

Сулян Офелия Спартаковна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ *MSCR*-ТИПА И ДРУГИХ ЗНАЧИМЫХ
ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ЖИВОТНЫХ**

1.5.11. – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2026

Работа выполнена на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО «СПбГУВМ») Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.

Научный руководитель

Сухинин Александр Александрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» (ФГБОУ ВО «СПбГУВМ»).

Официальные оппоненты:

Криворучко Анастасия Владимировна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией механобиологии живых систем, «Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук» – филиал Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук, Пермь.

Гончаров Артемий Евгеньевич, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией микробиологического мониторинга биологических угроз отдела молекулярной микробиологии им. акад. РАН А.А. Тотоляна, Федерального научного бюджетного учреждения «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург.

Ведущая организация:

Федеральное Государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д.5).

Защита состоится «__» _____ 2026 г. в __ часов на заседании диссертационного совета 24.1.201.03 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, на базе Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук по адресу: 614081, Пермь, ул. Голева, д. 13. Факс: (342) 280 92 11. E-mail: info@iegm.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ПФИЦ УрО РАН (614013, г. Пермь, ул. Академика Королева, 3) и на сайте ПФИЦ УрО РАН (<https://permsc.ru>)

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Максимова Юлия Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема антибиотикорезистентности является одним из критических вызовов 21 века, связанная с увеличением средней продолжительности жизни населения, ростом их численности, интенсификации миграций, многократно возросшей нагрузкой на животноводческие комплексы, где активно применяются препараты, аналогичные используемым в медицине. Приобретение людьми устойчивых бактерий к тем или иным антибиотикам возможно: во-первых - при контакте с внутрибольничной средой, где устойчивость к антибактериальным препаратам является глобальной проблемой, которой уделяется внимание; во-вторых - при получении устойчивых форм бактерий, несущих маркеры генов резистентности через животноводческую продукцию. Последнее связано с тем, что животноводческие комплексы имеют ряд признаков, характерных для отделений реанимации и интенсивной терапии: высокая плотность микроорганизмов и интенсивный прессинг антимикробными препаратами, в том числе в качестве стимуляторов роста (Иванова, 2021). За счет контакта с почвенным биоценозом животноводческие комплексы могут быть местом формирования новых детерминант резистентности при мобилизации генов устойчивости свободноживущих бактерий на мобильные генетические элементы с последующей передачей клинически-значимым бактериям. В отличие от внутрибольничной среды, распространению генетических детерминант резистентности в животноводческих комплексах уделяется несравнимо меньшее внимание. Более рациональный подход соответствует концепции «Единое здоровье» (One Health EJP), при котором здоровье человека, состояние внутрибольничной среды, животноводческих комплексов и экосистем рассматривается как единая система и используется единый методический подход для их изучения.

Отрасль сельского хозяйства является одним из крупнейших потребителей антимикробных препаратов. На животноводство приходится три четверти производимых в мире объемов противомикробных средств, общих для медицины и ветеринарии. В США на эти цели уходит 80% потребляемых в стране антибиотиков (Questions and Answers: Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed for Use in Food-Producing Animals | FDA). Мониторинг использования антимикробных препаратов в российском животноводстве затруднен из-за отсутствия публичной национальной статистики, доступной в США и странах ЕС. О масштабах проблемы позволяют судить данные агентства RNC Pharma, согласно которым общие объемы ветеринарных лекарств достигают до 35 тысяч тонн в год, с доминированием антибиотиков и противопаразитарных препаратов. В то же время цифры МАКМАХ (платформа AMCmodel) демонстрируют схожую проблему нерационального расхода в медицине, где препараты группы риска формируют до 86% совокупного медицинского потребления. В сельском хозяйстве применяются критически важные группы антимикробных препаратов, которые являются часто основой антибактериальной терапии в медицинской практике: полимиксины, цефалоспорины третьего поколения, аминогликозиды и макролиды (Van, 2020; Шульга, 2018).

В инфекционной патологии животных и человека ведущую роль занимают микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, характеризующиеся большим разнообразием механизмов устойчивости к антимикробным препаратам (WHO, 2019; Землянко, 2018; Страчунский, 2009). Микроорганизмы *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. и другие виды бактерий, обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), и как правило являются носителями различных детерминант резистентности. По данным мониторингов 2019-2020 года, выявлено 66,7% устойчивых форм *E. coli* к 6-7 группам антимикробным препаратам (АМП), а количество выделенных мультирезистентных штаммов увеличилось на 5,2% среди изолятов из сельскохозяйственных комплексов (Иванова, 2021; Горковенко, 2018). Согласно данным «МАРАФОН 2013-2014» - многоцентрового эпидемиологического исследования клинических изолятов, 82,2% изолятов *Enterobacteriaceae* обладали фенотипом множественной устойчивости, 1,1% - экстремальной устойчивости (Сухорукова, 2017). Активное использование АМП в сельском хозяйстве имеет прямую корреляцию с увеличением частоты устойчивых форм *E. coli*, выделенных от здоровых животных (Burrow, 2014; Nanon, 2015). С каждым годом растет

количество бактерий, продуцирующих β -лактамазы, в мясной продукции особенно в мясе птицы (Минаева, 2017). Помимо передачи устойчивых форм бактерий через продукты животноводства, происходит распространение через сточные воды и животных, таких как птицы и грызуны (Панин, 2017). В России роль животноводческих комплексов и их вклад в формирование проблемы антибиотикоустойчивости исследуется в меньшей степени, чем внутрибольничная среда, что является неблагоприятным фактором для общественного здравоохранения в контексте борьбы с распространением детерминант резистентности (Sun, 2017).

Одним из ярких примеров роли животноводства в распространении устойчивости к критически важным группам антибактериальных препаратов является появление генов *mcr*-группы, обуславливающих устойчивости к полимиксинам, которые на данный момент являются основой антибактериальной терапии инфекций, вызванных множественно-резистентными грамотрицательными бактериями в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) (Bialvaei, 2015; Kempf 2016)¹. В настоящее время, согласно списку Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) критических антимикробных препаратов, полимиксины отнесены к критически важным, резервным антибиотикам для здравоохранения. Формирование устойчивости к полимиксинам (колистин) и распространение соответствующих генетических детерминант связано непосредственно с их применением в сельском хозяйстве (Liu, Hu, 2016).

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

Задачи исследования:

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

Научная новизна

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

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

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

Установлено, что в животноводческих комплексах широко распространены гены *bla*_{СТХ-М-9} – в 15,9% и *bla*_{СТХ-М-1} – 11,5%, что требует мер по ограничению применения ряда препаратов в животноводстве, включая цефалоспорины III-IV поколений.

¹ Результаты опубликованы в работе: Агеев В.А. Распространение генов *mcr*-типа, кодирующих устойчивость к полимиксинам, в России и мире / В.А. Агеев, О.С. Сулян, И.В. Лазарева, А. А. Сухинин // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 1-2. – С. 57-64. – DOI.10.37489/0235-2990-2021-66-1-2-57-64

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы.

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

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные данные могут быть использованы в качестве основы для разработки новых концепций и стратегий по ограничению применения антибактериальных препаратов, в частности группы полимиксинов, подобно мерам, принятым в ряде стран, таких как Эстония и Китай (Ahmed, 2025; Walsh, 2016).

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

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

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

Методология и методы исследования

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту

1. Для скотоводческих комплексов Ленинградской области характерно присутствие в них микроорганизмов, несущих гены БЛРС групп *bla*_{CTX-M-9} – 34%, *bla*_{CTX-M-1} – 25%, *bla*_{CTX-M-8} – 6,2%, включая варианты их одновременного наличия;

2. Устойчивость микроорганизмов к карбапенемным антибиотикам обусловлено наличием гена *bla*_{IMP-27}. Карбапенемаза типа *bla*_{IMP-27} кодируется геном, находящимся в составе генной кассеты *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2* встроенной в состав хромосомы путем фаговой трансдукции у микроорганизма – *T. alkaliphila*, впервые идентифицированного на территории России;

3. Циркуляция гена *mcr*-типа наблюдается: в животноводческих комплексах у здорового стада КРС, во внутрибольничной среде у детей без истории госпитализации, во внебольничной среде – среди множественно резистентных изолятов, где наблюдается одновременное наличие генов *mcr-1* и *bla*_{NDM-1} у изолята *E. coli* ST31, выделенного от новорождённого ребёнка с вентилятор-ассоциированной пневмонией. Анализ плазмидной ДНК показывает возможное межрегиональное и межвидовое распространение резистентных генов. С плазмидой, несущей ген *mcr-1*, наиболее близкой является плазмида, выделенная от черного коршуна в Алтайском крае, а с плазмидой, содержащей ген *bla*_{NDM-1} — плазмиды у нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* из Китая (№ GenBank MN310375), США (№ GenBank CP018817.1) и *E. coli* из Норвегии (№ GenBank CP040884.1).

Степень достоверности и апробация результатов работ

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

Материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на семи международных, всероссийских конгрессах.: Международная научно-практическая конференция «Инновационные научные исследования: теория, методология, тенденции развития» (Россия, Уфа, 2019); XIV международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия» (Россия, Санкт-Петербург, 2019); II ежегодный Европейский конгресс «Единое здоровье» по зоонозам пищевого происхождения, устойчивости к противомикробным препаратам и новым угрозам (OneHealth EJP) (Чешская республика, Прага, 2020); XXII Российская конференция «Современные проблемы и перспективы антимикробной терапии» (Россия, Москва, 2020); I Всероссийский конгресс с международным участием по фундаментальным проблемам лабораторной диагностики (Россия, Москва, 2021); Семинар ученых ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России «Infections and children» (Россия, Санкт-Петербург, 2021); XVI международный научный конгресс «Рациональная фармакотерапия «Золотая осень» (Россия, Санкт-Петербург, 2021).

Основные положения диссертации изложены в 8 научных работах. Опубликовано 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России и индексируемых в международных базах данных. Получены два патента (на изобретение и полезную модель). Тезисы опубликованы в материалах Европейского научного конгресса (Чешская республика, Прага, 2020).

Объем и структура диссертации

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

Связь работы с научными программами и собственный вклад автора

Работа проводилась в рамках гранта Российского Научного фонда в период 2018-2019 гг. «Распространение генов устойчивости к полимиксинам *mcr*-типа у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих в Санкт-Петербурге и Ленинградской области», руководитель - старший научный сотрудник, к.б.н. Агеев В.А. (номер гранта: 18-74-00098). Все этапы экспериментальной части диссертационной работы, а также литературный обзор выполнены автором самостоятельно, за исключением определения вирулентности *in vivo* на септической модели на мышах, проводимые в ООО «Институт доклинических исследований» (Ленинградская область) и электронной сканирующей микроскопии, проводимой в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследованы животноводческие комплексы в Ленинградской области (5,7%), включающие скотоводческие комплексы (КРС) (n=3), птицеводческие комплексы (n=2), свиноводческий комплекс (n=1) и рыбоводческие комплексы (n=2). Биологический материал из животноводческих комплексов представлял собой образцы в количестве 10-15 проб из проточных каналов для удаления навоза из скотоводческих комплексов, из клеток в птицеводческих комплексах и из стойл свиноводческих комплексов. Для получения образцов от рыб была исследована аквариумная вода, в которой они содержались. Объектом исследования служили 191 изолят микроорганизмов, принадлежащих к семействам: *Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Pseudomonadaceae*.

Исследованы образцы биологического материала, собранные во внутрибольничной и внутрибольничной среде, представленные фекальными образцами от пациентов. Объектом исследования являлись *E. coli* в количестве 475 изолятов из внутрибольничной среды, 453 изолятов из внебольничной среды.

Культивирование первичного материала из животноводческих комплексов проводили в двух пробирках на среде Мюллера-Хинтон с комбинацией антибиотиков в двух вариантах. Первый - культивирование на среде с цефтриаксоном и ванкомицином для выделения устойчивых к цефалоспорином и карбапенемам грамотрицательных бактерий. Второй - культивирование с полимиксином и ванкомицином – для выделения устойчивых к полимиксинам бактерий. С каждого посева было отобрано в коллекцию от одного до пяти изолятов на основе морфологии колоний.

Культивирование биологического материала из внутрибольничной и внебольничной среды осуществляли на среде Эндо.

Идентификацию большинства выросших колоний проводили с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF Microflex LT.

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

Для определения чувствительности к антибиотикам использовали испытуемую культуру, выращенную на агаре Мюллера-Хинтон согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям EUCAST. Диско-диффузионным методом определяли чувствительность к ципрофлоксацину, цефтазидиму, цефтазидим/авибактаму, гентамицину, фосфомицину, меропенему, тигециклину, ампициллину. Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) методом серийных микроразведений для изолятов *E. coli* проводили к следующим АМП: амикацин, гентамицин, цефотаксим, цефтазидим, ципрофлоксацин, тигециклин, колистин, меропенем, дорипенем, триметоприм/сульфаметоксазол, азтреонам. Для изолята *T. alkaliphila* дополнительно использовали: ампициллин, цефепим, имипенем, дорипенем, биापенем, хлорамфеникол, цефепим/сульбактам, цефоперазон/сульбактам, азтреонам/авибактам, пиперациллин/тазобактам.

Для сравнительного фенотипического анализа определения МПК к колистину использовали три метода: метод серийных микроразведений, определение МПК с помощью анализатора VITEK 2 compact – согласно инструкции производителя и дисковой элюции.

Выделение ДНК из чистых культур для проведения ПЦР с электрофоретической детекцией проводили с помощью набора «ДНК-сорб-Б». Для ПЦР реакции использовали готовые мастермиксы Thermo Fisher Scientific «DreamTaq HS MM», а амплификацию проводили в термоциклере T100. Продукты амплификации разделяли в 2% агарозном геле при напряжении 85 В в течение 30 мин. Электрофореграммы визуализировали с использованием системы Gel Doc XR+.

Подбор олигонуклеотидных последовательностей для детекции БЛРС семейств CTX-M (с подтипами CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9), также TEM, SHV и GES осуществляли на основе анализа депонированных последовательностей в базе данных BLDB. Подбор выполняли путем их последующего выравнивания и поиска консервативных участков с использованием программного обеспечения Geneious Prime v 2020.1.1 и Unipro UGENE. Затем выполняли подбор прямых и обратных праймеров с помощью программы Oligo v.7.0, а их синтез осуществляли в ЗАО «Евроген».

Последовательности гена 16S рРНК определяли с применением секвенирования по методу Сэнгера. Полногеномное секвенирование выполняли на платформах MiSeq (Illumina) и Oxford Nanopore в соответствии с инструкциями производителей.

Вирулентные свойства штамма *T. alkaliphila* изучали на модели внутрибрюшинного заражения 18-22-х дневных мышей линии «Balb c», в количестве 10 животных в течение 14 сут. Для заражения использовали суспензию из 18-24-часовой культуры в объеме 500 мкл с концентрацией 2×10^7 КОЕ/мл для каждого животного без учета массы тела.

Все полученные результаты анализировали с помощью Microsoft «Excel» 2010, веб-ресурса AMR.cloud, CGE (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), программных обеспечений Unipro Ugene, SnapGene, VectorNTI-9. Для статистического анализа биологических данных использовали: однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и критерии хи-квадрата Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рабочая коллекция изолятов и характеристика

В исследовательскую работу вошел 191 изолят, выделенный из животноводческих комплексов. Изоляты принадлежали к семействам: *Enterobacteriaceae* - 61,2% (n=117), *Morganellaceae* - 26% (n=48), *Aeromonadaceae* - 9% (n=17), *Pseudomonadaceae* - 2% (n=3), *Alcaligenaceae* - 1% (n=2), *Flavobacteriaceae* - 0,5% (n=1) (рисунок 1,2).

Доминирующими по количеству выделенных изолятов семействами стали *Enterobacteriaceae* и *Morganellaceae* (рисунок 2).

Из общего числа изолятов семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) эшерихии составили 89,74% (n=105) (рисунок 3). Этот показатель подчеркивает их преобладающую роль среди изученных микроорганизмов.

Из всех изолятов семейства *Morganellaceae* (n=48) бактерии *Proteus mirabilis* составили 47,9% (n=23) (рисунок 3).

Бактерии *Aeromonas veronii* составили 52,9% (n=9) от всех изолятов семейства *Aeromonadaceae* (n=17). Семейства *Alcaligenaceae*, *Flavobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* представлены единичными изолятами, количество которых колеблется от одного до четырех изолятов.

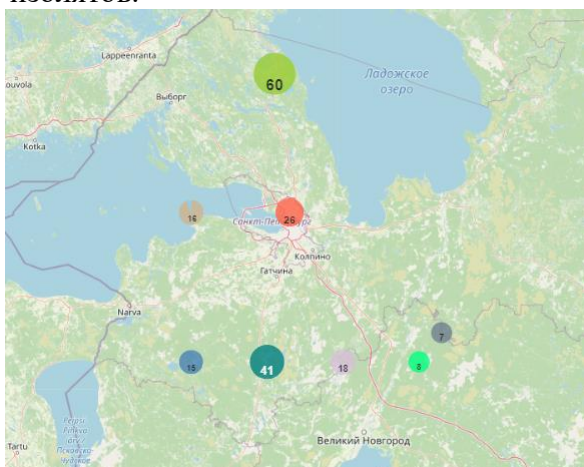


Рисунок 1 - Территориальное расположение сельскохозяйственных предприятий

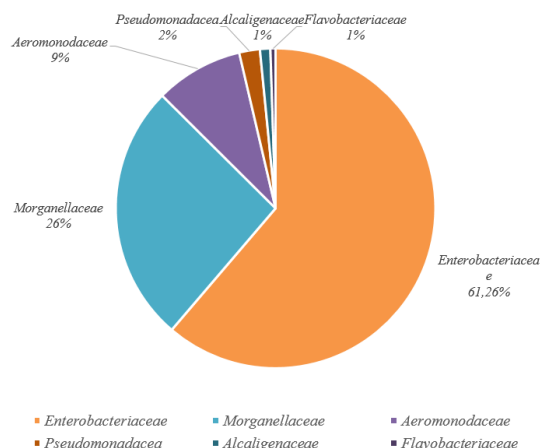


Рисунок 2 - Разнообразие изолятов, выделенных на территории животноводческих комплексов

От КРС выделены микроорганизмы из пяти различных семейств, где доминирующими этиопатогенами остаются бактерии видов *E. coli*, *P. mirabilis* и *Proteus vulgaris*. В птицеводческих комплексах доминирующим этиопатогеном является *E. coli*, а в свиноводческом комплексе – *P. mirabilis* и *P. vulgaris*. В рыбоводческих комплексах присутствуют характерные для водного биоценоза микроорганизмы из семейства *Aeromonadaceae* с основным представителем – родом *Aeromonas*, включающим виды *A. veronii*, *A. caviae* и *A. hydrophila*. Преобладание этих микроорганизмов может вызывать септические заболевания у рыб из-за их токсигенных свойств.

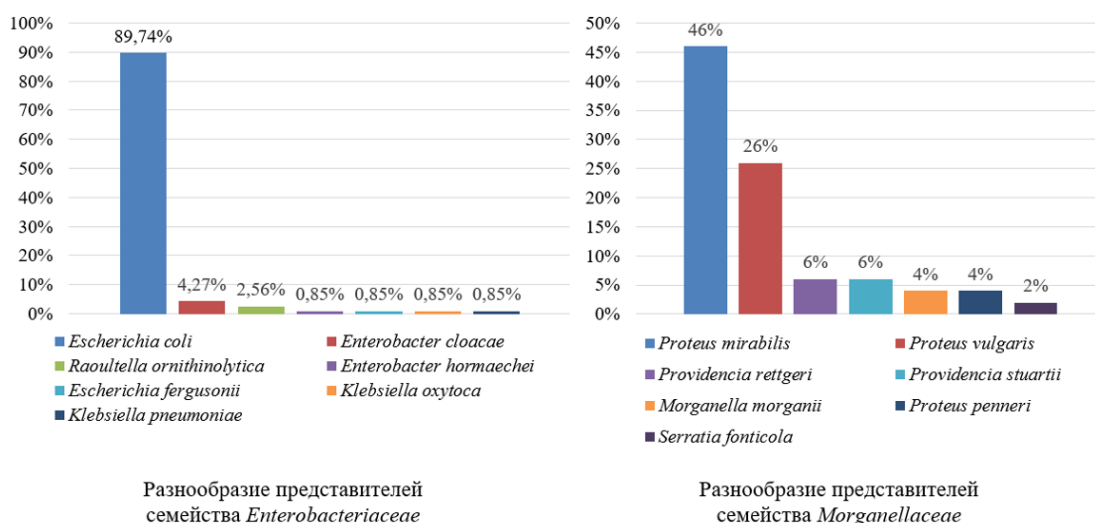


Рисунок 3 – Разнообразие представителей семейств *Enterobacteriaceae* и *Morganellaceae*

По результатам определения чувствительности к антимикробным препаратам устойчивость как минимум к одному АМП проявили 83,2% (n=159) изолятов. Мультирезистентный профиль имели: к трем антибиотикам – 28,9% (n=46) изолятов, к четырем

– 17,6% (n=28) и к пяти антибиотикам – 5,6% (n=9) изолятов. Чувствительность ко всем протестированным АМП сохранилась у 16,7% (n=32) изолятов, среди которых 46,8% (n=15) представлены *Proteus* spp., а 37,5% (n=12) – изолятами *E. coli*.

При анализе чувствительности к АМП представителей семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) выявлена высокая степень устойчивости к β -лактамам: ампициллину – 76% (n=89) и цефтазидиму – 65% (n=77). В то же время изоляты сохраняли 100% (n=117) чувствительность к карбапенемам (меропенему). Доля изолятов, резистентных к фторхинолонам, (в частности, к ципрофлоксацину), составляет 64% (n=75). Значительное количество изолятов сохраняло чувствительность к аминогликозидам, а именно, гентамицину – 89% (n=105), также к колистину – 90% (n=106) и фосфомицину – 85% (n=100). Практически все исследованные изоляты оставались чувствительными к тетрациклинам (тигециклину) – 99% (n=116).

Эшерихии (n=105), являющиеся преобладающей частью представленных в данном семействе изолятов, характеризуются устойчивостью к ампициллину — 74% (n=78) и цефтазидиму — 38% (n=40). Доля изолятов с умеренной резистентностью (категория «I») к цефтазидиму составляет 25% (n=27).

В соответствии с критериями EUCAST оценка чувствительности изолятов семейства *Morganellaceae* (n=48) к колистину, тигециклину и фосфомицину не проводилась ввиду отсутствия пограничных значений (природная резистентность). В отношении остальных антибиотиков исследуемые изоляты продемонстрировали высокий уровень чувствительности: к меропенему — 97,9% (n=47), цефтазидиму — 93,7% (n=45), гентамицину — 91,6% (n=44) и ципрофлоксацину — 89,5% (n=43). Доля чувствительных к ампициллину изолятов составила 70% (n=34), в то время как устойчивых — 29% (n=14).

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

Оценка распространения генов БЛРС

Для скрининга на наличие генов CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, а также TEM, SHV и GES - типов были проведены следующие этапы: 1. Отбор изолятов с фенотипом устойчивости к цефтазидиму; 2. Создание ПЦР-системы на основе биоинформатического анализа актуальных баз данных, содержащих референсные последовательности ферментов исследуемых генов; выявления консервативных участков; подбор праймеров и оптимизация ПЦР-системы; 3. ПЦР-типирование изолятов.

Отбор изолятов. Согласно критериям EUCAST, чувствительными к цефтазидиму считаются штаммы с диаметром зоны задержки роста ≥ 22 мм, а устойчивыми < 19 мм. Из рабочей коллекции в анализ были включены изоляты с фенотипом устойчивости – 29,3% (n=56), из которых *E. coli* составили – 73% (n=41), *Proteus* spp. – 7% (n=4), остальные виды – 19% (n=11). Также были включены изоляты категории «I» (чувствительные при повышенной экспозиции антибиотика, диаметр зоны задержки роста 19–21 мм) — 18% (n=36) изолятов, из которых доля *E. coli* составила 88% (n=32).

Биоинформатический анализ. Для создания ПЦР-системы с электрофоретическим методом детекции *bla*- генов, ответственных за продукцию БЛРС семейства CTX-M (генетических групп CTX-M-1 – 99 ферментов, CTX-M-2 – 19 ферментов, CTX-M-8 – 13 ферментов, CTX-M-9 – 63 фермента), а также семейств TEM (237 ферментов), GES (40 ферментов) и SHV (194 фермента), были получены полногеномные последовательности из базы данных BLDB. Множественное выравнивание с учетом всех описанных вариантов позволило выявить консервативные участки для самостоятельного подбора прямых и обратных праймеров для каждой генетической группы. Специфичность консервативных участков и олигонуклеотидных последовательностей проверяли с помощью BLAST – анализа, на сайте NCBI. Амплифицированные продукты, полученные в ходе

ПЦР, визуализировали в 2% агарозном геле с использованием трансиллюминатора Gel Doc XR+ для определения наличия или отсутствия специфической полосы соответствующей длины, характерной для исследуемого гена.

Результаты ПЦР. В результате ПЦР-анализа установлено, что 34,78% (n=32) изолятов из числа фенотипически устойчивых содержат гены, отвечающие за продукцию β-лактамазы типа БЛРС (таблица 1). Энтеробактерии продуцирующие БЛРС семейств СТХ-М составляют 33,6% (n=31) и представлены следующими видами: *E. coli* (n=26), *Raoultella ornithinolytica* (n=2), *Enterobacter cloacae* (n=2) *Enterobacter hormaechei* (n=1). Еще один изолят, продуцирующий БЛРС идентифицирован как *Providencia rettgeri*.

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

БЛРС семейства ТЕМ обнаружена в основном у представителей семейства *Enterobacteriaceae* - 68,7 % (n=22), также у изолята *P. rettgeri*. Распространение данных детерминант наблюдается в скотоводческих и птицеводческих комплексах (таблица 1).

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

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

Таблица 1 - Детекция БЛРС в животноводческих комплексах

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

Примечание – буквой n обозначается число изолятов

Полученные данные показывают, что среди крупного рогатого скота наблюдается высокая частота распространения генов БЛРС и позволяют сделать выводы, что они являются потенциальными резервуарами детерминант устойчивости к антимикробным препаратам.

Оценка распространения генов карбапенемаз

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

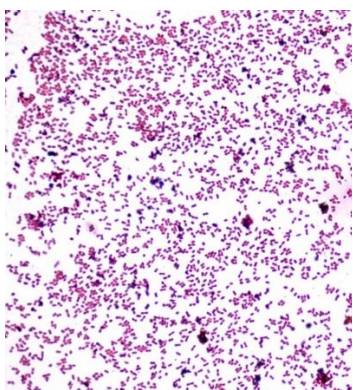
Для подтверждения таксономической принадлежности изучаемого изолята № 177 был применен молекулярно-генетический метод - определение нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. Последующий анализ с помощью программы BLAST показал, что изолят № 177 имеет 100% сходство с последовательностью вида *Oblitimonas alkaliphila* (№ GenBank KP 986579, KP 986582, KP 986580, KP 986581, KP 986585, KP 986584). Данный микроорганизм клинического происхождения впервые описал Дробыш А.М. в 2016 году, далее, в 2021 году, в ходе полного филогенетического анализа вид был реклассифицирован и переименован в *T. alkaliphila*.

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

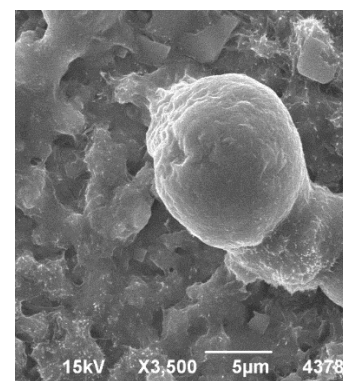
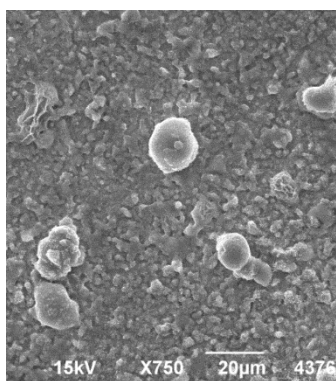
При окрашивании по Граму изолят № 177 *T. alkaliphila* представляет собой грамотрицательные палочки, располагающиеся в мазке одиночно и попарно. Для детального изучения морфологии клеток, помимо оптической микроскопии была проведена сканирующая электронная микроскопия (рисунок 4).

T. alkaliphila хорошо культивируется на агаре Мюллера-Хинтон в аэробных условиях культивирования при 37°C в течение 18-24 ч, образуя слизистые, мелкие, круглые колонии с желтоватым оттенком; на кровяном агаре формирует колонии молочного цвета в виде мелкой росы. По биохимическим свойствам данный микроорганизм является уреазоположительным, гидролизует эскулин, обладает аргининдигидролазной активностью, не восстанавливает нитраты и нитриты, не продуцирует индол, не разжижает желатин, а также не расщепляет углеводы (включая триптофан и арабинозу).

Результаты определения вирулентных свойств *in vivo* на мышинной модели сепсиса показали, что *T. alkaliphila* при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозе 2×10^7 КОЕ/мл для каждого животного без учета массы тела, не оказал негативного действия, что доказывает его низкую вирулентность.



Увеличение x100



Сканирующий электронный микроскоп (СЭМ)

Рисунок 4 - Микрокартина *Thiopseudomonas alkaliphila* № 177

Для создания полных хромосомных и плазмидных сборок для изолята №177 *T. alkaliphila* было проведено секвенирование с использованием платформы MinION Oxford Nanopore и Illumina MiSeq. Таксономический статус изолята № 177 подтвержден методом цифровой ДНК-ДНК гибридизации (*in silico* dDDH). Сходство его генома с референсным штаммом *T. alkaliphila* составило 87,0%, что значительно превышает общепринятый видовой порог (70%) и доказывает его принадлежность к данному виду.

В результате гибридной сборки полученных прочтений установлено, что геном *T. alkaliphila* представлен одной кольцевой хромосомой размером 2175000 п.о. Наличие плазмид не обнаружено. Полногеномная последовательность была депонированы в международную базу GenBank с присвоением номера CP168247.1.

По результатам анализа консервативных частей всех описанных *T. alkaliphila* и изолята №177, выявлено, что данные геномы образуют пять клад, что говорит об эволюции данных бактерий в ходе длительного времени (рисунок 5). При анализе пангенома, учитывающего не только наличие или отсутствие генов, но и имеющихся белков, показано, что изолят № 177 кардинально отличается от всех других. Данные различия обусловлены наличием 208 генов, формирующих четыре уникальные инсерции (ставки), общим размером 369762 п.о. (рисунок 6).

Первая инсерция размером 141017 п.о. содержит гены системы рестрикции-модификации 1-го типа, различные гены биосинтеза жгутиков и ряд гипотетических белков.

Вторая инсерция размером 38111 п.о. несет гены эффлюксных помп и различных регуляторных систем, белки предполагаемых факторов вирулентности, а также последовательности гипотетических белков.

Третья инсерция размером 38243 п.о. включает различные регуляторные гены, транспозазы и гипотетические белки.

Четвертая инсерция размером 23571 п.о. включает в себя мультирезистентную генную кассету размером 3541 п.н. со структурой *aadA*- *sat2*- *bla*_{IMP-27} - *IntI2*, содержит фаговые структуры, систему интегрон-интеграза типа *IntI2*, а также элементы инсерционной последовательности семейства IS3 и различные гипотетические белки. Данная генная кассета имеет 100% гомологию лишь с нуклеотидными последовательностями пяти видов бактерий семейства *Morganallaceae* выделенных на территории США.

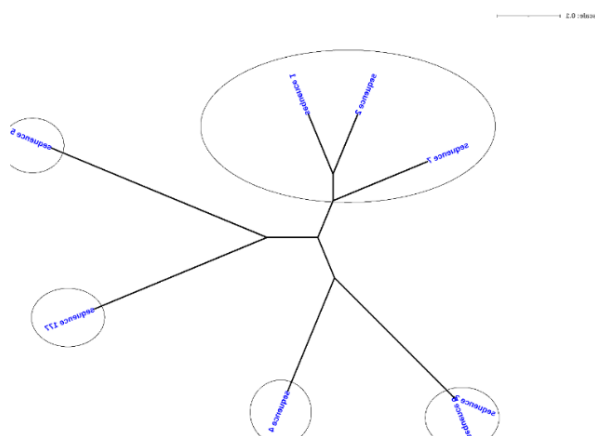


Рисунок 5 - Филогенетическое дерево *Thiopseudomonas alkaliphila* на основе полных последовательностей

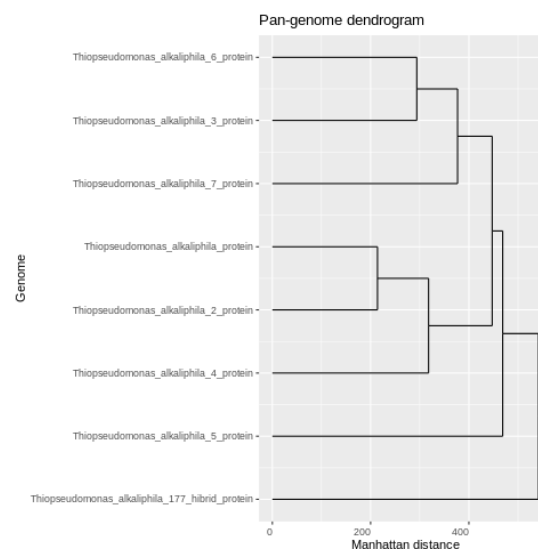


Рисунок 6 - Пангеном *Thiopseudomonas alkaliphila*

Нами проведено сравнение изолята №177 с наиболее гомологичной последовательностью описанного *T. alkaliphila* E1086 (NZ_CP0123365.1) и *Morganella morganii* N18-00103 (CP048275.1), для определения локализации инсерции с генной кассетой *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2* (рисунок 7). Области, заштрихованные темно-серым и серым цветом на рисунке 7, обозначают идентичность между последовательностями на уровне от 80 до 100%. Цветом выделена хромосомная генная кассета изолята № 177 (входящая в состав инсерции размером 23 571 п.н.), имеющая 100% гомологию с аналогичным участком генома *M. morganii* N18-00103 (CP048275.1) размером 3541 п.н.

Наличие интегрона и IS-элемента свидетельствует о многокомпонентной системе мобильности генома, способствующей интеграции и распространению детерминант резистентности. В данном случае встраивание генной кассеты, по-видимому, произошло за счет сложного механизма фаговой трансдукции (при котором фаги переносят генетический материал между бактериями), а не через механизмы транспозиции. Это объясняется фланкированием генной кассеты последовательностью, кодирующей фаговую эндонуклеазу, которая участвует в процессинге ДНК, обеспечивая разрезание и интеграцию генетического материала внутри бактериальной клетки. Кроме того, в данном локусе обнаружены элементы бактериофага Бернарди, выступающего в роли вектора переноса кассеты между бактериями в ходе фаговой трансдукции.

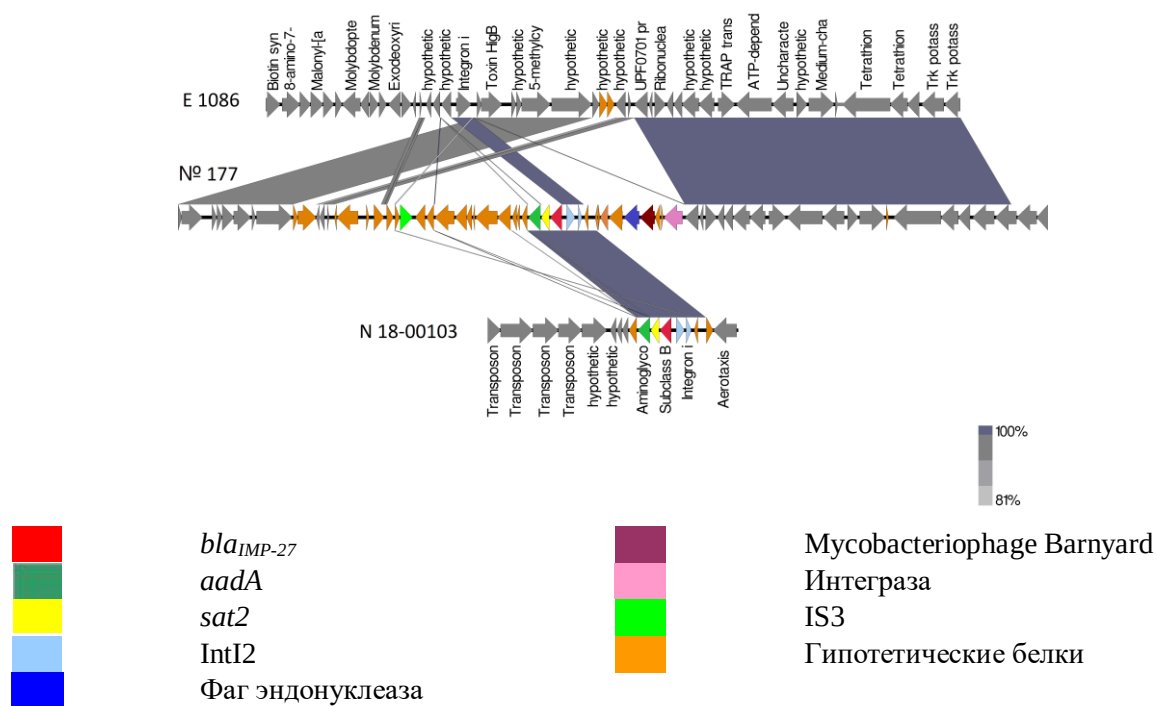


Рисунок 7 - Сравнительный анализ вставки генной кассеты изолята № 177 с вариантами *Thiopseudomonas alkaliphila* E1086 (NZ_CP0123365.1) и *Morganella morganii* N18-00103 (CP048275.1)

Гены *mcr*-типа у изолятов выделенных из животноводческих комплексов²

В ходе ПЦР-типирования вариантов генов *mcr*-1-5 обнаружены три изолята (2%) – Есо-103, Есо-151 и Есо-151.1, несущих ген *mcr*-1 (рисунок 8). Данные изоляты были выделены от поголовья здоровых животных из комплексов по содержанию КРС. Варианты генов *mcr*-2-5 не были обнаружены. В дальнейшую работу по полногеномному анализу вошли два изолята (Есо-103, Есо-151), поскольку по всем морфологическим признакам изолят Есо-151.1 является клоном изолята Есо-151.

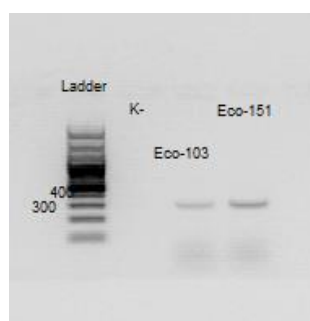


Рисунок 8 - Результаты электрофореграммы гена *mcr*-1 положительных изолятов

Выявлено, что изоляты *E. coli*, несущие ген *mcr*-1, проявляли уровень устойчивости к колистину в диапазоне МПК от 4 до 8 мкг/мл и отличались меньшей ассоциированной устойчивостью к антибиотикам разных классов. Оба штамма сохраняли полную чувствительность к β-лактамам, что согласуется у них отсутствием β-лактамаз.

² Результаты опубликованы в работе: Сулян О.С. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных / О.С. Сулян, В.А. Агеев, А.А. Сухинин и др. // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 11-12. – С. 9-17.

Изолят Есо-151 по уровню устойчивости к аминогликозидам проявлял устойчивость к гентамицину и амикацину, у него обнаружен ген аминогликозид-нуклеотидилтрансферазы (*aadA5*) и высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину (МПК > 8,0 мкг/мл). Не было выявлено полного соответствия между наличием генов устойчивости к сульфаниламидам (*sul1* - кодирующий дигидроптеорат синтазы) и триметоприму (*dfrA17* - кодирующий дигидрофолат редуктазы) и уровнем устойчивости к ко-тримоксазолу.

Изолят Есо-103 был устойчив к гентамицину, но сохранял чувствительность к амикацину, также к ципрофлоксацину (МПК > 0,06 мкг/мл) несмотря на то, что у него присутствовали детерминанты устойчивости к фторхинолонам (аминокислотные замены в гене ДНК-гиразы и гиперэкспрессия гена *mdfA*).

Изученные изоляты существенно различались по наличию плазмидных репликонов и характеризовались высокой генетической гетерогенностью. В геномах данных изолятов обнаружены плазмиды с репликонами типов IncI2 (Есо-103) и IncHI2 (Есо-151). Изоляты имели неидентичные аллельные профили и принадлежали к разным сиквенс-типам (ST), определенным по схемам мультилокусного секвенирования-типирования (MLST) Pasteur и Achtman. Изолят Есо-151 принадлежит новому ST определенный по схеме Pasteur и отличается от наиболее близкородственного ST 341 двумя локусами (*icdA*, *polB*). При определении ST по схеме Achtman данный изолят был отнесен к ST 1080. Изолят Есо-103 принадлежит к ST 529 по схеме Pasteur, а по схеме Achtman – к ST 2016 и клональному комплексу ST 205.

Установлено, что выделенные бактерии вида *E. coli* не относятся к патогенным группам эшерихий, вызывающих острые кишечные инфекции. Изолят Есо-103 относится к серотипу – O100:H25, а Есо-151 – O105:H25.

Проведенный нами анализ аннотированного генома изолята Есо-103 показал, что ген *mcr-1*, обуславливающий устойчивость к колистину, локализован на контиге 29, размером 62 534 п.н. (рисунок 9). Данный контиг представляет собой мультирепликонную структуру, содержащую несколько типов репликонов, способствующих его мобильности и устойчивости. В частности, в состав контига входят репликоны типов: IncI (5034 п.н.), IncQ (300 п.н.) и IncN (255 п.н.). Присутствие нескольких типов репликонов в одном контиге указывает на то, что данный участок генома представлен мобильной генетической структурой, способной к активному горизонтальному переносу и широкому распространению среди бактериальных популяций. Помимо генов репликации в составе контига обнаружены открытые рамки считывания, кодирующие ассоциированные с транскрипцией белки, что обеспечивает регуляцию экспрессии всех элементов. Также выявлены детерминанты, отвечающие за транспорт веществ и метаболизм, что способствует стабильному наследованию и поддержанию целостности плазмиды.

В ходе анализа аннотированного генома изолята Есо-151 установлено, что ген *mcr-1* локализован на контиге 29 размером 48 893 п.н. (рисунок 10). Данный контиг не содержит дополнительных детерминант резистентности или плазмидных репликонов, что указывает на его относительно простую структуру и ограниченную мобильность.

На контиге 29 обнаружены гены, кодирующие белки, ассоциированные с регуляцией транскрипции, а также компоненты системы токсин-антитоксин, что свидетельствует о потенциальных механизмах защиты и выживания бактериальной клетки в условиях стрессовых факторов. Также присутствуют гены системы рестрикции-модификации I типа, защищающей клетку от внедрения чужеродной ДНК и способствующей стабильному наследованию плазмиды. Кроме того, на данном контиге локализован оперон устойчивости к теллуру, наличие которого обуславливает защиту от токсичных соединений окружающей среды. Выявлены последовательности различных гипотетических белков, а также регуляторные элементы, отвечающие за экспрессию генов и структурную организацию плазмидного контига.

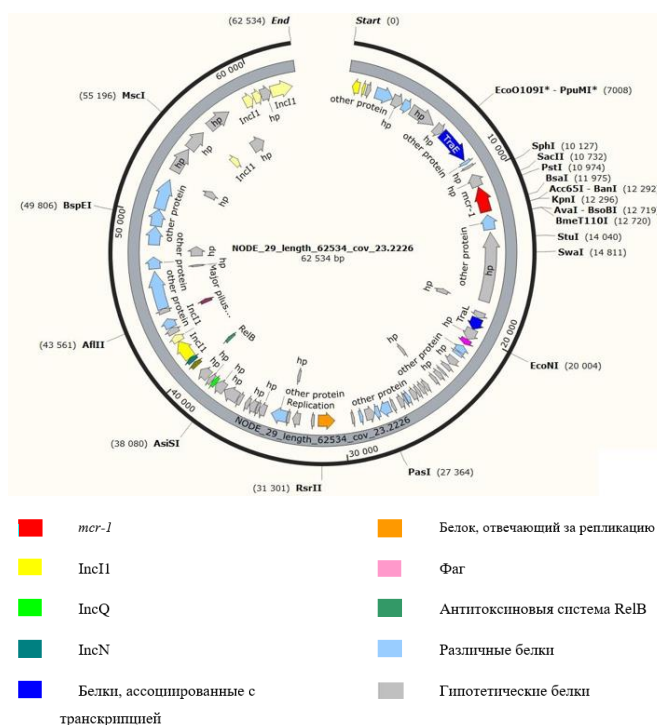


Рисунок 9 – Генетический состав контига 29
изолята Есо -103

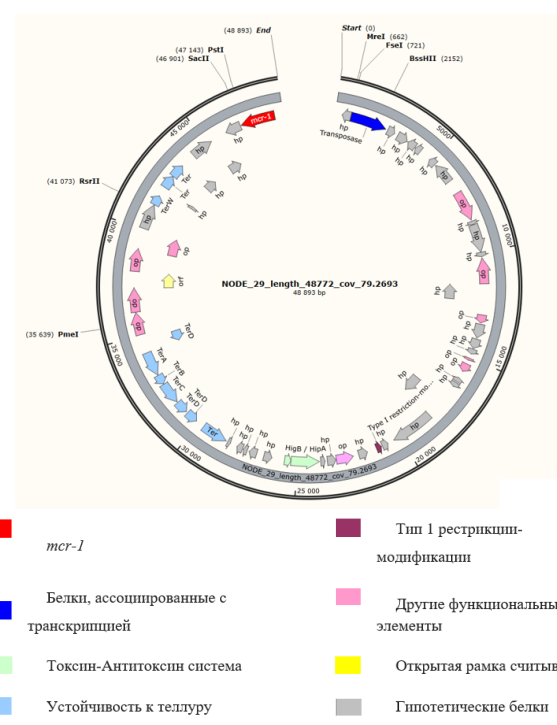


Рисунок 10 - Характеристика контига 29
изолята Есо -151

Ген *mcr*-типа у изолятов клинического происхождения³

Для детекции генов *mcr*-типа среди изолятов клинического происхождения методом ПЦР-типирования нами были исследованы 928 изолятов *E. coli*, выделенные в период с 2018 по 2019 года от пациентов с различными внебольничными (n=453) и внутрибольничными (n=475) инфекциями в стационарах Москвы и Санкт-Петербурга. В ходе работы ген *mcr-1* обнаружен у семи изолятов *E. coli* (0,8%): Есо-49, Есо-84, Есо-5571, Есо-529, Есо-636, Есо-1607, Есо-1870. Три из них выделены от детей до двух лет (2 месяца; 1 год 7 месяцев; 1 год 9 месяцев), а для одного изолята отсутствовала прикрепленная история болезни. Таким образом, впервые показано бессимптомное носительство *mcr*-положительных бактерий у детей дошкольного возраста.

Фенотипический анализ чувствительности к АМП показал, что β-лактамазы отсутствовали лишь у одного из этих штаммов (Есо-1870), который демонстрировал полную чувствительность к цефалоспорином и карбапенемам. Такой же фенотип демонстрировал изолят Есо-49, содержащий ген β-лактамазы (пенициллиназа) *bla*_{TEM-1B}. Четыре изолята проявляли устойчивость к цефалоспорином при чувствительности к карбапенемам, три из них несли гены *bla*_{CTX-M-15} (Есо-5571, Есо-1607) или *bla*_{CTX-M-1} (Есо-636), один – Есо-5571 - ген *bla*_{CMY-2}. По уровню устойчивости к аминогликозидам изоляты, несли по одному-два гена различных ферментов, проявляли различный уровень устойчивости к гентамицину, но сохраняли чувствительность к амикацину. Устойчивость к тигециклину (МПК=2,0 мкг/мл) проявлял один изолят (Есо-1607), однако генов устойчивости к этому антибиотику обнаружено не было. При этом у пяти из семи изолятов, были обнаружены гены устойчивости к тетрациклином. Не было выявлено полного соответствия между наличием генов устойчивости к сульфаниламидам (*sul1* и *sul2*, кодирующие дигидроптеорат синтазы) и триметоприму (*dfrA12*, *dfrA17*, *dfrA36*, кодирующие дигидрофолат редуктазы) и уровнем устойчивости к триметоприм/сульфаметоксазолу. Изолят Есо-5571 проявлял

³ Результаты опубликованы в работе: Сулян О.С. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных / О.С. Сулян, В.А. Агеевец, А.А. Сухинин и др.// Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 11-12. – С. 9-17.

высокий уровень устойчивости к аминогликозидам, содержащий гены четырёх ферментов (*aadA5*, *aadA2*, *aac(6')*-*Ib3* и *aac(3)-IIId*), а также ген метилтрансферазы (*rmtC*). Изолят Есо-5571 Демонстрировал высокий уровень устойчивости к цефалоспорином и нес гены четырёх β-лактамаз: *bla_{NDM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1B}* и *bla_{CMY-6}*.

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

Изолят Есо-5571 является этиологически значимым. Он выделен у новорожденного ребенка с врожденным пороком сердца. Первые 16 дней пациент находился в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) в Грозном, после чего был переведен в Москву для проведения оперативного вмешательства. В послеоперационном периоде у ребенка диагностировали вентилятор-ассоциированную пневмонию, а из трахеального аспирата была выделена культура *E. coli* демонстрирующая фенотип множественной резистентности и одновременное наличие генов NDM-1 и *mcr-1*, что является относительно редким событием на сегодняшний день.

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

Плазида, несущая ген *mcr-1* состояла из одного контига, не содержащего дополнительных детерминант резистентности. Она была успешно замкнута в кольцевую форму с помощью секвенирования по Сэнгеру. Размер плазмиды составил 59 т.п.н. с типом репликона IncI2.

Ген *bla_{NDM-1}* локализован с геном *bla_{CMY-6}* на плазмиде из двух контигов размером 128 т.п.н. и типом репликона IncC. Плазида, несущая ген *bla_{NDM-1}* была собрана из нескольких контигов, но не замкнута в кольцо, так как, судя по ближайшим плазмидам этой группы, несет область, где накапливаются мобильные элементы, повторы которых препятствуют окончательной сборке.

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

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

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

Сравнительный анализ методов определения МПК к колистину

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

В качестве отрицательного контроля (К-) для определения чувствительности всеми тремя методами использовали штаммы Американской коллекции типовых культур ATCC *E. coli* 29522 и

АТСС *E. coli* 29500, а в качестве положительного (K+) – культуры *E. coli* из рабочей коллекции (Есо-103 и Есо-151), содержащие ген приобретенной фосфоэтаноламинтрансферазы, обуславливающий устойчивость к колистину.

Для метода дисковой элюции использовались диски разных производителей (нагрузка на диск 10 мкг/мл) ((НИЦФ (Россия), «Bio-Rad» (Франция), Oxoid (Англия)). На рисунке 11 представлен результат постановки метода дисковой элюции на примере двух изолятов. Концентрация колистина в пробирках с дисками соответствует 1 мкг/мл, 2 мкг/мл и 4 мкг/мл (слева направо в каждой группе). Четвертая пробирка без диска в группе отрицательного контроля служила «контролем роста (КР)» микроорганизма. После инкубации из пробирки «контроль роста» осуществляли бактериологический посев на кровяной агар для исключения загрязнений. На обоих рисунках слева показаны чувствительные штаммы АТСС *E. coli* 25922 и АТСС *E. coli* 25900, а справа – колистин устойчивые изоляты с определением МПК ≥ 4 мкг/мл.

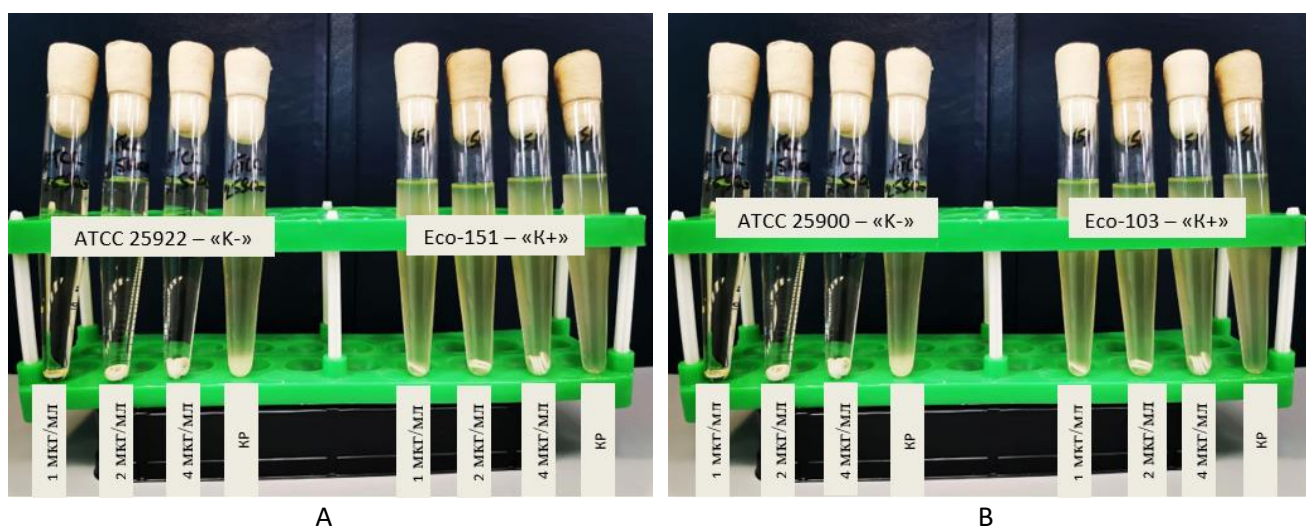


Рисунок 11 - Определение МПК методом дисковой элюции. Пробирки на рисунке представлены концентрациями 1,2,4 мкг/мл и контроль роста (КР) на примере двух изолятов. На рисунке А представлены культуры: АТСС 25922 – «К-» и Есо-151 – «К+», на рисунке Б - АТСС 25900 – «К-» и Есо-103 – «К+»⁴

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

Полученное статистическое значение хи-квадрата — 1,528 — при сравнении двух категориальных переменных МПК (с категориями «серийные разведения» и «диск Элюции») — при уровне значимости 0,05 и для 1 степени свободы — составляет примерно 3,841. Такое же значение получилось при сравнении двух категориальных переменных МПК (с категориями «VITEK 2 compact» и «диск Элюции»). Поскольку $1,528 < 3,841$, мы не отвергаем нулевую гипотезу, что свидетельствует об отсутствии статистически значимой связи между двумя переменными.

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

Таким образом, метод дисковой элюции позволяет использовать коммерческие диски разных производителей для определения МПК к колистину методом элюции в бульоне. Это является легко воспроизводимым методом и обеспечивает надежность получаемых результатов для выявления устойчивого фенотипа.

⁴ Результаты опубликованы в работе: Nikitin G. Comparative evaluation of methods for determining sensitivity to colistin in *e. coli* isolates / G. Nikitin, O. Sulian, A. Sukhinin// The FASEB journal. – 2022. – № S.1.4y

Оценка резистома изолятов и генетических линий *Escherichia coli*

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

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

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

Устойчивость к аминогликозидам у трех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-124) обусловлена синтезом бифункционального фермента ААС (аминогликозидацетилтрансферазы), кодируемого генами *aac*(3)-IIa и *aac*(6')-Ib-cr и хромосомными генами аминогликозид модифицирующих ферментов: фосфотрансферазами *aph*(3')-Ia, *aph*(3'')-Ib, *aph*(6)-Id и нуклеотидилтрансферазами *aadA1* и *aadA2*. У изолята Есо-124 соответствия уровня устойчивости и наличием генов резистентности не выявлено.

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

Гены устойчивости к тетрациклинам (*tet*(A) и *tet*(B)), кодирующие системы активного выведения (эффлюкса), были обнаружены у четырех изолятов (Есо-5, Есо-74, Есо-76, Есо-124), несмотря на фенотипическую чувствительность данных изолятов к антимикробным препаратам этого класса.

Обнаружены гены устойчивости к триметоприм/сульфаметоксазолу у трех изолятов (Есо-5, Есо-74 и Есо-124), где у двух из них фенотипическая резистентность согласовывалась с наличием детерминант, кодирующих дигидроптероатсинтазы (*sul2*, *sul3*) и дигидрофолат редуктазы (*dfrA12*, *dfrA14*) соответственно.

Устойчивость к дезинфектантам выявлена у трех изолятов (Есо-74, Есо-76 и Есо-124), обладающих резистентностью к четвертичным аммониевым соединениям, кодируемой геном *qacL* и к кислородактивным соединениям, обусловленной геном *sitABCD*.

Все шесть изолятов имеют похожий набор репликонов плазмид, количество которых у отдельных изолятов варьируется от одного до четырех. Наиболее распространенным типом репликоном плазмид является мультирепликонный – IncF, кодирующий несколько репликонов (IncFIB, IncFII, IncFIC), вторыми по частоте встречаемости стали плазмиды группы IncI плазмиды. Данные типы плазмид являются основными векторами переноса широкого спектра генов устойчивости, что полностью согласуется с результатами анализа резистома.

Для отнесения эшерихий к группе патогенных для птиц (АРЕС – Avian Pathogenic Escherichia Coli) был анализирован вирулом. Выделены два изолята (Есо-74 и Есо-76) несущих шесть и восемь генов патогенности: *fimH* – кодирующий фимбриальный адгезин, *hlyF* – *специфического птичьего гемолизина*, *iroN* – кодирующий белок рецептора сидерофоров энтеробактерина, *iss* – сывороточный ген устойчивости, *ompT* – кодирующий белок наружной мембраны с протеазной активностью, *sitA* – ген кодирующий белок, участвующий в усвоении железа. Изолят Есо-74 дополнительно несет гены: *iutA* – рецептор аэробактерина и *tsh* – ген, кодирующий термостабильный гемолизин. Согласно данным Джонсон Т. с соавторами, для отнесения штамма к группе АРЕС необходимо

присутствие не менее двух маркерных генов (Johnson, 2008). Изученные изоляты содержали от двух до восьми генов вирулентности, характерных для АРЕС.

Наличие генов, таких как *fimH*, *ompT*, *neuC* и *iss* у штаммов *E. coli*, выделенных от КРС и свиней, само по себе не позволяет напрямую классифицировать их как патогенные. Данные гены могут быть ассоциированы с вирулентностью, однако их присутствие рассматривается в качестве потенциального фактора вирулентности только в том случае, если соответствующие штаммы способны вызывать клинические выраженные заболевания.

Кроме того, серотипы *E. coli*, обычно, делятся на патогенные и непатогенные по наличию определенных факторов вирулентности и патогенности. Так, изоляты по серотиповому составу О- и Н- антигена относятся: Есо-5 – О28:Н21, Есо-20 – О61:Н34, Есо-74 – О83:Н42, Есо-76 – О185:Н2, Есо-124 – О23:Н8 и Есо-154 – О103:Н2. Если штаммы принадлежат к серотипу, считающемуся непатогенным, то наличие вышеуказанных детерминант не обязательно свидетельствует о его патогенной природе. Решающее значение имеют функциональная активность данных генов, их роль в патогенезе, а также клинические проявления, ассоциированные с конкретным штаммом. Изолят *E. coli* (Есо-154) с серотипом О103:Н2 принадлежит к группе энтеропатогенных кишечных палочек, однако ввиду отсутствия шигаподобных токсинов (веротоксинов) он отнесен к атипичным энтеропатогенным кишечным палочкам, не представляющим непосредственной угрозы для здоровья животных и человека. (Soderlund, 2016; Park, 2018).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что большинство представителей семейства *Enterobacteriaceae* (n=117) обладают устойчивостью как минимум к трем группам АМП: пенициллинам – 76,3% (n=87), фторхинолонам – 56,14% (n=64) и цефалоспорином – 42,11% (n=48), что свидетельствует о формировании профиля множественной лекарственной устойчивости (MDR). Результаты полногеномного секвенирования изолятов из рабочей коллекции подтверждают наличие генов ассоциированной устойчивости к АМП разных групп. Биоинформатический анализ позволил выявить линии эшерихий, патогенных для птиц (АРЕС) и обладающих высоким вирулентным потенциалом. Набор генов, ответственный за вирулентный профиль АРЕС, совпадает с таковым у уропатогенных эшерихий (UPEC), вызывающих инфекции мочевых путей у человека. Это указывает на потенциальную возможность обмена генетическими факторами вирулентности между линиями АРЕС и UPEC, что подчеркивает необходимость разработки комплексных мер профилактики и лечения эшерихиозов как в птицеводческих хозяйствах, так и в клинической медицине.

Разработанные актуальные праймеры для детекции генов, кодирующих БЛРС охватывающие все варианты ферментов, входящих в группы СТХ-М-1 (n=99), СТХ-М-2 (n=19), СТХ-М-8 (n=13), СТХ-М-9 (n=63), а также семейств ТЕМ (n=189), SHV (n=194) и GES (n=40), позволяют выявлять ферменты нераспространенных типов БЛРС. Обнаружено значительное количество изолятов, продуцирующих БЛРС, с преобладанием генотипов ТЕМ (68,7%), СТХ-М-1 (25%), СТХ-М-9 (34%) и СТХ-М-8 (6,2%), включая варианты их одновременного наличия. Полученные результаты свидетельствуют о широкой распространенности БЛРС в животноводческих комплексах Санкт-Петербурга и Ленинградской области.

Нами впервые в России обнаружен вид бактерий *T. alkaliphila*, выделенный из животноводческих комплексов. Данный вид микроорганизмов описан в мировой литературе в единичных случаях, причем исключительно в качестве изолятов клинического происхождения, что подчеркивает фундаментальную новизну нашей работы по выявлению природного резервуара этого патогена в рамках концепции "Единое здоровье". Впервые проведена биопроба в септической модели на мышах для определения вирулентного профиля. Установлено, что данный штамм обладает низкой вирулентностью.

Впервые обнаружен ген *bla*_{IMP-27} у штамма *T. alkaliphila* с мультирезистентным профилем. Устойчивость обусловлена локализацией гена IMP-27 в составе генной кассеты *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2*, локализованной на бактериальной хромосоме и обуславливающей

устойчивость к аминогликозидам, стрептомицину и металло-β-лактамам. Полученные данные подчеркивают необходимость мониторинга трудноидентифицируемых видов бактерий, устойчивых к критически важным антимикробным препаратам.

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

Мультирепликонный контиг изолята Есо-103, на котором локализован ген *mcr-1* и три типа репликонов плазмид (IncI, IncN, IncQ) представляет значительную опасность с точки зрения распространения антибиотикорезистентности. Данная структура способствует эффективной горизонтальной передаче и стабильному наследованию гена устойчивости, что подчеркивает важность долгосрочного мониторинга подобных генетических структур.

Контиг у изолята Есо-151 представляет собой генетическую единицу, содержащую ключевой ген *mcr-1* и набор элементов, обеспечивающих его стабильное существование и потенциальную мобильность. Отсутствие дополнительных детерминант резистентности и типов репликонов свидетельствует об ограниченной, но все же значимой роли данного контига в распространении устойчивости к колистину в бактериальных популяциях.

У изолятов клинического происхождения частота выявления гена *mcr-1* также на невысоком уровне и составила 0,8%. Для *mcr-1* положительных изолятов был характерен высокий уровень ассоциированной резистентности к антибиотикам разных групп. Особый интерес представляет изолят Есо-5571, выделенный у новорождённого ребенка с пороком сердца, у которого были одновременно выявлены гены *mcr-1* и *bla_{NDM-1}*. При этом ген *mcr-1* был локализован на плазмиде практически идентичной плазмиде, выделенной в 2018 г. на Алтае от дикой птицы Чёрный коршун (*Milvus migrans*) (Tarabai H., 2019). Однако каких-либо эпидемиологических данных, объясняющих формирование и появление данного изолятов, выявить не удалось. Трудно также объяснить происхождение изолятов Есо-1870 и Есо-1607, выделенных от детей 2-месячного и годовалого возраста соответственно. В обоих случаях не удалось выявить каких-либо эпидемиологических данных о контактах детей, находившихся на грудном вскармливании, или их родителей с сельскохозяйственными животными.

Прогнозировать динамику появления и распространения генов *mcr*-типа в России в условиях ограниченности методов детекции колистин-резистентных изолятов существенно затруднено. Апробированный метод дисковой элюции для определения чувствительности к колистину является наименее трудозатратным методом для внедрения в лаборатории различных ведомств. Он представляет собой достоверную альтернативу методу серийных микроразведений в бульоне, обеспечивая высокую скорость и экономическую доступность скрининга.

Для эффективного противодействия распространению антибиотикорезистентности необходимо устанавливать принципы рационального применения антимикробных препаратов в ветеринарной практике, учитывая современные реалии. Необходимо также создать интегрированные системы надзора за устойчивостью к антибиотикам, а также государственный контроль над использованием антибиотиков в сельском хозяйстве.

ВЫВОДЫ

1. Из животноводческих комплексов выделены и идентифицированы изоляты представителей шести семейств бактерий (*Aeromonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Pseudomonadaceae*). Наиболее многочисленными среди выделенных микроорганизмов, оказались представители семейства *Enterobacteriaceae* 61,26% (n=117), из которых преобладающим видом является *E. coli* - 89,74% (n=105). В семействе *Morganellaceae* 26% (n=50) разнообразие видов микроорганизмов наблюдается более выражено и достигает восьми различных видов, среди которых преобладают бактерии рода *Proteus* spp. 80% (n=40), представленные тремя видами (*P. mirabilis*, *P. vulgaris* и *P. Penneri*).

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

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

4. Впервые обнаружена металло- β -лактамаза *bla*_{IMP-27} в составе хромосомы у представителя ранее не описанного в России вида *Thiopseudomonas alkaliphilia*. Геном данного изолята представлен в виде одной кольцевой последовательности и имеет четыре уникальных вставки, в одной из которых представлена генная кассета *aadA* - *sat2* - *bla*_{IMP-27} - *IntI2*, с устойчивостью к аминогликозидам, стрептомицину и металло- β -лактамам.

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

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

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Sulian, O. Co-production of MCR-1 and NDM-1 by *Escherichia coli* sequence type 31 isolated from a newborn in Moscow, Russia / O. Sulian, V. Ageevets [et al.]// International Journal of Infectious Diseases. – 2020. – 101. – P.4-5 – DOI.10.1016/j.ijid.2020.09.1422 – Цит = 9 (Scopus, WoS, Q1)

2. Сулян О.С. Ассоциированная устойчивость к полимиксину и бета-лактамам *Escherichia coli*, выделенных от людей и животных / О.С. Сулян, В.А. Агеев, А.А. Сухинин и др.// Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 11-12. – С. 9-17. – DOI.10.37489/0235-2990-2021-66-11-12-9-17 – Цит = 31 (Scopus, Q4)

3. Агеев В.А. Распространение генов *mcr*-типа, кодирующих устойчивость к полимиксинам, в России и мире / В.А. Агеев, О.С. Сулян, И.В. Лазарева, А. А. Сухинин // Антибиотики и химиотерапия. – 2021. – Т.66, № 1-2. – С. 57-64. – DOI.10.37489/0235-2990-2021-66-

1-2-57-64 – Цит=0 (Scopus, Q4)

4. Nikitin G. Comparative evaluation of methods for determining sensitivity to colistin in *e. coli* isolates / G. Nikitin, **O. Sulian**, A. Sukhinin// The FASEB journal. – 2022. – № S.1. – P. R3112 – DOI.10.1096/fasebj.2022.36.S1.R3112 – Цит = 1 (Scopus, WoS, Q2)

Патентные документы

1. **Сулян О.С.**, Агеевец В.А., Сухинин А.А., Чулкова П.С., Цветкова И.А., Сидоренко С.В. Эталонный штамм вида *Thiopseudomonas alkaliphila*, впервые идентифицированный в России. Тип: патент на изобретение, номер патента: RU2785117C1, номер заявки: 2022122086, дата регистрации: 12.08.2022, дата публикации: 02.12.2022.

2. Моисеева К.А., Сухинин А.А., Приходько Е.И., Макавчик С.А., **Сулян О.С.** Инструмент для взятия проб фекалий из прямой кишки животных. Тип: полезная модель, номер патента RU204004U1, номер заявки: 2020136875, дата регистрации: 09.11.2020, дата публикации: 04.05.2021.

Публикации в сборниках

Sulian, O. Occurrence of colistin resistance genes *mcr-1* in livestock *E. coli* from in North-West of Russia/ O. Sulian, A. Ageevets [et al] // OHEJP ASM, Prague, 22.05-27.05.2020.-142.

Сулян Офелия Спартаковна

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОВ *MSCR*-ТИПА И ДРУГИХ ЗНАЧИМЫХ
ДЕТЕРМИНАНТ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ
БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ И ЖИВОТНЫХ**

1.5.11. Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Подписано в печать

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1.

Тираж 120 экз. Заказ

Набор компьютерный.

Отпечатано в ООО «Типография ТМФ»
196105, Санкт-Петербург, Благодатная ул., 69