1 класса 7 штаммов несли генную кассету, включавшую гены резистентности к аминогликозидам (*aadA5*) и сульфаниламидам (*dfrA17*), а также ген устойчивости к ЧАС – *qacE* и ген устойчивости к сульфаниламидам – *sul1* (таблица 7.5). Показано, что эта генная кассета у всех семи штаммов *E. coli* входит в кластер, состоящую из интегразы класса 1 (*intI1*), генной кассеты (*aadA5~dfrA17~qacE~sul1*), гипотетического белка (HP), гена субъединицы С белка транспортеров ионов, обеспечивающего устойчивость к тяжелым металлам (*chrA*), транскрипционного регулятора, участвующего в стрессовом ответе (*padR*), IS6-подобной транспозазы (*IS6100*) и кластера генов резистентности к макролидам (*mphR~mrxA~mphA*) (рисунок 7.8А). Подобный кластер имеется в двух референс-штаммах *E. coli*: ZRUEC11 и UTI\_PT7.



Черные фигуры – гены резистентности, светло-серые фигуры – гены эффлюксных насосов, темно-серые – гены транспозиции, белые фигуры – другие гены; HP – гипотетический белок; расшифровка обозначений дана в тексте

Рисунок 7.8 – Строение генетического кластера резистентности в геномах штаммов *E. coli* U28 (А), *E. coli* U99с (Б) и *E. coli* U12 (В), полученные с помощью программы SnapGene Viewer

В штамме *E. coli* U11 интегронная кассета с интегразой 1 класса включала только ген резистентности к сульфаниламидам *dfrA14*, причем располагался этот интегрон на профаге RCS47 (NC042128) (таблица 7.5, рисунок 7.2Б). В полном геноме *E. coli* U99с описана последовательность генов резистентности к сульфаниламидам и аминогликозидам *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id* (таблица 7.5, рисунок 7.8Б). Аналогичный кластер генов резистентности выявлен в референс-штамме *E. coli* 52246.

В полных геномах 5 штаммов *E. coli* описана последовательность генов резистентности к аминогликозидам, бета-лактамам и хлорамфениколу *aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXA-1</sub>~catB3*, предположительно не ассоциированная с интегразой или иным мобильным генетическим элементом (таблица 7.5, рисунок 7.8В). Аналогичный кластер генов резистентности выявлен в 3 референс-штаммах. Кроме того, в референс-штаммах идентифицированы другие кластеры генов резистентности, которые отсутствуют в штаммах изученной коллекции (таблица 7.5). Интересно отметить, что в 4 штаммах *E. coli* изученной коллекции в детектировано по два кластера генов резистентности: в 3 штаммах *intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA* и *aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXA-1</sub>~catB3*, а в 1 штамме *intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA* и *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id*.

Устойчивость к антимикробным препаратам может быть обусловлена наличием мутации в определенном гене, присутствующем во всех штаммах. Анализ полных геномов с помощью инструментария ResFinder 4.1 на сайте Центра геномной эпидемиологии (<http://www.genomicerpidemiology.org/>) показал, что в штаммах *E. coli* U11, U12, U28, U80, U84, U96, U99с, U144, A14 и U234, а также в референс-штаммах *E. coli* ZRUEC11, UTI\_PT7, 24EC и 52246 имеются мутации, приводящие к аминокислотным заменам и устойчивости к фторхинолонам: *gyrA* –Ser83Leu и Asp87Asn, в гене *parC* – Ser80Ile и Glu84Val, в гене *parE* – Ile529Leu. В штамме *E. coli* U65 имеются только три мутации, приводящие к устойчивости к фторхинолонам: в гене *parC* – Ser80Ile и Glu84Val, а также в гене *parE* – Ile529Leu. При этом в референс-штаммах *E. coli* SA186, DAEZYY01 и DABVAN01 имеются другие наборы мутаций, приводящие к устойчивости к фторхинолонам.

Анализ полученных данных свидетельствует, что референс-штаммы, выделенные в 2012-2013 гг. (*E. coli* SA186, DABVAN01 и DAEZYU01) несли значительно меньше генетических детерминант резистентности, чем штаммы, выделенные в 2015-2017 гг.

**Сравнение генома уропатогенного штамма *E. coli* U28 с геномами референс-штаммов.** Комплексный анализ генома был произведен методом наложения полного генома штамма *E. coli* U28 на референс-штамм *E. coli* SA186, принадлежащий к генетической группе O25-B2-ST131, и штамм *E. coli* UTI89 (генетическая группа O18-B2-ST95) с помощью программы BRIG v.0.95 (рисунок 7.9).

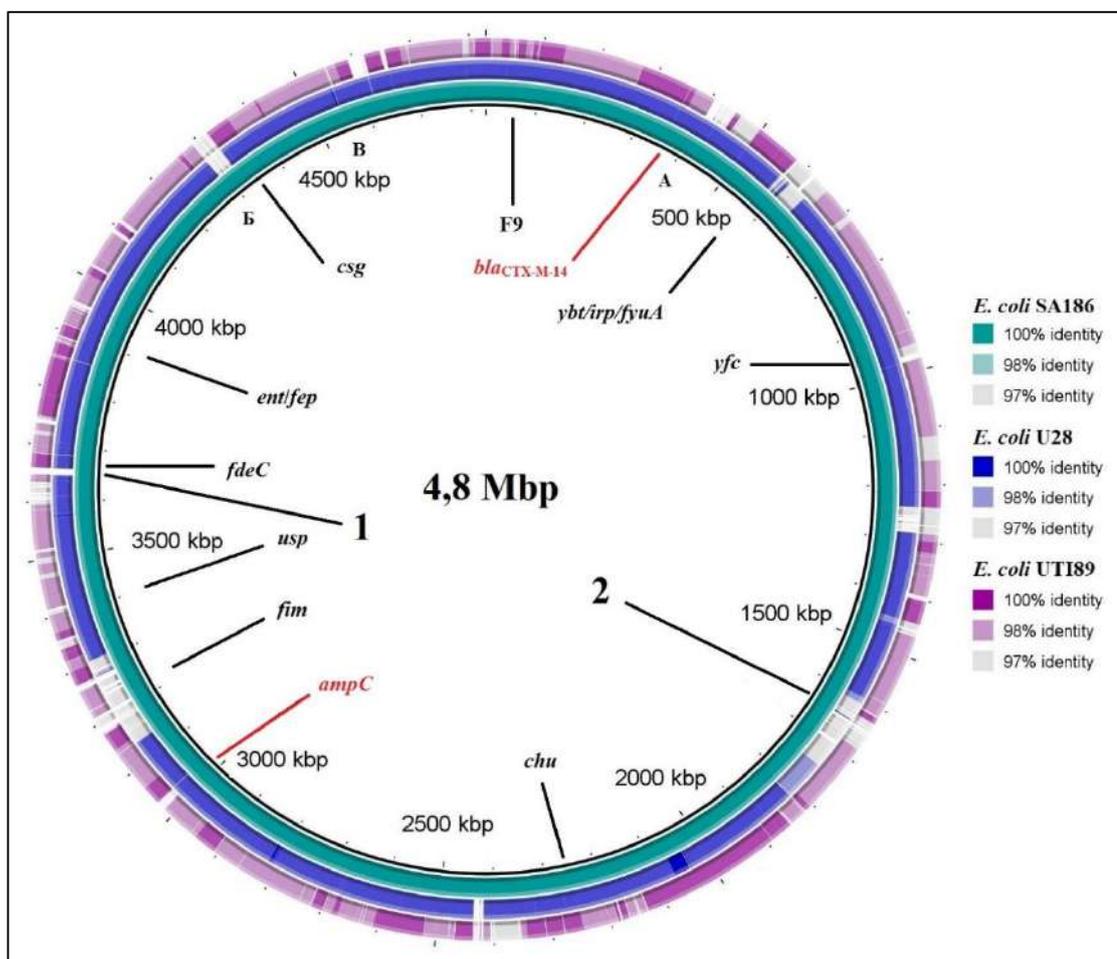


Рисунок 7.9 – Сравнение полногеномных последовательностей штаммов *E. coli* U28, *E. coli* SA186 (NZ\_CP022730.1) и *E. coli* UTI89 (CP062228.1), построенное с помощью программы BRIG v.0.95 (расшифровка обозначения в тексте)

Штамм *E. coli* U28 выделен от пациента с ИМВП без установленной локализации в ИКБ №1 г. Ярославля в 2017 г. Бактерии этого штамма обладали подвижностью, ферментировали лактозу, сбраживали глюкозу с выделением газа, продуцировали курли-волокна, не образовывали слизи, не продуцировали гемолизин и колицины, то есть соответствовали фенотипическим признакам типичного эпидемически значимого уропатогенного штамма группы O25-B2-ST131.

Установлено расположение профагов, характерных для большинства *E. coli* O25-B2-ST131 изученной коллекции. На рисунке 7.9 место расположения профага *Pectobacterium* phage ZF40 в штаммах *E. coli* U28 и *E. coli* SA18 обозначено «А». Регионы, где в геноме *E. coli* U28 расположены профаги *Enterobacteria* phage P88 и *Escherichia* phage SH2026Stx1 обозначены «Б» и «В», соответственно. Показано, что что идентичность геномов на участках «Б» и «В» <97 %.

Установлено расположение генетических детерминант вирулентности и резистентности, характерных для большинства *E. coli* O25-B2-ST131 изученной коллекции. На рисунке 7.9 указаны опероны и гены вирулентности, идентифицированные как в штамме *E. coli* U28, так и в обеих референс-штамме *E. coli* SA18 и *E. coli* UTI89: фимбрии типа 9 (*F9*), иерсиниабактин (*ybt/irp/fyuA*), гемофор (*chu*), фимбрии типа I (*fim*), *Usp*-токсин (*usp*), нефибрильный адгезин *FdeC* (*fdeC*), энтеробактина (*ent/fep*), курли-волокна (*csg*) и *Yfc*-фимбрии (*yfc*). При этом, отмечен участок генома штамма *E. coli* U28, где находится оперон синтеза аэробактина (*iuc/iut*) и *Sat*-токсина (*sat*) – «1», а также участок генома где расположен ген нефибрильного адгезина *Iha* (*iha*) – «2». Оба участка отсутствуют в геномах как *E. coli* SA18, так и *E. coli* UTI89. На рисунке 7.9 указан регион расположения гена бета-лактамазы *ampC*-типа, выявленный в штаммах *E. coli* U28, *E. coli* SA18 и *E. coli* UTI89. Кроме того, установлено расположение в штамме *E. coli* U28 гена бета-лактамазы *bla*<sub>STX-M-14</sub>, который отсутствует в штаммах *E. coli* SA18 и *E. coli* UTI89. Сравнительный анализ показал, что геном штамма *E. coli* U28 имеет высокую степень гомологии с геномом штамма *E. coli* SA18 и значительно отличается от генома штамма *E. coli* UTI89.

## 7.2 Заключение по главе 7

Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей 54 штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России в 2005-2020 гг., выявил совпадение кластеризации полных геномов с филогенетическими группами. При этом показана генетическая идентичность геномов штаммов групп O6-B2-ST73 и O2-B2-ST73, а также O4-B2-ST127 и O6-B2-ST127, что согласуется с результатами RAPD-типирования и предположением о единстве групп *E. coli* O2/O6-B2-ST73 и O4/O6-B2-ST127, соответственно.

Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей 11 штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131, выявил в них группы несовместимости плазмид, а также

вариативные участки, содержащие профаги. Идентифицировано 43 плазмиды, среди которых наиболее распространены большие F-плазмиды I и II групп (n=27), а также малые плазмиды Col(MG828) (n=7) и Col156 (n=5). Высокая встречаемость у штаммов *E. coli* нашей коллекции плазмид групп несовместимости IncF и Col156 согласуется с данными по штаммам UPEC, опубликованными в работах исследователей из Германии, Италии и Испании [66, 67, 83]. Во всех полногеномных последовательностях штаммов *E. coli* идентифицированы профаги (n=34), 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.

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.

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, которая предположительно, не приводит к нарушению функционирования токсина, поскольку первоначальные и замененные аминокислоты принадлежат к одному и тому же классу. В гене *fimA* штамма *E. coli* U84 выявлено две аминокислотные замены: Asp85Gly и Thr106Pro. Замена Asp85Gly приводит к изменению упаковки во внутренней части белковой молекулы и, предположительно, не влияет на функционирования белка [199]. Аминокислотный остаток 106 находится в вариабельной части белковой молекулы и замена Thr106Pro также, предположительно, не влияет на функционирования белка [270]. Штамм *E. coli* U144 имеет нуклеотидную замену Ile320Ser в гене *fimD*. Поскольку

аминокислотный остаток 320 находится в составе  $\beta$ -структуры пробки (plug) ашера и не входит в центры ее стабилизации, поэтому предположительно, замена Pe320Ser не влияет на функционирование белка [250, 193]. В гене *iucD*, оперона синтеза сидерофора аэробактерина в штамме *E. coli* U65, выявлена делеция 601 нуклеотида, ведущая к формированию стоп-кодона. Отсутствие фермента IucD приводит к невозможности синтеза аэробактерина. Считаем, что это единственная мутация, приводящая к нарушению функционирования фактора вирулентности. При этом, поскольку в штамме *E. coli* U65 имеются другие сидерофоры (энтеробактин и иерсиниабактин) выявленная мутация не оказывает значительного влияния на патогенез.

Исследование проведенное на выборке штаммов (n=11) показало высокую распространенность генов резистентности к бета-лактамам, более половины штаммов несли гены устойчивости к тетрациклинам, сульфаниламидам и четвертичным аммониевым соединениям, а также макролидам, не применяемым в урологии. Из генов бета лактамаз выявлены только идентичные для всех штаммов *bla<sub>ampC</sub>*, а также *bla<sub>CTX-M</sub>* и *bla<sub>OXA-1</sub>*. 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 генетические кластеры резистентности, включающие несколько генов резистентности к разным антимикробным препаратам. Генетический кластер *int11~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA* выявлен 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. этот кластер генов резистентности не найден. Аналогичный генетический кластер выявлен авторами из Бразилии и Китая у разных представителей *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*) в том числе ExPEC, EPEC и UPEC [88, 145]. Входящая в состав этого кластера интегронная кассета *aadA5~dfrA17~qacE~sul1* считается «классической» и самой распространенной в мире генной кассетой интегрона класса 1, встречающейся у *E. coli* разных патогрупп [112, 191].

Выявленный в геномах половины штаммов изучаемой выборки штаммов *E. coli* генетический кластер *aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXA-1</sub>~catB3* описана в исследовании Li et al., которые обнаружили аналогичную последовательность на плазмиде у *Salmonella enterica*

[144]. Однако в упоминаемой работе в структуру этого кластера входит интеграз класса 1 с «классической» генной кассетой, а в штаммах нашей коллекции этот кластер генов резистентности располагается независимо от генов рекомбинации [144].

В литературе не найдено описание генетического кластера резистентности *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id*, однако в базе данных GenBank выявлены последовательности с аналогичным кластером (CP081531.1, CP082121.1, CP038391.1).

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. Выявленные отличия заключались преимущественно в наличии специфичных профаговых кластерах в обоих штаммах, а также в наличии у *E. coli* U28 оперона синтеза сидерофора аэробактина, генов Sat-токсина и нефибрильного адгезина Iha. Кроме того, штамм *E. coli* U28 несет гены резистентности, отсутствующие у *E. coli* SA186, в том числе ген бета лактамазы *bla*<sub>CTX-M-14</sub>.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования было изучено 303 штамма *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП в восьми лечебных учреждениях четырех регионов Российской Федерации в 2005-2020 гг.

Штаммы коллекции характеризовались значительным разнообразием биохимических и культурально-морфологических свойств, при этом 42 % штаммов обладают подвижностью, ферментируют лактозу и выделяют газ при ферментации глюкозы. Подавляющее большинство штаммов (99%) формируют колонии S-формы, для трех штаммов отмечен фенотип с повышенной мукоидностью. Для 32 % штаммов отмечена продукция колицинов, а для 27 % – гемолитическая активность. В изученной коллекции *E. coli* 79 % штаммов обладали способностью формировать биопленку, для 73 % идентифицирована продукция курли-волокон – основного компонента матрикса биопленок.

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. При этом 54 MDR-штамма *E. coli* обладали резистентностью к триклозану, 2 MDR-штамма – к бензалконию хлориду, 1 MDR-штамм – к триклозану и бензалконию хлориду. Полученные данные свидетельствуют о высоком распространении среди *E. coli*, выделенных от пациентов с ИМВП, резистентных штаммов, а также о встречаемости штаммов резистентных одновременно к антибиотикам и антисептикам/дезинфектантам. Большая часть чувствительных штаммов коллекции (>90 %) в виде биопленок обладали устойчивости к антибиотикам: ампициллину, амоксициллин/клавулановой кислоте, цефотаксиму, гентамицину, фосфомицину, нитрофурантоину, триклозану, хлоргексидину и бензалконию хлориду. При этом МПК антимикробных препаратов при формировании биопленок возрастал в 2-2048 раз.

На двух штаммах *E. coli* была произведена оценка антибактериальной и антибиопленочной активности наноструктурированных пленок TiCaPCON с имплантированными ионами Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup>. Показано, что образцы наноструктурированных пленок TiCaPCON, нанесенные на кремневую подложку, с имплантированными ионами

Pt<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup> оказывали угнетающие действие на формирование биопленки штаммами уропатогенных *E. coli*, но практически не оказывали антимикробного действия на планктонные клетки. Материалы на основе наночастиц перспективное направление при противодействии резистентным и мультирезистентным уропатогенным *E. coli*, позволяющие снизить распространение планктонных и биопленочных форм UPEC.

В результате проведенного исследования в 303 штаммах *E. coli* были детектированы гены резистентности и вирулентности. Показана высокая гетерогенность штаммов *E. coli* по генам вирулентности. Показана высокая гетерогенность штаммов *E. coli* по наличию у них генов вирулентности. Гены *fimH*, *fyuA*, *chuA*, *iutA*, *yfcV*, *traT*, *ompT*, *kpsMTII* и *usp* детектированы у большей части штаммов коллекции. Штаммы коллекции обладали высоким уровнем (81 %) носительства генов резистентности. Самые распространенные комбинации (39 %) включали в себя гены бета-лактамаз и интегронные структуры.

В ходе исследования показана высокая внутривидовая гетерогенность штаммов *E. coli*, идентифицировано 23 O-группы, 31 сиквенс-тип и 26 генетических групп, для 294 штаммов идентифицирована филогенетическая группа. Показано, что 57 % штаммов нашей коллекции обладали типичными для UPEC серогруппами (O25, O2, O8, O15, O6, O75, O9, O18, O11, O4, O102 и O22). Серогруппа O25 являлась доминирующей O-группой (37 %) в нашей коллекции. Впервые для штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России идентифицированы сиквенс-типы 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. Идентифицировано 3 новых сиквенс-типа: ST9239 (CC446), ST12358 (CC10102) и ST10102 (новый CC10102). Впервые у штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России идентифицированы генетические группы 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.

Показана генетическая идентичность геномов штаммов групп O6-B2-ST73 и O2-B2-ST73, а также O4-B2-ST127 и O6-B2-ST127, что свидетельствует об их единстве как групп *E. coli* O2/O6-B2-ST73 и O4/O6-B2-ST127, соответственно.

В изучаемой коллекции штаммов *E. coli* описаны 9 вариантов сочетаний 4 функциональных групп генов, ассоциированных с вирулентностью в урологическом

тракте – генотипов вирулентности или GV-типов. Наиболее распространенной являлась группа GV15 (57 %), штаммы которой отнесены преимущественно к B2-филогруппе, O25-серогруппы (встречаются O4-, O6-, O75- и O102-серогруппы), и несут гены *fyuA*, *usp*, *chuA*, *ompT*, *yfcV*, *iutA* и *traT*. Только среди *E. coli* GV15-типа встречаются штаммы несущие гены *cnf1*, *vat*, *sfaS*, *focG* и *papGIII*. Штаммы GV14-типа (28 %) преимущественно отнесены к неB2 филогруппам и не выявленным серогруппам (встречаются O11-, O15- и O17-серогруппы), и несут гены *traT*, *iutA*, *fyuA* и *chuA*. На основании анализа генов, ассоциированных с вирулентностью в урологическом тракте, штаммы генотипов вирулентности GV14 и GV15 отнесены к патогруппе UPEC.

На основании принадлежности к GV14 и GV15 генотипам вирулентности, показана принадлежность к патогруппе UPEC штаммов *E. coli* 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.

Впервые для штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов с урологическими заболеваниями в России идентифицированы распространенные в мире группы UPEC O25-B2-ST131, O75-B2-CC14, A-CC10, D-ST69, O2-B2-ST141, O4/O6-B2-ST127, O2/O6-B2-ST73, B1-ST58 и O89-A-ST744. Анализ фенотипов и генотипов вирулентности и резистентности, для штаммов *E. coli* нашего исследования отнесенных к распространенным в мире группам UPEC показал, что штаммы O25-B2-ST131 и O2/O6-B2-ST73 можно охарактеризовать как высоковирулентные и резистентные, штаммы O75-B2-CC14, O2-B2-ST141 и O4/O6-B2-ST127 – как высоковирулентные и чувствительные, а штаммы A-CC10 и O89-A-ST744 – как слабовирулентные и резистентные. Штаммы B1-ST58 и D-ST69 обладают средним уровнем вирулентности и резистентности.

Для 54 штаммов получены и размещены в базе данных GenBank полные нуклеотидные последовательности, идентифицированы профаги и плазмиды. Анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей 11 штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131, выявил в них группы несовместимости плазмид, а также вариативные участки, содержащие профаги. Идентифицировано 43 плазмиды, среди которых наиболее распространены большие F-плазмиды I и II групп (n=27), а также малые плазмиды Col(MG828) (n=7) и Col156 (n=5). Во всех полногеномных последовательностях

штаммов *E. coli* идентифицированы профаги (n=34), в составе которых, кроме генов фагов идентифицированы гены, кодирующие эффлюксные насосы, гены антибиотикорезистентности и гены, ассоциированные с факторами вирулентности. В большинстве исследованных штаммов выявлены профаги фагов Enterobacteria phage P88 (n=8), профаг Escherichia phage SH2026Stx1 (n=8) и профаг Pectobacterium phage ZF40 (n=7), имеющие идентичное строение для всех штаммов.

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*. Кроме того, показана высокая распространенность генов резистентности к бета-лактамам, более половины штаммов несли гены устойчивости к тетрациклинам, сульфаниламидам и четвертичным аммониевым соединениям, а также макролидам, не применяемым в урологии. Из генов бета лактамаз выявлены только идентичные для всех штаммов *bla<sub>ampC</sub>*, а также *bla<sub>STX-M</sub>* и *bla<sub>OXA-1</sub>*. Кроме того, в полных геномах всех протестированных штаммов выявлены мутации генов *parE* и *parC*, обуславливающие резистентность к фторхинолонам. В полных геномах штаммов *E. coli* группы O25-B2-ST131 выявлены генетические кластеры резистентности, включающие несколько генов резистентности к разным антимикробным препаратам. Во всех штаммах *E. coli*, полученных от пациентов НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина в 2016-2017 гг.

выявлен

кластер

*int11~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA*. В пяти геномах выявлен кластер *aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXA-1</sub>~catB3*, еще в одном штамме *sul2~aph(3'')-Ib~aph(6)-Id*.

## 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*, *ironN*, *iutA* и/или *fyuA*), токсинов (*cnf1*, *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<sup>+</sup> и Fe<sup>2+</sup> 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 CTX-M-типа, интегронами класса 1 и генетическими кластерами резистентности *intI1~aadA5~dfrA17~qacE~sul1~chrA~padR~IS6100~mphR~mrxA~mphA, aac(6')-Ib-cr~bla<sub>OXА-1</sub>~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 ДИССЕРТАЦИОННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Созданная в результате исследования коллекция уропатогенных штаммов *Escherichia 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 фенотипических и генетических 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 ИМВП.

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 Уорикского университета, 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 и информация о генетических группах UPEC, выделенных в России, может быть использована для выявления эпидемически значимых возбудителей в клинической практике.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ  
И ТЕРМИНОВ

AIEC	– адгезивно-инвазивные <i>E. coli</i>
AMC	– амоксициллин/клавулановая кислота
AMP	– ампициллин
APEC	– <i>E. coli</i> - возбудитель колибактериоза птиц
ATP	– аденозинтрифосфат
Bch	– бензалконий хлорид
BLAST	– BasicLocalAlignmentSearchTool
BSI	– <i>E. coli</i> - возбудитель инфекции кровотока
CC	– клональный комплекс
Chg	– хлоргексидин
CIP	– ципрофлоксацин
CRC	– <i>E. coli</i> ассоциированные с колоректальным раком
CRR	– кластер генов резистентности к антимикробным препаратам
CTX	– цефотаксим
CTX-M	– ген бета-лактамазы <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
<i>cut-off</i>	– пороговая концентрация для группы штаммов
DAEC	– диффузно-адгезивные <i>E. coli</i>
EAEC	– энтероагрегативные <i>E. coli</i>
<i>ECOFF</i>	– эпидемическая значимая величина <i>cut-off</i>
EHEC	– энтерогеморрагические <i>E. coli</i>
EIEC	– энтероинвазивные <i>E. coli</i>
EnPEC	– <i>E. coli</i> - возбудитель инфекции эндометрия
EPEC	– энтеропатогенные <i>E. coli</i>
ETEC	– энтеротоксигенные <i>E. coli</i>
EUCAST	– Европейский комитет по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам
ExPEC	– внекишечные патогенные <i>E. coli</i>
FOS	– фосфомицин
GEN	– гентамицин
GTP	– гуанозинтрифосфат
GV	– генотип вирулентности
HP	– гипотетический белок
ins1	– интегронная кассета интегразы 1 типа
ins2	– интегронная кассета интегразы 2 типа
int1	– ген интегразы 1 типа
int2	– ген интегразы 2 типа
IPEC или DEC	– диареегенные <i>E. coli</i>

IS	– инсерционная последовательность
kb	– килобаза
LD <sub>50</sub>	– полулетальная доза
MALDI-TOF	– матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация
MDR	– полирезистентные штаммы
MLST	– мультилокусное сиквенс-типирование
MPEC	– <i>E. coli</i> - возбудитель инфекции молочных желез
NCBI	– Национальный центр биотехнологической информации
ND	– нет данных
NI	– не идентифицирован
NIT	– нитрофурантоин
NMEC	– <i>E. coli</i> - возбудитель неонатального менингита
NoDARS	– Northern Dimension Antibiotic Resistance Study
OXA48	– ген бета-лактамазы <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>
PAI	– остров патогенности
PDR	– панрезистентные штаммы
RAPD	– полимеразная цепная реакция случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК
RESOURCE	– pathogen distribution and antibiotic RESistance prOfile of key gram-negative bacteria caUsing community-onsEt URinary traCt
R-фенотип	– резистентные штаммы
SDS	– додецилсульфат натрия
SEPEC	– <i>E. coli</i> - возбудитель сепсиса
ST	– сиквенс-тип
STEC	– шига-токсин продуцирующие <i>E. coli</i>
S-фенотип	– чувствительные штаммы
TEM	– ген бета-лактамазы <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
TiCaPCON	– наноструктурированные пленки
Trz	– триклозан
UPEC	– уропатогенные <i>E. coli</i>
XDR	– экстремально резистентные штаммы
АМП	– антимикробные препараты
ГБУЗ ИКБ №1 г. Москвы	– Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения г. Москвы
ГБУЗ Троицкая ЦРБ Челябинской области	– Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Троицкая центральная районная больница» Департамента здравоохранения Челябинской области
ГБУЗ ЯО «ИКБ №1»	– Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Ярославской области «Инфекционная клиническая больница №1» Департамента здравоохранения Ярославской области
ГКПМ	– Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур
ГРМ 1	– «Питательная среда №1 ГРМ-агар»

ГРМБ	– питательная среда «ГРМ-бульон»
ГЦ	– гуаниновые и цитозинового основания
ДАРМИС-2018	– многоцентровое проспективное эпидемиологическое исследование
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
дНТФ	– дезоксирибонуклеозидтрифосфат
ИМВП	– инфекция мочевыводящих путей
кДа	– килодальтон
КОЕ	– колониеобразующая единица
ЛПС	– липополисахарид
МГЭ	– мобильные генетические элементы
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МУК	– методические указания
НИИ Урологии им. Н.А. Лопаткина	– Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии имени Н.А. Лопаткина - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России
НИР	– научно-исследовательская работа
п.н.	– пара нуклеотидов
ПАВ	– поверхностно-активное вещество
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова	– Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ (Сеченовский Университет)
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
рРНК	– рибосомальная рибонуклеиновая кислота
СанПиН	– Санитарные правила и нормы
СБ	– степень биоупленкообразования в 96-луночном планшете
тРНК	– транспортная рибонуклеиновая кислота
УФ	– ультрафиолет
ФБУН ГНЦ ПМБ	– Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
ФГАУ НМИЦ НХ им. Н.Н. Бурденко	– Федеральное государственное автономное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения РФ
ФГБУ НЦАГИП им. академика В.И. Кулакова	– Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России
ФР	– физиологический раствор
ЧАС	– четвертичные аммониевые соединения
ЭДТА	– этилендиаминтетраацетат

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Акимкин, В.Г. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень / В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, О.А. Орлова [и др.]. – М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. – 52 с.
2. Аминова, Э.М. Характеристика *Escherichia coli*, выделенной из мочи пациентов при различных клинических ситуациях / Э.М. Аминова, Л.И. Бахарева // Вестн. Челяб. Гос. Универ. – 2013. – № 7 (298). – С. 51-52.
3. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Ленинград: Медгиз [Ленингр. отд-ние], 1962. – 180 с.
4. Бутко, М.П. Классификация дезинфицирующих средств и оценка их эффективности / М.П. Бутко, П.А. Попов, Д.А. Онищенко // Рос. Журн. Пробл. Вет. Санитар. Гиг. Экол. – 2018. – № 3. – С. 134-142.
5. Воробьев, А.В. Микробиология: Учебник / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова / 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2003. – 336 с.
6. Галынкин, В.А. Фармацевтическая микробиология / В.А. Галынкин, В.И. Кочеровец, А.Э. Габидова. – 2-е изд., доп. и перераб. – М.: Арнебия, 2015. – 240 с.
7. Гизатуллина, Ю.С. Экспериментальное обоснование эффективности применения покрытых серебром силиконовых урологических катетеров / Ю.С. Гизатуллина, В.Н. Аптуков, И.А. Морозов [и др.] // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2019. – Т. 21. – № 1. – С. 75-80.
8. Гизатуллина, Ю.С. Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* на различных абиотических поверхностях / Ю.С. Гизатуллина, М.В. Кузнецова // Вест. Перм. универ. Серия: Биология. – 2017. – № 2. – С. 185-192.
9. Егоров, Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 528 с.
10. Зайцев, А.В. Инфекции мочевыводящих путей. Современная тактика врача-уролога / А.В. Зайцев, А.А. Ширяев, Ю.А. Ким [и др.] // РМЖ. – 2019. – Т. 27. – № 11. – С. 21-26.

11. Ильина, Т.С. Бактериальные биопленки: роль в хронических инфекционных процессах и поиск средств борьбы с ними / Т.С. Ильина, Ю.М. Романова // Мол. Ген. Микр. Вирус. – 2021. – Т. 39. – № 2. – С. 14-24.
12. Инфекция мочевыводящих путей у детей. Клинические рекомендации: [утв. Министерством здравоохранения РФ 2021 г.]. – 2021. – 24 с. – Режим доступа: [https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/281\\_2](https://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/281_2)
13. Казанцев, А.В. Определение принадлежности к О-серогруппе по результатам молекулярно-генетического анализа уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов, находящихся на госпитализации в урологических отделениях на территории г. Саратов, с симптомами пиелонефрита и цистита / А.В. Казанцев // Аспирантские чтения-2018. – 2018. – С. 167-167.
14. Казанцев, А.В. Факторы вирулентности и филогенетическая характеристика уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, выделенных на территории г. Саратова / А.В. Казанцев, Н.А. Осина, Т.О. Глинская [и др.] // Пробл. Особ. Опас. Инф. – 2019. – № 4. – С. 56-60.
15. Карцев, Н.Н. Эпидемиология, свойства и лабораторная диагностика шига-токсин-продуцирующих *Escherichia coli* / Н.Н. Карцев, Э.А. Светоч // Бактер. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 7-12.
16. Клинические рекомендации Европейской ассоциации урологов 2021 / Руководитель проекта – М.А. Газимиев. – М.: Медконгресс, 2021. – 444 с.
17. Кобзев, Е.Н. Формирование устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам и пути решения проблемы / Е.Н. Кобзев, В.А. Чугунов, В.Б. Родин [и др.] // Эпид. Инф. Бол. – 2014. – № 6. – С. 48-54.
18. Козлов, Р.С. Выбор антимикробных препаратов при неосложненных инфекциях мочевых путей: как принять соломоново решение? / Р.С. Козлов, А.В. Голуб // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2014. – Т. 16. – № 1. – С. 18-25.
19. Коротяев, А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов / А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – 5-е изд., испр. и доп. – СПб.: СпецЛит, 2010. – 760 с.
20. Кузина, Е.С. Интегроны классов 1 и 2 в госпитальных штаммах грамотрицательных бактерий, выделенных в Москве и регионах Российской Федерации

- / Е.С. Кузина, Е.И. Асташкин, А.И. Лев [и др.] // Мол. Ген. Микр. Вирус. – 2019. – Т. 37. – № 1. – С. 17-24.
21. Кузнецова, М.В. Уропатогенные штаммы *Escherichia coli*: биологические свойства и колонизационная активность / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина, В.А.Демаков // Вест. Перм. Фед. Исслед. Центра. – 2019. – № 1. – С. 14-22.
22. Кузнецова, М.В. Филогенетическое разнообразие и биологические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli* / М.В. Кузнецова, Ю.С. Гизатуллина // Бюл. Оренбург. Науч. Центра Уро РАН. – 2019. – № 3. – С. 24-24.
23. Кузнецова, М.В., Сравнительная характеристика штаммов уропатогенной *Escherichia coli*, выделенных в условиях поликлиники и стационара / М.В. Кузнецова, С.В. Проворова, О.Г. Кубарев [и др.] // Урология. – 2018. – № 6. – С. 37-44.
24. Летифов, Г.М. Многолетний мониторинг этиологической структуры и антибиотикорезистентности уропатогенной микробиоты при инфекции мочевыводящих путей у детей и подростков / Г.М. Летифов, Е.П. Кривоносова, Л.В. Маврина [и др.] // Мед. Теор. Пр. – 2019. – Т. 4. – № 5. – С. 310-311.
25. Лопаткин, Н.А. Урология: Учебник / Н.А. Лопаткин, А.Г. Пугачев, О.И. Аполихин [и др.]; под ред. Н.А. Лопаткина. – 5-е. изд., перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2004. – 520 с.
26. Макарова, М.А. Распространенность ST131 среди БЛРС-продуцирующих штаммов *Escherichia coli*, выделенных при инфекциях мочевых путей / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Ю.С. Филатова // Клин. Микр. Антимикроб. Химиотер. – 2019. – Т. 21. – № S1. – С. 42-42.
27. МУ 04-723/3. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями: [утв. Минздрав СССР 17.12.1984]. – 1984. – 74 с.
28. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
29. Никифоровский, Н.К. Инфекции мочевыводящих путей у беременных (обзор) / Н.К. Никифоровский, Е.А. Степанькова, А.О. Сухорукова // Сиб. Науч. Мед. Жур. – 2020. – Т. 40. – № 5. – С. 18-23.

30. Палагин, И.С. Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового исследования «ДАРМИС-2018» / И.С. Палагин, М.В. Сухорукова, А.В. Дехнич [и др.] // Клин. Микр. Антимикроб. Химиотер. – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 134-146.
31. Перепанова, Т.С. Значение инфекций, обусловленных образованием биопленок, в урологической практике / Т.С. Перепанова // Эффект. Фарм. – 2013. – № 37. – С. 18-27.
32. Перепанова, Т.С. Эмпирический выбор антимикробных препаратов при неосложненной инфекции нижних мочевых путей: исследование резистентности возбудителей «ДАРМИС» / Т.С. Перепанова, Р.С. Козлов, А.В. Дехнич [и др.] // Экспер. Клин. Урология. – 2012. – № 2. – С. 78-83.
33. Перепанова, Т.С. Профилактика инфекционно-воспалительных осложнений после перкутанной нефролитотрипсии / Т.С. Перепанова, Д.С. Меринов, А.В. Казаченко [и др.] // Урология. – 2020. – № 3. – С. 26-33.
34. Поздеев, О.К. Медицинская микробиология: учебное пособие: учебное пособие для студентов медицинских вузов / О.К. Поздеев; под ред. В.И. Покровского. – 4-е изд.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 765 с.
35. Поздеев, О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий / О.К. Поздеев // Практ. Мед. – 2010. – № 41. – С. 84-88.
36. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О.К. Поздеев, Р.В. Федоров.– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 719 с.
37. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Усп. Биол. Химии. – 2004. – Т. 44. – № 2. – С. 263-306.
38. Слукин, П.В. Оценка устойчивости клеточной ассоциации *Escherichia coli* к хлориду бензалкония / П.В. Слукин, В.Б. Родин, В.А. Чугунов [и др.] // Инф. Иммуно. Материалы научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «От эпидемиологии к диагностике инфекционных заболеваний: подходы, традиции, инновации» – 2014. – Т. 4. – № 1. – С. 49.
39. Толордава, Э.Р. Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий / Э.Р. Толордава, И.Г. Тиганова, Н.В. Алексеева [и др.] // Жур. Микроб. Эпидем. Иммуно. – 2012. – № 4. – С. 56-62.

40. Ширяев, А.А. Перспектива применения бактериофагов в урологической практике / А.А. Ширяев, А.О. Васильев, А.В. Зайцев [и др.] // Урология. – 2019. – № 6. – С. 131-136.
41. Шишиморов, И.Н. Инфекции мочевыводящих путей у детей / И.Н. Шишиморов, О.В. Магницкая, О.В. Шаталова [и др.] // Вест. Волгоград. Гос. Мед. Универ. – 2020. – № 2 (74). – С. 3-8.
42. Abushaheen, M.A. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance / M.A. Abushaheen, Muzahed, A.J. Fatani [et al.] // Dis Mon. – 2020. – Vol. 66. – № 6. – P. 100971.
43. Alav, I. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation / I. Alav, J.M. Sutton, K.M. Rahman // J Antimicrob Chemother. – 2018. – Vol. 73. – № 8. – P. 2003-2020.
44. Alghoribi, M.F. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli* / M.F. Alghoribi, T.M. Gibreel, A.R. Dodgson [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – № 7. – P. e101547.
45. Ali, I. Phylogeny, sequence-typing and virulence profile of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains from Pakistan / I. Ali, Z. Rifaqat, I. Ahmed [et al.] // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-9.
46. Alikhan, N.F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons / N.F. Alikhan, N.K. Petty, N.L. Ben Zakour, S.A. Beatson // BMC Genomics. – 2011. – № 12. – P. 402.
47. Alsohaim, S.I. Relationship between antimicrobial prescribing and antimicrobial resistance among UTI patients at Buraidah Central Hospital, Saudi Arabia / S.I. Alsohaim, A.A. Bawadikji, R. Elkalmi [et al.] // J Pharm Bioallied Sci. – 2019. – Vol. 11. – № 2. – P. 162.
48. Alyamani, E.J. The occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia / E.J. Alyamani, A.M. Khiyami, R.Y. Booq [et al.] // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2017. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-13.
49. Arndt, D. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool / D. Arndt, J. Grant, A. Marcu [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44. – W1. – W16-21.

50. Azevedo, A.S. Impact of polymicrobial biofilms in catheter-associated urinary tract infections / A.S. Azevedo, C. Almeida, L.F. Melo, N.F. Azevedo // *Crit Rev Microbiol.* – 2017. – Vol. 43. – № 4. – P. 423-439.
51. Baldiris-Avila, R. Phylogenetic classification, biofilm-forming capacity, virulence factors, and antimicrobial resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) / R. Baldiris-Avila, A. Montes-Robledo, Y. Buelvas-Montes // *Curr Microbiol.* – 2020. – Vol. 77. – № 11. – P. 3361-3370.
52. Ballesteros-Monrreal, M.G. Virulence and resistance determinants of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pregnant and non-pregnant women from two states in Mexico / M.G. Ballesteros-Monrreal, M.Mp. Arenas-Hernández, Y. Enciso-Martínez [et al.] // *Infect Drug Resist.* – 2020. – Vol. 13. – P. 295.
53. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov [et al.] // *J Comput Biol.* – 2012. – Vol. 19. – № 5. – P. 455-477.
54. Barber, A.E. Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies / A.E. Barber, J.P. Norton, T.J. Wiles, M.A. Mulvey // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2016. – Vol. 80. – № 2. – P. 351-367.
55. Barros, A.A. Ureteral Stents Technology: Biodegradable and Drug-Eluting Perspective / A.A. Barros, C. Oliveira, E. Lima [et al.] // *Ref Mod Mater Sci Mater Engin.* – Elsevier Inc., 2017. – P. 793-812.
56. Behzadi, P. Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs) / P. Behzadi // *Folia Microbiol.* – 2020. – Vol. 65. – № 1. – P. 45-65.
57. Biggel, M. Horizontally acquired papGII-containing pathogenicity islands underlie the emergence of invasive uropathogenic *Escherichia coli* lineages / M. Biggel, B.B. Xavier, J.R. Johnson [et al.] // *Nat Commu.* – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-15.
58. Bliss, J.M. Coating the surface: a model for expression of capsular polysialic acid in *Escherichia coli* K1 / J.M. Bliss, R.P. Silver // *Mol Microbiol.* – 1996. – Vol. 21. – № 2. – P. 221-231.
59. Bokranz, W. Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract / W. Bokranz, X. Wang, H. Tschäpe, U. Römling // *J Med Microbiol.* – 2005. – Vol. 54. – № 12. – P. 1171-1182.

60. Bortolaia, V. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes / V. Bortolaia, R.F. Kaas, E. Ruppe [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2020. – Vol. 75. – № 12. – P. 3491-3500.
61. Bozcal, E. The relationship between phylogenetic classification, virulence and antibiotic resistance of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in İzmir province, Turkey / E. Bozcal, V. Eldem, S. Aydemir, M. Skurnik // PeerJ. – 2018. – Vol. 6. – P. e5470.
62. Brüßow, H. Infection therapy: the problem of drug resistance-and possible solutions / H. Brüßow // Microb Biotechnol. – 2017. – Vol. 10. – № 5. – P. 1041-1046.
63. Buckles, E.L. Identification and characterization of a novel uropathogenic *Escherichia coli*-associated fimbrial gene cluster / E.L. Buckles, F.K. Bahrani-Mougeot, A. Molina [et al.] // Infect Immun. – 2004. – Vol. 72. – № 7. – P. 3890-3901.
64. Burgos, Y. Common origin of plasmid encoded alpha-hemolysin genes in *Escherichia coli* / Y. Burgos, L. Beutin // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-13.
65. Camacho, C. BLAST+: architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2009. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-9.
66. Carattoli, A. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing / A. Carattoli, A. Bertini, L. Villa [et al.] // J Microbiol Methods. – 2005. – Vol. 63. – № 3. – P. 219-228
67. Carattoli, A. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing / A. Carattoli, E. Zankari, A. García-Fernández [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2014. – Vol. 58. – № 7. – P. 3895-3903
68. Chahales, P. Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria / P. Chahales, D.G. Thanassi // Microbiol Spectr. – 2015. – P. 277-329.
69. Chourifa, H. Review of titanium surface modification techniques and coatings for antibacterial applications / H. Chourifa, H. Bouloussa, V. Migonney, C. Falentin-Daudré // Acta Biomater. – 2019. – Vol. 83. – P. 37-54.
70. Christaki, E. Antimicrobial resistance in bacteria: mechanisms, evolution, and persistence / E. Christaki, M. Marcou, A. Tofarides // J Mol Evol. – 2020. – Vol. 88. – № 1. – P. 26-40.
71. Clausen, P.T.L.C. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA / P.T.L.C. Clausen, F.M. Aarestrup, O. Lund // BMC Bioinformat. – 2018. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-8.

72. Clermont, O. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group / O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen // *Appl Environ Microbiol.* – 2000. – Vol. 66. – № 10. – P. 4555-4558.
73. Clermont, O. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups / O. Clermont, J.K. Christenson, E. Denamur, D.M. Gordon // *Environ Microbiol Rep.* – 2013. – Vol. 5. – № 1. – P. 58-65.
74. Cloutier, M. Antibacterial coatings: challenges, perspectives, and opportunities / M. Cloutier, D. Mantovani, F. Rosei // *Trends Biotechnol.* – 2015. – Vol. 33. – № 11. – P. 637-652.
75. Coenye, T. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation / T. Coenye, H.J. Nelis // *J Microbiol Methods.* – 2010. – Vol. 83. – № 2. – P. 89-105.71
76. Contreras-Alvarado, L.M. Molecular epidemiology of multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* O25b strains associated with complicated urinary tract infection in children / L.M. Contreras-Alvarado, S. Zavala-Vega, A.Cruz-Córdova [et al.] // *Microorganisms.* – 2021. – Vol. 9. – № 11. – P. 2299.
77. Coque, T.M. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 / T.M. Coque, A. Novais, A. Carattoli [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2008. – Vol. 14. – № 2. – P. 195.
78. Cristea, V.C. Snapshot of phylogenetic groups, virulence, and resistance markers in *Escherichia coli* uropathogenic strains isolated from outpatients with urinary tract infections in Bucharest, Romania / V.C. Cristea, I. Gheorghe, I.C. Barbu [et al.] // *Biomed Res Int.* – 2019. – Vol. 2019.
79. Dadi, B.R. Distribution of virulence genes and phylogenetics of uropathogenic *Escherichia coli* among urinary tract infection patients in Addis Ababa, Ethiopia / B.R. Dadi, T. Abebe, L. Zhang [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-12.
80. Darling, A.E. A draft genome of *Escherichia coli* sequence type 127 strain 2009-46 / A.E. Darling, J. McKinnon, P. Worden [et al.] // *Gut Pathog.* – 2014. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-6.
81. Denamur, E. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli* / E. Denamur, O. Clermont, S. Bonacorsi, D. Gordon // *Nat Rev Microbiol.* – 2021. – Vol. 19. – № 1. – P. 37-54.

82. Desloges, I. Identification and characterization of OmpT-like proteases in uropathogenic *Escherichia coli* clinical isolates / I. Desloges, J.A. Taylor, J.-M. Leclerc [et al.] // *MicrobiologyOpen*. – 2019. – Vol. 8. – № 11. – P. e915.
83. de Toro, M. Plasmid Diversity and Adaptation Analyzed by Massive Sequencing of *Escherichia coli* Plasmids / M. de Toro, M.P. Garcilláon-Barcia, F. De La Cruz // *Microbiol Spectr*. – 2014. – Vol. 2. – № 6.
84. Dhinaut, J. A dietary carotenoid reduces immunopathology and enhances longevity through an immune depressive effect in an insect model / J. Dhinaut, A. Balourdet, M. Teixeira [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-12.
85. Eberly, A.R. Defining a molecular signature for uropathogenic versus urocolonizing *Escherichia coli*: the status of the field and new clinical opportunities / A.R. Eberly, C.J. Beebout, C.M.C. Tong [et al.] // *J Mol Biol*. – 2020. – Vol. 432. – № 4. – P. 786-804.
86. Ebrahim-Saraie, H.S. Detection of antimicrobial susceptibility and integrons among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Southwestern Iran / H.S. Ebrahim-Saraie, N.Z. Nezhad, H. Heidari [et al.] // *Oman Med J*. – 2018. – Vol. 33. – № 3. – P. 218.
87. El Garch, F. *mcr-1* is borne by highly diverse *Escherichia coli* isolates since 2004 in food-producing animals in Europe / F. El Garch, M. Sauget, D. Hocquet [et al.] // *Clin Microbiol Infect*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 51.e1-51.e4.
88. Fernandes, M.R. Emergence of CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of ST131 and clade C1-M27 in an impacted ecosystem with international maritime traffic in South America / M.R. Fernandes, F.P. Sellera, M.P.V. Cunha [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2020. – Vol. 75. – № 6. – P. 1647-1649.
89. Flament-Simon, S.-C. Molecular characteristics of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), uropathogenic *E. coli* (UPEC), and multidrug resistant *E. coli* isolated from healthy dogs in Spain. Whole genome sequencing of canine ST372 isolates and comparison with human isolates causing extraintestinal infections / S.-C. Flament-Simon, M. de Toro, V. García [et al.] // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 11. – P. 1712.
90. Fong, K. Prophage Diversity Across Salmonella and Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in Agricultural Niches of British Columbia, Canada / K. Fong, Y.T. Lu, T. Brenner [et al.] // *Front Microbiol*. – 2022. – Vol. 13. – P. 853703

91. Gajamer, V.R. The first report of phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing uropathogens in Sikkim and Darjeeling hills of India / V.R. Gajamer, A. Bhattacharjee, D. Paul [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2018. – Vol. 24. – № 9. – P. 1284-1288.
92. Galardini, M. Major role of iron uptake systems in the intrinsic extra-intestinal virulence of the genus *Escherichia* revealed by a genome-wide association study / M. Galardini, O. Clermont, A. Baron [et al.] // *PLoS genetics.* – 2020. – Vol. 16. – № 10. – P. e1009065.
93. Gao, Q. Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes / Q. Gao, D. Zhang, Z. Ye [et al.] // *Microb Pathog.* – 2017. – Vol. 104. – P. 217-224.
94. Gibreel, T.M. Population structure, virulence potential and antibiotic susceptibility of uropathogenic *Escherichia coli* from Northwest England / T.M. Gibreel, A.R. Dodgson, J. Cheesbrough [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2012. – Vol. 67. – № 2. – P. 346-356.
95. Gillor, O. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials / O. Gillor, B.C. Kirkup, M.A. Riley // *Adv Appl Microbiol.* – 2004. – Vol. 54. – № 18. – P. 129-146.
96. Goller, C.C. Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: contribution to intracellular biofilm development / C.C. Goller, P.C. Seed // *Virulence.* – 2010. – Vol. 1. – № 4. – P. 333-337.
97. Haft, D.H. RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation / D.H. Haft, M. DiCuccio, A. Badretdin [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – Vol. 46. – № D1. – P. D851-D860.
98. Hagos, D.G. Biofilm and hemagglutinin formation: a Hallmark for drug resistant uropathogenic *Escherichia coli* / D.G. Hagos, T.A. Mezgebo, S. Berhane, A.A. Medhanyie // *BMC Res Notes.* – 2019. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-5.
99. Halaji, M. Molecular epidemiology of *bla*<sub>CTX-M</sub> gene-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients: clonal dissemination of CC131 and CC10 / M. Halaji, S. Shahidi, B. Ataei [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-11.
100. Hassuna, N.A. Molecular characterization of Extended-spectrum  $\beta$  lactamase-producing *E. coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt /

N.A. Hassuna, A.S. Khairalla, E.M. Farahat [et al.] // Sci Rep. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-8.

101. Henderson, J.P. Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli* / J.P. Henderson, J.R. Crowley, J.S. Pinkner [et al.] // PLoS pathogens. – 2009. – Vol. 5. – № 2. – P. e1000305.

102. Henly, E.L. Biocide exposure induces changes in susceptibility, pathogenicity, and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* / E.L. Henly, J.A.R. Dowling, J.B. Maingay [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2019. – Vol. 63. – № 3. – P. e01892-18.

103. Heras, J. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images / J. Heras, C. Domínguez, E. Mata [et al.] // BMC bioinformatics. – 2015. – Vol. 16. – № 1. – P. 1-8.

104. Hernández-Chiñas, U. Characterization of auto-agglutinating and non-typeable uropathogenic *Escherichia coli* strains / U. Hernández-Chiñas, A. Pérez-Ramos, L. Belmont-Monroy [et al.] // J Infect Dev Ctries. – 2019. – Vol. 13. – № 06. – P. 465-472.

105. Hernández-Navarrete, M.J. Fundamentos de antisepsia, desinfección y esterilización / M.J. Hernández-Navarrete, J.M. Celorrio-Pascual, C.L. Moros, V.M.S. Bernad // Enferm Infecc Microbiol Clin. – 2014. – Vol. 32. – № 10. – P. 681-688.

106. Hojabri, Z. Clonal diversity, virulence genes content and subclone status of *Escherichia coli* sequence type 131: comparative analysis of *E. coli* ST131 and non-ST131 isolates from Iran / Z. Hojabri, N. Darabi, M. Arab [et al.] // BMC Microbiol. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-10.

107. Hu, Y.-Y. Molecular typing of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients / Y.-Y. Hu, J.-C. Cai, H.-W. Zhou [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2013. – Vol. 79. – № 19. – P. 5988-5996.

108. Iguchi, A. *Escherichia coli* O-genotyping PCR: a comprehensive and practical platform for molecular O serogrouping / A. Iguchi, S. Iyoda, K. Seto [et al.] // J Clin Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – № 8. – P. 2427-2432.

109. Irengé, L.M. Whole-genome sequences of multidrug-resistant *Escherichia coli* in South-Kivu Province, Democratic Republic of Congo: characterization of phylogenomic changes, virulence and resistance genes / L.M. Irengé, J. Ambroise, B. Bearzatto [et al.] // BMC Infect Dis. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 1-10.

110. Issakhanian, L. Antimicrobial agents and urinary tract infections / L. Issakhanian, P. Behzadi // *Curr Pharm Des.* – 2019. – Vol. 25. – № 12. – P. 1409-1423.
111. Jander, G. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects / G. Jander, L.G. Rahme, F.M. Ausubel // *J Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – № 13. – P. 3843-3845.
112. Jarocki, V.M. Multidrug-resistant lineage of enterotoxigenic *Escherichia coli* ST182 with serotype O169:H41 in airline waste / V.M. Jarocki, S. Heß, K. Anantanawat [et al.] // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 731050.
113. Jaureguy, F. Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains / F. Jaureguy, L. Landraud, V. Passet [et al.] // *BMC genomics.* – 2008. – Vol. 9. – № 1. – P. 1-14.
114. Javed, S. Phylogenetic group B2 expressed significant biofilm formation among drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* / S. Javed, Z.A. Mirani, Z.A. Pirzada // *Libyan J Med.* – 2021. – Vol. 16. – № 1.
115. Joensen, K.G. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* / K.G. Joensen, F. Scheutz, O. Lund [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – № 5. – P. 1501-1510.
116. Johnson, J.R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection / J.R. Johnson // *Clin Microbiol Rev.* – 1991. – Vol. 4. – № 1. – P. 80-128.
117. Johnson, J.R. Colonization with and acquisition of uropathogenic *Escherichia coli* as revealed by polymerase chain reaction-based detection / J.R. Johnson, J.J. Brown, U.B. Carlino, T.A. Russo // *J Infect Dis.* – 1998. – Vol. 177. – № 4. – P. 1120-1124.
118. Johnson, J.R. Virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from humans, dogs, and cats / J.R. Johnson, B. Johnston, C.R. Clabots [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2008. – Vol. 46. – № 2. – P. 417-422.
119. Johnson, J.R. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise / J.R. Johnson, A.L. Stell // *J Infect Dis.* – 2000. – Vol. 181. – № 1. – P. 261-272.
120. Johnson, J.R. Phylogenetic relationships among clonal groups of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as assessed by multi-locus sequence analysis / J.R. Johnson, K.L. Owens, C.R. Clabots [et al.] // *Microbes Infect.* – 2006. – Vol. 8. – № 7. – P. 1702-1713.

121. Johnson, T.J. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli* / T.J. Johnson, L.K. Nolan // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2009. – Vol. 73. – № 4. – P. 750-774.
122. Joyce, S.A. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella* / S.A. Joyce, C.G.M. Gahan // *Microbiology.* – 2010. – Vol. 156. – № 11. – P. 3456-3468.
123. Kaas, R.S. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms / R.S. Kaas, P. Leekitcharoenphon, F.M. Aarestrup, O. Lund // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 8. – P. e104984.
124. Kalantar-Neyestanaki, D. Dissemination of different sequence types lineages harboring *bla*<sub>CTX-M-15</sub> among uropathogenic *Escherichia coli* in Kerman, Iran / D. Kalantar-Neyestanaki, S. Mansouri, M.R.K. Ghahraman [et al.] // *Iran J Basic Med Sci.* – 2020. – Vol. 23. – № 12. – P. 1551.
125. Kaur, S. Bacteriocins as potential anticancer agents / S. Kaur, S. Kaur // *Front Pharmacol.* – 2015. – Vol. 6. – P. 272.
126. Kim, Y.C. Colicin import into *E. coli* cells: a model system for insights into the import mechanisms of bacteriocins / Y.C. Kim, A.W. Tarr, C.N. Penfold // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1843. – № 8. – P. 1717-1731.
127. Kim, H.W. Synergistic cranberry juice combinations with natural-borne antimicrobials for the eradication of uropathogenic *Escherichia coli* biofilm within a short time / H.W. Kim, D.H. Chung, S.A. Kim, M.S. Rhee // *Lett Appl Microbiol.* – 2019. – Vol. 68. – № 4. – P. 321-328.
128. Kim, B. Molecular epidemiology of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections in Korea / B. Kim, M.R. Seo, J. Kim [et al.] // *Infect Chemother.* – 2020. – Vol. 52. – № 2. – P. 194.
129. Kırmusaoğlu, S. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents / Kırmusaoğlu S. // *Antimicrob, antibiot resist, antibiofilm strateg activ methods.* – 2019. – P. 1-17.
130. Klein, R.D. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies / R.D. Klein, S.J. Hultgren // *Nat Rev Microbiol.* – 2020. – Vol. 18. – № 4. – P. 211-226.
131. Klemm, P. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli* / P. Klemm, V. Hancock, M.A. Schembri // *Environ Microbiol Rep.* – 2010. – Vol. 2. – № 5. – P. 628-640.

132. Köhler, C.D. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? / C.D. Köhler, U. Dobrindt // Int J Med Microbiol. – 2011. – Vol. 301. – № 8. – P. 642-647.
133. Kubelová, M. Virulence properties of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from retail poultry meat / M. Kubelová, I. Koláčková, T. Gelbíčová [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 308.
134. Kudinha, T. Multiplex PCR-based reverse line blot assay for simultaneous detection of 22 virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* / T. Kudinha, F. Kong, J.R. Johnson [et al.] // Appl Environ Microbiol. – 2012. – Vol. 78. – № 4. – P. 1198-1202.
135. Kudinha, T. The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection / T. Kudinha // *Escherichia coli*-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications. London: IntechOpen. – 2017. – P. 45-61.
136. Kumar, N. Association of virulence factors, phylogenetic groups and antimicrobial resistance markers in *Escherichia coli* from Badin city, Pakistan / N. Kumar, F. Nahid, R. Zahra // J Chemother. – 2017. – Vol. 29. – № 1. – P. 8-13.
137. Kurnick, S.A. Genotoxic *Escherichia coli* strains encoding colibactin, cytolethal distending toxin, and cytotoxic necrotizing factor in laboratory rats / S.A. Kurnick, A.J. Mannion, Y. Feng [et al.] // Comp Med. – 2019. – Vol. 69. – № 2. – P. 103-113.
138. Larsen, M. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria / M. Larsen, S. Cosentino, S. Rasmussen [et al.] // J Clin Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – № 4. – P. 1355-1361.
139. Lee, J.H. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea / J.H. Lee, B. Subhadra, Y.J. Son [et al.] // Lett Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 62. – № 1. – P. 84-90.
140. Leech, J. Non-pathogenic *Escherichia coli* biofilms: effects of growth conditions and surface properties on structure and curli gene expression / J. Leech, S. Golub, W. Allan [et al.] // Arch Microbiol. – 2020. – Vol. 202. – № 6. – P. 1517-1527.
141. Leekitcharoenphon, P. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enteric* / P. Leekitcharoenphon, E.M. Nielsen, R.S. Kaas [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – № 2. – P. e87991.
142. Leonard, M.F. The causal relationship between O2:K7:H6 extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) and native valve endocarditis: a case report / M.F. Leonard,

H. Rodriguez-Villalobos, N. Boisen [et al.] // BMC Infect Dis. – 2021. – Vol. 21. – № 1. – P. 1-4.

143. Lewis, K. Persisters: specialized cells responsible for biofilm tolerance to antimicrobial agents / K. Lewis, A.L. Spoering, N. Kaldalu [et al.] // Biofilms, infect, antimicrob therapy. – CRC Press, 2005. – P. 259-274.

144. Li, L. Spread of *oqxAB* in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids / L. Li, X. Liao, Y. Yang [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2013. – Vol. 68. – № 10. – P. 2263-2268.

145. Li, W. Impact of substrate material and chlorine/chloramine on the composition and function of a young biofilm microbial community as revealed by high-throughput 16S rRNA sequencing / W. Li, Q. Tan, W. Zhou [et al.] // Chemosphere. – 2020. – Vol. 242. – P. 125310.

146. Li, W. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation / W. Li, K.R. O'Neill, D.H. Haft [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2021. – Vol. 49. – № D1. – P. D1020-D1028.

147. Li, X. Compounds targeting YadC of uropathogenic *Escherichia coli* and its host receptor annexin A2 decrease bacterial colonization in bladder / X. Li, G. Pei, L. Zhang [et al.] // EBioMedicine. – 2019. – Vol. 50. – P. 23-33.

148. Lienard, A. *Escherichia coli* isolated from diabetic foot osteomyelitis: clonal diversity, resistance profile, virulence potential, and genome adaptation / A. Lienard, M. Hosny, J. Jneid [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – № 2. – P. 380.

149. Lin, W.J. A novel target pathogen identification and tracking system using capillary electrophoresis-random amplified polymorphic DNA / W.J. Lin, C.Y. Tung, M.Y. Yen [et al.] // Sci Rep. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1-11.

150. Litovchenko, N.V. Combustion synthesis of Ti-C-Co-Ca<sub>3</sub> (PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Ag-Mg electrodes and their utilization for pulsed electrospark deposition of bioactive coatings having an antibacterial effect / N.V. Litovchenko, A.Y. Potanin, E.I. Zamulaeva [et al.] // Surf Coat Technol. – 2017. – Vol. 309. – P. 75-85.

151. Liu, B. Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens / B. Liu, A. Furevi, A.V. Perepelov [et al.] // FEMS Microbiol Rev. – 2020. – Vol. 44. – № 6. – P. 655-683.

152. Locke, R.K. Acquisition and loss of CTX-M plasmids in *Shigella* species associated with MSM transmission in the UK / R.K. Locke, D.R. Greig, C. Jenkins [et al.] // Microb Genom. – 2021. – Vol. 7. – № 8.

153. Longhi, C. Virulence traits in *Escherichia coli* strains isolated from outpatients with urinary tract infections / C. Longhi, A. Cossu, V. Iebba [et al.] // Int J Immunopathol Pharmacol. – 2008. – Vol. 21. – № 3. – P. 715-723.
154. Luna-Pineda, V.M. Features of urinary *Escherichia coli* isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico / V.M. Luna-Pineda, S.A. Ochoa, A. Cruz-Córdova [et al.] // PloS One. – 2018. – Vol. 13. – № 10. – P. e0204934.
155. Luterbach, C.L. TosR-mediated regulation of adhesins and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* / C.L. Luterbach, V.S. Forsyth, M.D. Engstrom, H.L. Mobley // MSphere. – 2018. – Vol. 3. – № 3. – P. e00222-18.
156. Lüthje, P. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host / P. Lüthje, A. Brauner // Adv Microb Physiol. – 2014. – Vol. 65. – P. 337-372.
157. Magiorakos, A.-P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A.-P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey [et al.] // Clin Microbiol Infect. – 2012. – Vol. 18. – № 3. – P. 268-281.
158. Malberg Tetzschner, A.M. In silico genotyping of *Escherichia coli* isolates for extraintestinal virulence genes by use of whole-genome sequencing data / A.M. Malberg Tetzschner, J.R. Johnson, B.D. Johnston [et al.] // J Clin Microbiol. – 2020. – Vol. 58. – № 10. – P. e01269-20.
159. Mamishi, S. Antimicrobial resistance and genotyping of bacteria isolated from urinary tract infection in children in an Iranian referral hospital / S. Mamishi, Z. Shalchi, S. Mahmoudi [et al.] // Infect Drug Resist. – 2020. – Vol. 13. – P. 3317.
160. Manges, A.R. Reservoirs of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* / A.R. Manges, J.R. Johnson // Microbiol Spectr. – 2015. – Vol. 3. – № 5. – P. 1-12.
161. Manges, A.R. Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) lineages / A.R. Manges, H.M. Geum, A. Guo [et al.] // Clin Microbiol Rev. – 2019. – Vol. 32. – № 3. – P. e00135-18.
162. Manohar, P. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model / P. Manohar, R. Nachimuthu, B.S. Lopes // BMC Microbiol. – 2018. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-11.

163. Marrs, C.F. Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli* / C.F. Marrs, L. Zhang, P. Tallman [et al.] // J Med Microbiol. – 2002. – Vol. 51. – № 2. – P. 138-142.
164. Massip, C. Siderophore-microcins in *Escherichia coli*: determinants of digestive colonization, the first step toward virulence / C. Massip, E. Oswald // Front Cell Infect Microbiol. – 2020. – Vol. 10. – P. 381.
165. Matsukawa, M. Epidemiology and genotypic characterisation of dissemination patterns of uropathogenic *Escherichia coli* in a community / M. Matsukawa, M. Igarashi, H. Watanabe [et al.] // Epidemiol Infect. – 2019. – Vol. 147.
166. Mc Carlie, S. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance / S. Mc Carlie, C. E. Boucher, R.R. Bragg // Drug Resist Updat. – 2020. – Vol. 48. – P. 100672.
167. McKinnon, J. Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* ST58 causing urosepsis / J. McKinnon, P.R. Chowdhury, S.P. Djordjevic // Int J Antimicrob Agents. – 2018. – Vol. 52. – № 3. – P. 430-435.
168. Medina, M. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections / M. Medina, E. Castillo-Pino // Ther Adv Urol. – 2019. – Vol. 11. – P. 1756287219832172.
169. Mendes Moreira, A. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? / A. Mendes Moreira, E. Couvé-Deacon, P. Bousquet [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2019. – Vol. 74. – № 6. – P. 1560-1562.
170. Mika, F. Small RNAs in the control of RpoS, CsgD, and biofilm architecture of *Escherichia coli* / F. Mika, R. Hengge // RNA biology. – 2014. – Vol. 11. – № 5. – P. 494-507.
171. Momtaz, H. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties / H. Momtaz, A. Karimian, M. Madani [et al.] // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2013. – Vol. 12. – № 1. – P. 1-12.
172. Morgan, R.N. Prevalence and pathologic effects of colibactin and cytotoxic necrotizing factor-1 (Cnf 1) in *Escherichia coli*: experimental and bioinformatics analyses / R.N. Morgan, S.E. Saleh, H.A. Farrag, M.M. Aboulwafa // Gut Pathog. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-18.
173. Morrissey, I. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms / I. Morrissey, M.R. Oggioni, D. Knight [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. e86669.

174. Munkhdelger, Y. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia / Y. Munkhdelger, N. Gunregjav, A. Dorjpurev [et al.] // J Infect Dev Ctries. – 2017. – Vol. 11. – № 01. – P. 51-57.
175. Naziri, Z. Treatment failure in urinary tract infections: a warning witness for virulent multi-drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* / Z. Naziri, A. Derakhshandeh, A. Soltani Borchaloe [et al.] // Infect Drug Resist. – 2020. – Vol. 13. – P. 1839.
176. Nesse, L.L. Biofilm forming properties of quinolone resistant *Escherichia coli* from the broiler production chain and their dynamics in mixed biofilms / L.L. Nesse, A.M. Osland, S.S. Mo [et al.] // BMC Microbiol. – 2020. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-10.
177. Nielsen, T.K. A porcine model for urinary tract infection / T.K. Nielsen, N.A. Petersen, K. Stærk [et al.] // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 2564.
178. Nielubowicz, G.R. Host-pathogen interactions in urinary tract infection / G.R. Nielubowicz, H.L.T. Mobley // Nat Rev Urol. – 2010. – Vol. 7. – № 8. – P. 430-441.
179. Noie Oskouie, A. A relationship between O-serotype, antibiotic susceptibility and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli* / A. Noie Oskouie, A. Hasani, M. Ahangarzadeh Rezaee [et al.] // Microb Drug Resist. – 2019. – Vol. 25. – № 6. – P. 951-958.
180. Nüesch-Inderbinen, M.T. Clonal diversity, virulence potential and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* causing community acquired urinary tract infection in Switzerland / M.T. Nüesch-Inderbinen, M. Baschera, K. Zurfluh [et al.] // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 2334.
181. Ny, S. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from outpatient urinary tract infections in women in six European countries including Russia / S. Ny, P. Edquist, U. Dumpis [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2019. – Vol. 17. – P. 25-34.
182. Ochoa, S.A. Multidrug-and extensively drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains: phylogenetic groups widely associated with integrons maintain high genetic diversity / S.A. Ochoa, A. Cruz-Córdova, V.M. Luna-Pineda [et al.] // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 2042.
183. Ojer-Usoz, E. Clonal diversity of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from environmental, human and food samples / E. Ojer-Usoz, D. González, A.I. Vitas // Int J Environ Res Public Health. – 2017. – Vol. 14. – № 7. – P. 676.

184. Oliveira-Pinto, C. Occurrence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* from healthy individuals and those with urinary infection / C. Oliveira-Pinto, C. Diamantino, P.L. Oliveira [et al.] // J Med Microbiol. – 2017. – Vol. 66. – № 5. – P. 577-583.
185. Olorunmola, F.O. Antibiotic resistance and virulence properties in *Escherichia coli* strains from cases of urinary tract infections / F.O. Olorunmola, D.O. Kolawole, A. Lamikanra // Afr J Infect Dis. – 2013. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-7.
186. Olsen, R.J. Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae) / R.J. Olsen, M.E. Watkins, C.C. Cantu [et al.] // Virulence. – 2011. – Vol. 2. – № 2. – P. 111-119.
187. Ong, C.L.Y. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species / C.L.Y. Ong, S.A. Beatson, M. Totsika [et al.] // BMC Microbiol. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 1-12.
188. O'Toole, G.A. Microtiter dish biofilm formation assay / G.A. O'Toole // J Vis Exp. – 2011. – № 47. – P. e2437.
189. Paniagua-Contreras G.L., Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico / G.L. Paniagua-Contreras, E. Monroy-Pérez, J.R. Rodríguez-Moctezuma [et al.] // J Microbiol Immunol Infect. – 2017. – Vol. 50. – № 4. – P. 478-485.
190. Paniagua-Contreras, G.L. Multiple antibiotic resistances and virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* from Mexico / G.L. Paniagua-Contreras, E. Monroy-Pérez, A. Bautista [et al.] // Pathog Glob Health. – 2018. – Vol. 112. – № 8. – P. 415-420.
191. Partridge, S.R. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance / S.R. Partridge, S.M. Kwong, N. Firth, S.O. Jensen // Clin Microbiol Rev. – 2018. – Vol. 31. – № 4. – P. e00088-17.
192. Paskeh, M.D.A. Prevalence of plasmid-encoded carbapenemases in multi-drug resistant *Escherichia coli* from patients with urinary tract infection in northern Iran / M.D.A. Paskeh, M.J.M. Moghaddam, Z. Salehi // Iran J Basic Med Sci. – 2020. – Vol. 23. – № 5. – P. 586.
193. Phan, G. Crystal structure of the FimD usher bound to its cognate FimC-FimH substrate / G. Phan, H. Remaut, T. Wang, W.J. Allen [et al.] // Nature. – 2011. – Vol. 474. – № 7349. – P. 49-53.

194. Phan, M.D. Uncovering novel susceptibility targets to enhance the efficacy of third-generation cephalosporins against ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* / M.D. Phan, A.L. Bottomley, K.M. Peters [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2020. – Vol. 75. – № 6. – P. 1415-1423.
195. Piatek, M. *Galleria mellonella*: the versatile host for drug discovery, *in vivo* toxicity testing and characterising host-pathogen interactions / M. Piatek, G. Sheehan, K. Kavanagh // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10. – № 12. – P. 1545.
196. Pitout, J.D. Virulence factors of *Escherichia coli* isolates that produce CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases / J.D. Pitout, K.B. Laupland, D.L. Church [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2005. – Vol. 49. – № 11. – P. 4667-4670.
197. Platell, J.L. Prominence of an O75 clonal group (clonal complex 14) among non-ST131 fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* causing extraintestinal infections in humans and dogs in Australia / J.L. Platell, D.J. Trott, J.R. Johnson [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2012. – Vol. 56. – № 7. – P. 3898-3904.
198. Prakapaite, R. Molecular characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals emergence of drug resistant O15, O22 and O25 serogroups / R. Prakapaite, F. Saab, R. Planciuniene [et al.] // Medicina. – 2019. – Vol. 55. – № 11. – P. 733.
199. Puorger, C. Structure, folding and stability of FimA, the main structural subunit of type 1 pili from uropathogenic *Escherichia coli* strains / C. Puorger, M. Vetsch, G. Wider, R. Glockshuber // J Mol Biol. – 2011. – Vol. 412. – № 3. – P. 520-535.
200. Rafalskiy, V. Distribution and antibiotic resistance profile of key Gram-negative bacteria that cause community-onset urinary tract infections in the Russian Federation: RESOURCE multicentre surveillance 2017 study / V. Rafalskiy, D. Pushkar, S. Yakovlev [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2020. – Vol. 21. – P. 188-194.
201. Rahdar, M. Detection of *pap*, *sfa*, *afa*, *foc*, and *fim* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* isolates collected from patients with urinary tract infection / M. Rahdar, A. Rashki, H.R. Miri, M. Rashki Ghalehnoo // Jundishapur J Microbiol. – 2015. – Vol. 8. – № 8.
202. Raphel, J. Multifunctional coatings to simultaneously promote osseointegration and prevent infection of orthopaedic implants / J. Raphel, M. Holodniy, S.B. Goodman, S.C. Heilshorn // Biomaterials. – 2016. – Vol. 84. – P. 301-314.

203. Reid, G. Oral fluoroquinolone therapy results in drug adsorption on ureteral stents and prevention of biofilm formation / G. Reid, M. Habash, D. Vachon [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2001. – Vol. 17. – № 4. – P. 317-320.
204. Reid, C.J. Australian porcine clonal complex 10 (CC10) *Escherichia coli* belong to multiple sublineages of a highly diverse global CC10 phylogeny / C.J. Reid, M.Z. DeMaere, S.P. Djordjevic // *Microb Genom*. – 2019. – Vol. 5. – № 3
205. Reid, C.J. Whole genome sequencing of *Escherichia coli* from store-bought produce / C.J. Reid, K. Blau, S. Jechalke [et al.] // *Front Microbiol*. – 2020. – Vol. 10. – P. 3050.
206. Ribić, R. Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli* / R. Ribić, T. Meštrović, M. Neuberg, G. Kozina [et al.] // *Acta Pharmaceutica*. – 2018. – Vol. 68. – № 1. – P. 1-18.
207. Rihtar, E. The uropathogenic specific protein gene *usp* from *Escherichia coli* and *Salmonella bongori* is a novel member of the TyrR and H-NS regulons / E. Rihtar, D. Žgur Bertok, Z. Podlesek // *Microorganisms*. – 2020. – Vol. 8. – № 3. – P. 330.
208. Riley, L.W. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli* / L.W. Riley // *Microbiol Spectr*. – 2020. – Vol. 8. – № 4.
209. Riley, L.W. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* / L.W. Riley // *Clin Microbiol Infect*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 380-390.
210. Roche-Lima, A. The presence of genotoxic and/or pro-inflammatory bacterial genes in gut metagenomic databases and their possible link with inflammatory bowel diseases / A. Roche-Lima, K. Carrasquillo-Carrión, R. Gómez-Moreno [et al.] // *Front Genet*. – 2018. – Vol. 9. – P. 116.
211. Rodrigues, L.B. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse / L.B. Rodrigues, L.R. Dos Santos, V.Z. Tagliari [et al.] // *Braz J Microbiol*. – 2010. – Vol. 41. – P. 1082-1085.
212. Rosello, A. Seasonality of urinary tract infections in the United Kingdom in different age groups: longitudinal analysis of The Health Improvement Network (THIN) / A. Rosello, K.B. Pouwels, M.D. de Cellès [et al.] // *Epidemiol Infect*. – 2018. – Vol. 146. – № 1. – P. 37-45.

213. Santo, E. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil / E. Santo, C. Macedo, J.M. Marin // Rev Inst Med Trop Sao Paulo. – 2006. – Vol. 48. – P. 185-188.
214. Sarkar, S. Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli* / S. Sarkar, G.C. Ulett, M. Totsika [et al.] // PloS One. – 2014. – Vol. 9. – № 4. – P. e94786.
215. Sarowska, J. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports / J. Sarowska, B. Futoma-Koloch, A. Jama-Kmiecik [et al.] // Gut Pathog. – 2019. – Vol. 11. – № 1. – P. 1-16.
216. Schifano, E. Virulence behavior of uropathogenic *Escherichia coli* strains in the host model *Caenorhabditis elegans* / E. Schifano, M. Marazzato, M.G. Ammendolia [et al.] // Microbiologyopen. – 2019. – Vol. 8. – № 6. – P. e00756.
217. Schreiber, H.L. 4th. Bacterial virulence phenotypes of *Escherichia coli* and host susceptibility determine risk for urinary tract infections / H.L. 4th Schreiber, M.S. Conover, W.C. Chou [et al.] // Sci Transl Med. – 2017. – Vol. 9. – № 382. – P. eaaf1283.
218. Shan, Y. ATP-dependent persister formation in *Escherichia coli* / Y. Shan, A. Brown Gandt, S.E. Rowe [et al.] // MBio. – 2017. – Vol. 8. – № 1. – P. e02267-16.
219. Sharma, G. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies / G. Sharma, S. Sharma, P. Sharma [et al.] // J Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 121. – № 2. – P. 309-319.
220. Sheikh, A.F. Virulence-associated genes and drug susceptibility patterns of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection / A.F. Sheikh, H. Goodarzi, M.J. Yadyad [et al.] // Infect Drug Resist. – 2019. – Vol. 12. – P. 2039.
221. Sheldon, I.M. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice / I.M. Sheldon, A.N. Rycroft, B. Dogan [et al.] // PloS One. – 2010. – Vol. 5. – № 2. – P. e9192.
222. Shetty, A.V. Prevalence of adhesive genes among uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infection in Mangalore / A.V. Shetty, S.H. Kumar, M. Shekar [et al.] // Indian J Med Microbiol. – 2014. – Vol. 32. – № 2. – P. 175-178.

223. Shon, AS. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P. Bajwa, T.A. Russo // *Virulence*. – 2013. – Vol. 4 – No 2. – P. 107-118.
224. Shpigel, N.Y. Mammary pathogenic *Escherichia coli* / N.Y. Shpigel, S. Elazar, I. Rosenshine // *Curr Opin Microbiol*. – 2008. – Vol. 11. – № 1. – P. 60-65.
225. Shrestha, R. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing uropathogenic *Escherichia coli* and the correlation of biofilm with antibiotics resistance in Nepal / R. Shrestha, S. Khanal, P. Poudel [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 1-6.
226. Shtansky, D.V. Recent progress in the field of multicomponent bioactive nanostructured films / D.V. Shtansky, E.A. Levashov, I.V. Batenina [et al.] // *RSC advances*. – 2013. – Vol. 3. – № 28. – P. 11107-11115.
227. Siegfried, L. Virulence-associated factors in *Escherichia coli* strains isolated from children with urinary tract infections / L. Siegfried, M. Kmetová, H. Puzová [et al.] // *J Med Microbiol*. – 1994. – Vol. 41. – № 2. – P. 127-132.
228. Silva, N.B.S. Diagnosis of biofilm infections: Current methods used, challenges and perspectives for the future / N.B.S. Silva, L.A. Marques, D.D.B. Röder // *J Appl Microbiol*. – 2021. – Vol. 131. – № 5. – P. 2148-2160.
229. Silveira, W.D.D. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains / W.D.D. Silveira, F. Benetti, M. Lancellotti [et al.] // *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. – 2001. – Vol. 43. – P. 303-310.
230. Simmering, J.E. Warmer weather as a risk factor for hospitalisations due to urinary tract infections / J.E. Simmering, J.E. Cavanaugh, L.A. Polgreen, P.M. Polgreen // *Epidemiol Infect*. – 2018. – Vol. 146. – № 3. – P. 386-393.
231. Song, N. Plasmid parB contributes to uropathogenic *Escherichia coli* colonization in vivo by acting on biofilm formation and global gene regulation / N. Song, H. De Greve, Q. Wang [et al.] // *Front Mol Biosci*. – 2022. – Vol. 9. – P. 1053888
232. Spurbeck, R.R. *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract / R.R. Spurbeck, P.C. Jr Dinh, S.T. Walk [et al.] // *Infect Immun*. – 2012. – Vol. 80. – № 12. – P. 4115-4122.
233. Stamm, W.E. Urinary tract infections: disease panorama and challenges / W.E. Stamm, S.R. Norrby // *J Infect Dis*. – 2001. – Vol. 183. – № Supplement\_1. – P. S1-S4.

234. Stegger, M. A snapshot of diversity: intraclonal variation of *Escherichia coli* clones as commensals and pathogens / M. Stegger, R.F. Leihof, S. Baig [et al.] // Int J Med Microbiol. – 2020. – Vol. 310. – № 3. – P. 151401.
235. Strelkova, E.A. Stimulation of Biofilm Formation by Antibiotics / E.A. Strelkova, M.V. Zhurina, V.K. Plakunov, S.S. Belyaev // Microbiology. – 2012. – Vol. 81. – № 2. – P. 259-262
236. Sukhorukova, I.V. Two approaches to form antibacterial surface: Doping with bactericidal element and drug loading / I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, Ph.V. Kiryukhantsev-Korneev [et al.] // Appl Surf Sci. – 2015. – Vol. 330. – P. 339-350.
237. Sukhorukova, I.V. Approaches for controlled Ag<sup>+</sup> ion release: influence of surface topography, roughness, and bactericide content / I.V. Sukhorukova, A.N. Sheveyko, N.V. Shvindina [et al.] // ACS Appl Mater Interfaces. – 2017. – Vol. 9. – № 4. – P. 4259-4271.
238. Sun, D.H. Investigation of antibiotic resistance determinants and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* / D.H. Sun, D.F. Lv, Z.H. Mi [et al.] // J Antibiot. – 2020. – Vol. 73. – № 5. – P. 314-319.
239. Tagini, F. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review / F. Tagini, G. Greub // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2017. – Vol. 36. – № 11. – P. 2007-2020
240. Tatusova, T. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline / T. Tatusova, M. DiCuccio, A. Badretdin [et al.] // Nucleic Acids Res. – 2016. – Vol. 44. – № 14. – P. 6614-6624.
241. Terlizzi, M.E. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies / M.E. Terlizzi, G. Gribaudo, M.E. Maffei // Front Microbiol. – 2017. – Vol. 8. – P. 1566.
242. Tewari, R. Dissemination and characterisation of *Escherichia coli* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, AmpC  $\beta$ -lactamases and metallo- $\beta$ -lactamases from livestock and poultry in Northeast India: a molecular surveillance approach / R. Tewari, S. Mitra, F. Ganaie, [et al.] // J Glob Antimicrob Resist. – 2019. – Vol. 17. – P. 209-215.
243. Tian, E. Tentative epidemiologic *cut-off* value and resistant characteristic detection of apramycin against *Escherichia coli* from chickens / E. Tian, I. Muhammad, W. Hu [et al.] // FEMS Microbiol Lett. – 2019. – Vol. 366. – № 16. – P. fnz196.

244. Tsai, C.J. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing / C.J. Tsai, J.M. Loh, T. Proft // *Virulence*. – 2016. – Vol. 7. – № 3. – P. 214-229.
245. Ulett, G.C. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation / G.C. Ulett, A.N. Mabbett, K.C. Fung [et al.] // *Microbiology*. – 2007. – Vol. 153. – № 7. – P. 2321-2331.
246. Uosaki, K. Highly efficient electrochemical hydrogen evolution reaction at insulating boron nitride nanosheet on inert gold substrate / K. Uosaki, G. Elumalai, H.C. Dinh [et al.] // *Sci Rep*. – 2016. – Vol. 6. – № 1. – P. 1-6.
247. Vaidya, M.Y. Antimicrobial efficacy and synergy of metal ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in planktonic and biofilm phenotypes / M.Y. Vaidya, A.J. McBain, J.A. Butler [et al.] // *Sci Rep*. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-9.
248. Valle, J. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli* / J. Valle, A.N. Mabbett, G.C. Ulett [et al.] // *J Bacteriol*. – 2008. – Vol. 190. – № 12. – P. 4147-4161.
249. Vila, J. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings / J. Vila, E. Sáez-López, J.R. Johnson [et al.] // *FEMS Microbiol Rev*. – 2016. – Vol. 40. – № 4. – P. 437-463.
250. Volkan, E. Molecular basis of usher pore gating in *Escherichia coli* pilus biogenesis / E. Volkan, V. Kalas, J.S. Pinkner, K.W. Dodson [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2013. – Vol. 110. – № 51. – P. 20741-20746.
251. Werneburg, G.T. Pili assembled by the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella* / G.T. Werneburg, D.G. Thanassi // *EcoSal Plus*. – 2018. – Vol. 8. – № 1.
252. Whitfield, C. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli* / C. Whitfield, I.S. Roberts // *Mol Microbiol*. – 1999. – Vol. 31. – № 5. – P. 1307-1319.
253. Wirth, T. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective / T. Wirth, D. Falush, R. Lan [et al.] // *Mol Microbiol*. – 2006. – Vol. 60. – № 5. – P. 1136-1151.
254. Wright, K.J. Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract / K.J. Wright, S.J. Hultgren // *Future Microbiol*. – 2006. – Vol. 1. – № 1. – P. 75-87.
255. Wurpel, D.J. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli* / D.J. Wurpel, S.A. Beatson, M. Totsika [et al.] // *PloS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 1. – P. e52835.

256. Yahiaoui, M. Antibiotic resistance, virulence, and genetic background of community-acquired uropathogenic *Escherichia coli* from Algeria / M. Yahiaoui, F. Robin, R. Bakour [et al.] // *Microb Drug Resist.* – 2015. – Vol. 21. – № 5. – P. 516-526.
257. Yamaji, R. A population-based surveillance study of shared genotypes of *Escherichia coli* isolates from retail meat and suspected cases of urinary tract infections / R. Yamaji, C.R. Friedman, J. Rubin [et al.] // *Msphere.* – 2018. – Vol. 3. – № 4. – P. e00179-18.
258. Yoo, H.S. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery / H.S. Yoo, T.G. Kim, T.G. Park // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2009. – Vol. 61. – № 12. – P. 1033-1042.
259. Yu, H. Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from different hospitals in China / H. Yu, F. Qu, B. Shan [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – № 8. – P. 5033-5035.
260. Yun, K.W. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children / K.W. Yun, H.Y. Kim, H.K. Park [et al.] // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2014. – Vol. 47. – № 6. – P. 455-461.
261. Zalewska-Piątek, B.M. Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains-Review / B.M. Zalewska-Piątek, R.J. Piątek // *Acta Biochim Pol.* – 2019. – Vol. 66. – № 2. – P. 129-138.
262. Zamani, H. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes / H. Zamani, A. Salehzadeh // *Turk J Med Sci.* – 2018. – Vol. 48. – № 1. – P. 162-167.
263. Zangane Matin, F. Virulence characterization and clonal analysis of uropathogenic *Escherichia coli* metallo-beta-lactamase-producing isolates / F. Zangane Matin, S.E. Rezatofghi, M. Roayaei Ardakani [et al.] // *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 1-13.
264. Zankari, E. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens / E. Zankari, R. Allesøe, K.G. Joensen [et al.] // *J Antimicrob Chemother.* – 2017. – Vol. 72. – № 10. – P. 2764-2768.
265. Zavala-Cerna, M.G. The clinical significance of high antimicrobial resistance in community-acquired urinary tract infections / M.G. Zavala-Cerna, M. Segura-Cobos, R. Gonzalez [et al.] // *Can J Infect Dis Med Microbiol.* – 2020. – Vol. 2020.

266. Zheng, Y.F. Introduction of antibacterial function into biomedical TiNi shape memory alloy by the addition of element Ag / Y.F. Zheng, B.B. Zhang, B.L. Wang [et al.] // *Acta Biomater.* – 2011. – Vol. 7. – № 6. – P. 2758-2767.
267. Zhong, Z.X. Nitrofurantoin combined with amikacin: a promising alternative strategy for combating MDR uropathogenic *Escherichia coli* / Z.X. Zhong, Z.H. Cui, X.J. Li [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2020. – Vol. 10. – P. 608547.
268. Zhou, Y. PHAST: a fast phage search tool / Y. Zhou, Y. Liang, K.H. Lynch [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – № 39. – W347-W352.
269. Zimmer, M. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens / M. Zimmer, H. Barnhart, U. Idris, M.D. Lee [et al.] // *Avian Dis.* – 2003. – Vol. 47. – № 1. – P. 101-107.
270. Żyła, D.S. Alternative folding to a monomer or homopolymer is a common feature of the type 1 pilus subunit FimA from enteroinvasive bacteria / D.S. Żyła, A.E. Prota, G. Capitani, R. Glockshuber // *J Biol Chem.* – 2019. – Vol. 294. – № 27. – P. 10553-10563.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

**Статьи, опубликованные в реферируемых научных журналах**

1. 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, Impact Factor 6,551; цитируемость РИНЦ 23)
2. 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, Impact Factor 8,758; цитируемость РИНЦ 12)
3. **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, Impact Factor 2,649; цитируемость РИНЦ 1)
4. **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.] // *ЖМЭИ*. – 2021. – № 6. – С. 671-684. (SCOPUS, ВАК, Q4, Impact Factor 0,324; цитируемость РИНЦ 2)
5. 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, Impact Factor 1,32; цитируемость РИНЦ 9)

**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. и вакцинопроф. – 2018. – Т. 17. – № 6 (103). – С. 11-18.

2. **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.] // Бактериол. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 26-32.

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

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

5. **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.

#### **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 // Бактериол. – 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.] // Молек. 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.] // Бактериол. – 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. и 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 ВЕU 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.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

Свидетельство о регистрации базы данных «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ		<b>RU 2017621413</b>
		
<b>ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ</b>		
<b>ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ</b>		
Номер регистрации (свидетельства): 2017621413  Дата регистрации: 01.12.2017  Номер и дата поступления заявки: 2017621156 18.10.2017  Дата публикации: 01.12.2017  Контактные реквизиты: нет	Авторы: Слукин Павел Владимирович (RU), Лев Анастасия Игоревна (RU), Асташкин Евгений Ильич (RU), Фурсова Надежда Константиновна (RU)  Правообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (RU)	
Название базы данных: <b>Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности</b>		
Реферат: База данных (БД) содержит информацию о 878 госпитальных штаммах, принадлежащих к 23 видам, выделенных в больницах города Москвы в 2004-2016 гг. БД включает 7 форм, 22 запроса и 17 таблиц, из них 4 основных таблицы (три таблицы состоят из 878, 2824 и 17700 строк, одна из 35000 ячеек). БД позволяет осуществить нахождение и обработку информации о госпитальных штаммах, их антибиотикорезистивности, содержании генов вирулентности и резистентности, а также систематизировать имеющиеся данные по генотипам вирулентности, резистентности и сиквенса-типам.		
Тип реализующей ЭВМ:	IBM PC-совмест. ПК	
Вид и версия системы управления базой данных:	Access 2007 и выше	
Вид и версия операционной системы:	Windows 7 и выше	
Объем базы данных:	9,37 Мб	

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Свидетельство о регистрации базы данных «Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ  ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ <b>ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ          АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ</b>		<b>RU2021621432</b>
Номер регистрации (свидетельства): 2021621432 Дата регистрации: 01.07.2021 Номер и дата поступления заявки: 2021621323 25.06.2021 Дата публикации и номер бюллетеня: 01.07.2021 Бюл. № 7 Контактные реквизиты: Говорунов Игорь Геннадиевич, тел. (4967)360046, govorunov@obolensk.org	Автор(ы): Слукин Павел Владимирович (RU), Колупаева Любовь Вячеславовна (RU), Слукина Надежда Анатольевна (RU), Фурсова Надежда Константиновна (RU) Правообладатель(и): Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) (RU)	
Название базы данных: «Генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности уропатогенных <i>Escherichia coli</i> , выделенных в Российской Федерации в 2005-2020 гг.»		
Реферат: База данных (БД) предназначена для систематизации, учета, хранения, презентации и анализа клинической, эпидемиологической, микробиологической и молекулярно-генетической информации о штаммах уропатогенных <i>E. coli</i> . БД включает данные о 303 штаммах уропатогенных <i>E. coli</i> : эпидемиологические данные штамма (место и время выделения, диагноз), набор антибиотиков, к которым штамм устойчив (по классам антибиотиков), фенотип резистентности, гены антибиотикоустойчивости, серогруппа, филогруппа, сиквенс-тип, выявленные плазмиды, острова патогенности, гены вирулентности (по локализации), а также номер в ЖПМ-Оболensk и GenBank. БД включает 1 таблицу уникальной информации, 19 дополнительных таблиц справочной информации, 18 запросов, 1 информационная форма и 1 поисковая форма. БД предназначена для врачей-клиницистов, микробиологов и эпидемиологов, являясь дополнительным программным инструментом для фундаментальных и прикладных работ в области эпидемиологических, микробиологических и молекулярно-генетических исследований уропатогенных <i>E. coli</i> . Тип ЭВМ: IBM PC-совмест. ПК; ОС: Windows XP и выше.		
Вид и версия системы управления базой данных:	MS Access 2013 и выше	
Объем базы данных:	12,8 МБ	

## ПРИЛОЖЕНИЕ В

Свидетельство о регистрации базы данных «CRISPR-CAS системы бактерий III-IV групп патогенности»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ  ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ <b>ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ          АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ</b>		<b>RU2021621482</b>
Номер регистрации (свидетельства): 2021621482 Дата регистрации: 07.07.2021 Номер и дата поступления заявки: 2021621321 25.06.2021 Дата публикации и номер бюллетеня: 07.07.2021 Бюл. № 7 Контактные реквизиты: Говорунов Игорь Геннадиевич, (4967)360046, govorunov@obolensk.org	Автор(ы): Слукин Павел Владимирович (RU), Детушева Елена Владимировна (RU), Кузина Екатерина Сергеевна (RU), Скрябин Юрий Павлович (RU), Абаев Игорь Валентинович (RU), Фурсова Надежда Константиновна (RU) Правообладатель(и): Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) (RU)	
Название базы данных: «CRISPR-Cas системы бактерий III-IV групп патогенности»		
Реферат: База данных (БД) предназначена для систематизации, учета, хранения, презентации и анализа молекулярно-генетической информации о CRISPR-Cas системах штаммов бактерий III-IV групп патогенности. БД включает данные о 215 штаммах (19 <i>Escherichia coli</i> , 40 <i>Acinetobacter baumannii</i> , 90 <i>Klebsiella pneumoniae</i> , 19 <i>Listeria monocytogenes</i> , 42 <i>Staphylococcus aureus</i> , 1 <i>Staphylococcus argenteus</i> ): эпидемиологические данные штамма (место и время выделения, источник выделения), сиквентс-тип, CRISPR-система (последовательность DR, число и последовательность спейсеров, CAS-тип, гены Cas-белков), а также номер в ГКПМ-Оболensk и GenBank. БД включает форму ввода и отображения информации. Вся информация о штаммах содержится в основной таблице из 3010 ячеек. Подобная структура позволяет иметь максимальный объем базы данных при минимальном занимаемом дисковом пространстве. БД предназначена для микробиологов и эпидемиологов, являясь дополнительным программным инструментом для фундаментальных и прикладных работ в области молекулярно-генетических исследований. Тип ЭВМ: IBM PC-совмест. ПК; ОС: Windows XP и выше.		
Вид и версия системы управления базой данных:	Access 2013 и выше	
Объем базы данных:	2,96 МБ	

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Методические рекомендации «Оценка вирулентности бактерий III-IV групп патогенности на модели личинок большой восковой моли *Galleria mellonella*»

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Федеральное государственное учреждение науки

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПРИКЛАДНОЙ  
МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

(ФБУН ГНЦ ПМБ)

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН ГНЦ ПМБ  
акад. РАН, д-р мед. наук, проф.

И. А. Дятлов

«10» 09 2020 г.

ОЦЕНКА ВИРУЛЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ III-IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ НА МОДЕЛИ  
ЛИЧИНОК БОЛЬШОЙ ВОСКОВОЙ МОЛИ *GALLERIA MELLONELLA*

(Методические рекомендации)

Рассмотрено и одобрено Ученым  
советом ФБУН ГНЦ ПМБ

(протокол Ученого совета № 4

от «10» 09 2020 г.)

Оболensk 2020

## Продолжение Приложения Г

## АННОТАЦИЯ

В настоящих методических рекомендациях описан алгоритм оценки вирулентности на модели личинок *G. mellonella*.

Методические рекомендации предназначены для специалистов, изучающих эпидемиологические и микробиологические особенности бактерий III-IV групп патогенности.

Работа выполнена в рамках Федеральной НИР 049 Роспотребнадзора (2016-2020 гг.).

## РАЗРАБОТАНО:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

## АВТОРЫ:

Науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии

П.В. Слукин

Ведущий науч. сотр. лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии, канд. биол. наук

Н.К. Фурсова

Науч. сотр. отдела дезинфектологии

Е.М. Асланян

Главный науч. сотр. отдела дезинфектологии доктор биол. наук

В.Н. Герасимов

Лаб.-исслед. лаборатории антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии

Н.А. Слукина

Лаб.-исслед. отдела дезинфектологии

А.И. Тырышкина

## СОГЛАСОВАНО:

Ведущий науч. сотр. лаборатории биологической безопасности, канд. мед. наук

Е.А. Тюрин

## РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Ведущий науч. сотр. лаборатории биологических испытаний, канд. мед. наук

А.И. Борзилов

Ведущий науч. сотр. лаборатории микробиологии чумы, канд. биол. наук

С.А. Иванов

## ПРИЛОЖЕНИЕ Д

## Перечень праймеров, использованных в работе

Ген	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Источник
1	2	3	4
<i>факторы вирулентности UPEC</i>			
<i>fimH</i>	FimH f	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG	[119]
	FimH r	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	
<i>papGI</i>	papGI 1	CAACCTGCTCTCAATCTTTACTG	
	papGI 2	CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	
<i>papGII</i>	papGII 1	GGAATGTGGTGATTACTCAAAGG	
	papGII 2	TCCAGAGACTGTTCAAGAAGGAC	
<i>papGIII</i>	PG1	CATGGCTGGTTGTTCTAAACAT	
	PG2	TCCAGAGACTGTGCAGAAGGAC	
<i>sfaS</i>	SfaS f	GTGGATACGACGATTACTGTG	
	SfaS r	CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	
<i>focG</i>	FocG f	CAGCACAGGCAGTGGATACGA	
	FocG r	GAATGTGCGCTGCCATTGTC	
<i>afa/draBC</i>	Afa f	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC	
	Afa r	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	
<i>hlyA</i>	hly f	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT	
	hly r	ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	
<i>cnf1</i>	cnf1	AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG	
	cnf2	TGGAGTTTCTATGCAGGAG	
<i>iroN</i>	IRONEC-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG	
	IRONEC-R	GACGCCGACATTAAGACGCAG	
<i>fyuA</i>	FyuA f	TGATTAACCCCGCGACGGGAA	
	FyuA r	CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	
<i>iutA</i>	AerJ f	GGCTGGACATCATGGGAAGTGG	
	AerJ r	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	
<i>ompT</i>	ompT-F	ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC	
	ompT-R	CCCGGGTCATAGTGTTCATC	
<i>traT</i>	TraT f	GGTGTGGTGCGATGAGCACAG	
	TraT r	CACGGTTCAGCCATCCCTGAG	
<i>kpsMTII</i>	kpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	
	kpsII r	CATCAGACGATAAGCATGAGCA	
<i>kpsMTIII</i>	KpsIII f	TCCTCTTGCTATTATTCCCCCT	
	KpsIII r	AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC	
<i>usp</i>	usp-F	ACATTCACGGCAAGCCTCAG	
	usp-R	AGCGAGTTCCTGGTGAAAGC	
<i>yfcV</i>	yfcV F	ACATGGAGACCACGTTTACC	
	yfcV R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	
<i>vat</i>	vat F	TCAGGACACGTTTCAAGCATTAGT	
	vat R	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGT	
<i>chuA</i>	chuA F	CTGAAACCATGACCGTTTACG	
	chuA R	TTGTAGTAACGCACTAAACC	
<i>факторы антибиотикорезистентности</i>			
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM dir	ATGAGTATTCAACATTTCCG	[20]
	TEM rev	CTGACAGTTACCAATGCTTA	
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F	ATGCGTTATATTCGCTGTG	
	SHV-R	TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CTX-M-Fext	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA	
	CTX-M-R1	CTCCGCTGCCGGTTTTATC	
<i>yfcV</i>	yfcV F	ACATGGAGACCACGTTTACC	[232]
	yfcV R	GTAATCTGGAATGTGGTCAGG	
<i>vat</i>	vat F	TCAGGACACGTTTCAAGCATTAGT	[73]
	vat R	GGCCAGAACATTTGCTCCCTTGT	

## Продолжение Приложения Д

1	2	3	4
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	[20]
	OXA-48	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM1-F	GAAGCTGAGCACCGCATTAG	
	NDM1-R	GGGCCGTATGAGTGATTGC	
intl1	IntI1-F	GGTCAAGGATCTGGATTTTCG	
	IntI1-R	ACATGCGTGTAATCATCGTC	
intl2	IntI2-F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	
	IntI2-R	GTAGCAAACGAGTGACGAAAT	
ins1	5'CS	GGCATCCAAGCACAAGC	
	3'CS	AAGCAGACTTGACTGAT	
ins2	attI2-5	GACGGCATGCACGATTTGTA	
	orfX-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG	

## ПРИЛОЖЕНИЕ Е

## Перечень генов и оперонов, детектируемых в полных геномах

Название	Опероны (краткое название) и гены (продукты)	Номер по GenBank (расположение)
1	2	3
<i>фимбриальные адгезины</i>		
Фимбрии типа I	<i>fimABCDEFGHI (fim)</i> <i>fimBE</i> (регуляторный белок) <i>fimA</i> (основная субъединица) <i>fimI</i> (минорная субъединица) <i>fimC</i> (chaperone) <i>fimD</i> (usher) <i>fimFGH</i> (адаптерные белки и адгезин)	- X03923 (869..1949) Y10902 (2217..2784) AF286465 (704..1243) L14598 X51655 (832..3462) AJ225176 (274.. 2242)
Фимбрия типа 9 (F9)	c1931-c1936	AE014075 (1772498..1778908)
Yfc-фимбрия	<i>yfc</i>	CP015085.1 (1243313..1250325)
<i>афимбриальные фибриллярные адгезины</i>		
Курли волокна	<i>csgABCDEFG (csg)</i>	EU554557 (28..2373, 3623..4472)
<i>не фибриллярные адгезины</i>		
Адгезин FdeC	<i>fdeC</i>	NZ_JICA01000001 (73261..77514)
Адгезин Iha	<i>iha</i>	AF401752.1
<i>токсины</i>		
Цитотоксический некротизирующий фактор	<i>cnf</i>	X70670
Токсин Sat	<i>sat</i>	AF289092
Гемолизин	<i>hlyABCD (hly)</i>	M10133 (796..8040)
Токсин Pic	<i>pic</i>	NZ_JSOW01000041 (283862..287977)
Токсин Vat	<i>vat</i>	NZ_JSGK01000039 (85437..89567)
Токсин Usp	<i>usp</i>	AB027193
<i>факторы защиты от иммунной системы макроорганизма</i>		
Протеаза внешней мембраны	<i>ompT</i>	KP657558.1
Липопротеин наружной мембраны	<i>traT</i>	AY684127.1
<i>комплексы поглощения железа</i>		
Энтеробактин	<i>entABCDEFHS/fepABCDEG/fes (ent/fep/fes)</i>	GU361605 (417..20671)
Сальмохелин	<i>iroBCDEN (iro)</i>	X16664 (25805..35315)
Иерсиниабактин	<i>ybtSXQPAUTE/irp1/irp1/fyuA (ybt/irp/fyu)</i>	AM236324 (16770..45600)
Комплекс поглощения гемина	<i>chuA</i>	AF280396
Аэробактин	<i>iucABCD/iutA (iuc/iut)</i>	AY553855 (1..7964)
<i>резистентность</i>		
Бета-лактамаза СТХ-М-типа	<i>bla<sub>СТХ-М</sub></i>	GQ385309
Бета-лактамаза ТЕМ-типа	<i>bla<sub>ТЕМ</sub></i>	HM131427
Бета-лактамаза SHV-типа	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	HM125692
Бета-лактамаза ОХА-2	<i>bla<sub>ОХА-2</sub></i>	HM131429
Бета-лактамаза ОХА-10	<i>bla<sub>ОХА-10</sub></i>	XXU37105
Бета-лактамаза ОХА-1, ОХА-30	<i>bla<sub>ОХА-1</sub>, bla<sub>ОХА-30</sub></i>	GQ924769
Бета-лактамазы AmpC-типа	<i>bla<sub>МОХ-1</sub>, bla<sub>МОХ-2</sub>, bla<sub>СМУ-1</sub>, bla<sub>СМУ-8-11</sub></i>	D13304

## Продолжение Приложения Е

1	2	3
Бета-лактамазы AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>LAT-1-4</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2-7</sub> , <i>bla</i> <sub>BIL-1</sub>	X78117
Бета-лактамазы AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>DHA-1-2</sub>	Y16410
Бета-лактамаза AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>ACC</sub>	AJ133121
Бета-лактамазы AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>MIR-1</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT-1</sub>	M37839
Бета-лактамазы AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>FOX-1-5b</sub>	X77455
Бета-лактамаза AmpC-типа	<i>bla</i> <sub>OXY-5</sub>	HM131428
Аминогликозид ацетилтрансфераза	<i>aac</i>	GQ924771
Аминогликозид аденилилтрансфераза	<i>aadA1</i>	GQ924774
Аминогликозид аденилилтрансфераза	<i>aadA2</i> , <i>aadA1</i>	GU001948
Аминогликозид аденилилтрансфераза	<i>aadA5</i>	GQ896491
Аминогликозид-2"-аденилилтрансфераза	<i>aadB</i>	GQ924772
Стрептоглицин ацетилтрансфераза	<i>sat1</i>	HM043576
Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	<i>catB8</i>	HM485586
Белок эффлюксного хлорамфеникольного насоса	<i>cmlA1</i>	HM043571
Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	<i>catB3</i>	MH560965.1
Дигидрофолатредуктаза	<i>dfrA1</i>	GQ924770
Дигидрофолатредуктаза	<i>dfrA5</i>	GQ924768
Дигидрофолатредуктаза	<i>dfrA12</i>	HM043574
Дигидрофолатредуктаза	<i>dfrA17</i>	GQ896492
Эритромицин-эстераза	<i>ereA2</i>	GQ924768
Макролид фосфотрансфераза К	<i>mphA</i>	AP024688.1(32661..33566)
Макролид фосфотрансфераза 2	<i>mphR</i>	AP024688.1 (34801..35385)
Интеграза класса 1	<i>intI1</i>	HM569736
Интеграза класса 2	<i>intI2</i>	HM043575
Интеграза класса 3	<i>intI3</i>	LC331665.1
Вариабельный участок интегрона класса 1	<i>ins1</i>	GQ924772
Вариабельный участок интегрона класса 2	<i>ins2</i>	HM043577
Дигидроптероат-синтаза	<i>sul1</i>	GU187357
Транспортер хромат-иона	<i>chrA</i>	AP024688.1 (37185..38096)

## ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Характеристика последовательностей полных геномов штаммов *E. coli* (n=54) и встречаемости в них профагов и плазмид

Штамм <i>E. coli</i>	Номер в ГКПМ- Оболенск	Генетическая группа	Код доступа GenBank	ГЦ, %	Размер генома, млн. п.н.	Контиги, шт.	Гены, шт.	Пр, шт.	Пл, шт.
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
K181	B-8736	A-CC10	JAHWEB000000000	50,8	4,8	400	4886	7	2
K369	B-8734	A-CC10	JAHWEC000000000	50,9	4,8	160	4689	5	2
U184	B-9009	O106-A-ST5958	JAHWFA000000000	50,2	5,14	267	5162	14	4
U195	B-9008	O21/O9-A-ST1429	JAHWFC000000000	50,7	4,84	203	4791	12	6
U24	B-8432	O89-A-ST744	SERX000000000	51,1	4,55	130	4508	3	1
K447	B-8735	O9-A-ST46	JABUNL000000000	50,8	4,73	275	4721	7	5
K100	B-8732	O9-A-ST540	JAHWDZ000000000	50,9	4,62	554	4888	8	3
U14	B-8552	B1-ST58	SERU000000000	51,4	4,98	155	4911	6	3
U75	B-8728	B1-ST58	JABUNJ000000000	51,1	4,71	191	4597	9	1
U26	B-8768	O8-B1-ST9239	JACSYL000000000	51,5	4,91	163	4862	10	4
U152	B-8730	O91-B1-ST1196	JAHWED000000000	50,9	4,98	223	4878	3	5
U153	B-8731	O91-B1-ST1196	JABUNH000000000	50,9	4,98	236	4908	3	6
U48	B-8769	D-ST405	JAHWEY000000000	50,6	5,34	304	5291	10	5
U252	B-9013	D-ST69	JAHWFH000000000	50,8	5,07	247	4981	5	6
U275	B-9014	D-ST69	JAHWFI000000000	50,7	5,5	285	5490	8	6
K113	B-8733	O86-D-ST501	JAHWEA000000000	50,5	5,13	263	5150	9	3
U112	B-8966	E-ST1140	JAHWEN000000000	51,6	4,26	1011	4680	3	5
K261	B-8738	E-ST38	JABUNM000000000	50,6	5,4	296	5389	9	6
U202k	B-9010	E-ST405	JAHWFD000000000	50,7	5,13	252	5045	5	6
U170	B-8725	E-ST69	JABUNG000000000	51	5,24	337	5200	8	5
U235	B-9002	O15-E-ST38	JAHWFG000000000	50,5	5,38	236	5385	11	3
U191	B-9007	O17-E-ST69	JAHWFB000000000	50,7	5,15	152	5042	10	4
U149	B-8969	F-ST648	JAHWER000000000	51,9	5,2	208	5147	13	8
U10	B-8551	O11-F-ST457	SERS000000000	51,7	5	143	4900	4	3
U22	B-8553	O11-F-ST457	SERW000000000	51,6	5,02	112	4886	4	3
U19	B-8724	B2-10102	JACSYM000000000	52	4,73	236	4617	7	2
A6	B-8771	O134-B2-ST569	JAHWEU000000000	50,8	4,72	200	4668	6	3
U15	B-8431	O2-B2-ST141	SERV000000000	51,5	5,39	178	5376	10	4
U4	B-8550	O2-B2-ST141	SERR000000000	51,5	5,18	150	5102	9	0
U20	B-8737	O18-B2-ST14	JABUNK000000000	50,5	5,23	210	5175	11	2
U169	B-8973	O2/O6-B2-ST73	JAHWES000000000	50,9	5,31	189	5248	7	4
U17	B-8972	O2/O6-B2-ST73	JAHWEH000000000	51,1	5,06	152	4923	5	1
U217	B-9003	O2/O6-B2-ST73	JAHWFE000000000	50,4	5,14	133	5017	6	1
U292	B-9015	O2/O6-B2-ST73	JAHWFJ000000000	50,7	4,98	220	4871	8	0
A14	B-8773	O25-B2-ST131	JAHWEV000000000	51	4,77	1011	5319	6	3

## Продолжение Приложения Ж

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
U11	B-8957	O25-B2-ST131	JAHWEG000000000	50,9	5,15	282	5142	14	5
U12	B-8430	O25-B2-ST131	SERT000000000	51,4	5,22	140	5203	10	5
U144	B-8962	O25-B2-ST131	JAHWEQ000000000	51	4,88	984	5384	10	2
U234	B-9001	O25-B2-ST131	JAHWFF000000000	50,8	5,14	129	5049	7	6
U28	B-8433	O25-B2-ST131	SERY000000000	51,3	5,12	128	5092	9	4
U65	B-8958	O25-B2-ST131	JAHWEI000000000	51,3	4,61	1137	5237	2	4
U80	B-8959	O25-B2-ST131	JAHWEK000000000	50,9	5,05	529	5178	11	3
U84	B-8960	O25-B2-ST131	JAHWEL000000000	51	5,15	235	5148	9	3
U96	B-8961	O25-B2-ST131	JAHWEM000000000	51,1	4,76	1061	5272	6	4
U99c	B-8729	O25-B2-ST131	JABUNI000000000	51,1	5,05	289	5036	10	4
A4	B-8774	O4/O6-B2-ST127	JAHWET000000000	50,7	4,79	628	4886	5	1
U114	B-8964	O4/O6-B2-ST127	JAHWEO000000000	51	4,32	1270	4837	2	0
U115	B-8965	O4/O6-B2-ST127	JAHWEP000000000	50,5	4,87	295	4778	8	0
U66	B-8963	O4/O6-B2-ST127	JAHWEJ000000000	50,6	4,82	548	4898	5	1
K353	B-8970	O4-B2-ST12	JAHWEE000000000	50,6	5,18	204	5195	10	4
U172	B-8726	O6-B2-ST1858	JABUNF000000000	50,7	5	216	4837	8	0
U173	B-8727	O6-B2-ST1858	JABUNE000000000	50,7	5	224	4846	10	0
U	B-8772	O75-B2-CC14	JAHWEX000000000	50,6	4,92	268	4894	7	5
U183	B-9006	O75-B2-CC14	JAHWEZ000000000	50,6	5,05	116	4958	9	7

Примечание: ГКПМ-Оболенск – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур; ГЦ-состав – доля гуаниновых и цитозиновых оснований в ДНК; Пр – профаги; Пл – плазмиды