

На правах рукописи

Макарова Мария Александровна

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI* -
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ И ЗАБОЛЕВАНИЙ
ВНЕКИШЕЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ

03.02.03 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Санкт-Петербург – 2021

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера).

Научный консультант:

Доктор медицинских наук, профессор

Нарвская Ольга Викторовна

Официальные оппоненты:

Суворов Александр Николаевич – член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, отдел молекулярной микробиологии, заведующий

Тец Виктор Вениаминович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии, заведующий

Мавзютов Айрат Радикович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Инфекции, вызванные *Escherichia coli*, имеют высокую социально-экономическую значимость и являются проблемой здравоохранения во всех странах. Важное эпидемиологическое значение эшерихиозов как острых кишечных инфекций обусловлено их способностью к широкому эпидемическому распространению (Qadri F. et. al., 2005; UNICEF (The United Nations Children's Fund), 2009; Center for Disease Control and Prevention (CDC) Guidance for characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, 2012; Горелов А.В. и др., 2013; Escher M. et al., 2014; Либенко В.Н. и др., 2016; ECDC Annual epidemiological Report, 2018; CDC Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 2020). Список сероваров *E. coli*, способных вызывать острые кишечные инфекции, постоянно пополняется; *E. coli* некоторых серологических групп, признанных ранее возбудителями, часто выделяют от практически здоровых людей (Blum G. et. al., 1995; Girardeau J.P. et. al., 2005; DebRoy C. et. al., 2016; Nojomi F. et. al., 2019). Клиническое значение имеет пул патогенных *E. coli* (ExPEC), вызывающих заболевания внекишечной локализации (Russo T. et. al., 2003; Гриценко В.А. и др., 2013; Dale et. al., 2015; Poolman J. et. al., 2016; Robins-Browne R. et. al., 2016). Несмотря на многолетнее и разностороннее изучение биологических свойств патогенных *E. coli*, многие аспекты биологии этого вида требуют более углубленного анализа на современном уровне знаний.

Популяция диареегенных *E. coli* (DEC) пополнилась представителями новых и «гибридных» патогрупп. К их числу относят энтероаггегативные *E. coli*, вызывающие персистирующие длительно протекающие диареи, а также энтероаггегативные шигатоксин-продуцирующие *E. coli*, вызывающие гемоколиты с развитием жизнеугрожающего осложнения – гемолитико-уремического синдрома (Подколзин А.Т. и др., 2004; Moon J. et. al., 2005; Huang D. et. al., 2007; Beilaszewska M. et. al., 2011; Chattaway M. et. al., 2014; Соколова Е.Д. и др., 2016; Elias W. et. al., 2016; Jenkins C. et. al., 2015, 2018; Mello Santos A. et. al., 2020; Гончар Н.В. и др., 2020).

В Российской Федерации лабораторная диагностика эшерихиозов, основанная на фенотипических методах, позволяет идентифицировать изолят до вида *E. coli* без учета патогенности, которая не является видовым признаком и ассоциирована с генами вирулентности конкретного штамма (Magiorakos A. et. al., 2012; Иванова Е.И. и др., 2013; Leimbach A. et. al., 2013; Erjavec M. et. al., 2015; Bok E. et. al., 2018). С позиций доказательной медицины для подтверждения этиологической значимости штамма *E. coli* необходимо определять генетические детерминанты вирулентности или их фенотипическую экспрессию.

Инфекции, вызываемые ExPEC, характеризуются большим разнообразием клинических форм, при которых существует высокий риск развития хронизации и постинфекционных осложнений у пациентов всех возрастных групп (Жабченко И.А., 2013; Dale A. et. al., 2015; Bonkat G. et. al., 2018; Казанцев А.В. и др., 2019; Кузнецова М.В. и др., 2019; Мельников В.Л. и др., 2019). В России молекулярные методы оценки этиологической значимости штаммов и прогнозирования рисков развития жизнеугрожающих осложнений, таких как сепсис и менингиты, в настоящее время не используют.

Отдельную, важную проблему представляют инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, которые ведут к увеличению расходов на лечение, формированию и распространению резистентных к антимикробным препаратам штаммов возбудителей внутрибольничных инфекций (Рябкова Е.Л. и др., 2009; Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, 2011; Акимкин В.Г. и др., 2018; Найговзина Н.Б. и др., 2018; Стратегия Контроля Антимикробной Терапии (СКАТ), 2018; Сухорукова М.В. и др., 2019). По результатам международных и российских исследований при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи, ведущее место занимают грамотрицательные микроорганизмы, включая *E. coli*, на долю которых приходится до 48% случаев (Рябкова Е.Л. и др., 2009; Миронов А.Ю. и др., 2012; Козлов Р.С. и др., 2015; Акимкин В.Г. и др., 2018; ВОЗ. Эпиднадзор за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Восточной Европе, 2018; Мельников В.Л. и др., 2019; Палагин И.С. и др., 2019; Сухорукова М.В. и др., 2019).

К числу глобальных вызовов, с которыми столкнулось человечество, относится резистентность к антибиотикам возбудителей инфекционных заболеваний, которая приняла масштабы глобальной «пандемии» и рассматривается как крупнейшая угроза национальной безопасности в каждой стране. *E. coli*, резистентные к цефалоспорином и карбапенемам, относят к группе крайне приоритетных патогенов, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека (ВОЗ. Глобальное бремя инфекций, связанных с медико-санитарной помощью, 2012; ВОЗ. Система глобального мониторинга резистентности к антимикробным средствам (GLASS), 2016). В России резистентность *E. coli* к клинически значимым антибиотикам приблизилась к критическому уровню (Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, 2011; Козлов Р.С. и др., 2015; Рафальский В.В., 2018; Палагин И.С. и др., 2019; Сухорукова М.В. и др., 2019).

Таким образом, широкий спектр заболеваний, обусловленных *E. coli*, возникновение крупных пищевых вспышек, гнойно-септических инфекций, в том числе, связанных с оказанием медицинской помощи, а также генерализация инфекции с развитием тяжелых осложненных форм или длительной персистенции возбудителя в организме человека, свидетельствуют о высокой эпидемиологической, клинической и социально-экономической значимости эшерихиозов и необходимости регулярного изучения генетических вариантов, спектра вирулентности и механизмов резистентности патогенных *E. coli*.

Степень разработанности темы исследования

Отечественными и зарубежными исследователями накоплен обширный материал о биологических свойствах патогенных *E. coli*, эпидемиологических, патогенетических и клинических особенностях вызываемых ими заболеваний, однако, в лабораторной диагностике остается ряд нерешенных вопросов (Nataro J. et. al., 1998; Clermont O. et. al., 2000; Бухарин О.В. и др., 2001; Kaper J. et. al., 2004; Abe C. et. al., 2008; Горелов А.В. и др., 2013; Bielaszewska M. et. al., 2013; Иванова Е.И. и др., 2015; Карцев Н.Н. и др., 2018; Казанцев А.В. и др., 2019; Кузнецова М.В. и др., 2019). В Российской Федерации рутинная лабораторная диагностика в основном опирается на культуральные методы, в связи с чем, многие, в том числе «новые» и/или с измененными свойствами варианты возбудителей

эшерихиозов не диагностируют (Айвазян С.Р. и др., 2012; Иванова Е.И. и др., 2013; Халиуллина С.В. и др., 2016; Есаулкова А.Ю. и др., 2017; Ковалев О.Б. и др., 2017; Карцев Н.Н. и др., 2019; Леонтьева Н.И. и др., 2020).

Мало исследований посвящено энтероаггративным *E. coli* (EAgEC), характеризующимся генетическим потенциалом возникновения не только острых, продолжительных и хронических диарей, но и внекишечных заболеваний (цистит, пиелонефрит, холецистит) (Горелов А.В. и др., 2013). В нашей стране среди работ по изучению патогенных *E. coli* большинство посвящено диареегенным, количество исследований и публикаций о детерминантах вирулентности *E. coli* - возбудителей внекишечных заболеваний (ExPEC) крайне ограничено (Иванова Е. И. и др., 2015; Захарова И.Н. и др., 2018; Казанцев А.В. и др., 2019; Кузнецова М.В. и др., 2019). Генетические детерминанты вирулентности как критерии оценки риска развития хронических форм и угрожающих жизни осложнений не используют для характеристики возбудителя и прогноза течения инфекционного процесса (Учваткин Г.В. и др., 2017; Мельников В.Л. и др., 2019). В этой связи, вполне очевидна необходимость исследования популяции патогенных *E. coli* как основы совершенствования этиологической диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.

Резистентность *E. coli* к клинически значимым антимикробным препаратам представляет глобальную проблему современности. Существенный вклад в изучение механизмов резистентности ExPEC, включая возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, внесли отечественные многоцентровые исследования «МАРАФОН», «ДАРМИС», «РеВАНШ» (Козлов Р.С. и др., 2011; Палагин И.С. и др., 2019; Сухорукова М.В. и др., 2014, 2017, 2019). Крайне необходимо на национальном и региональных уровнях дополнить мониторинг данными о резистентности диареегенных и комменсальных *E. coli* для характеристики всей популяции.

Методами молекулярного субтипирования установлен факт циркуляции во многих странах высоковирулентных штаммов *E. coli* с множественной и экстремальной резистентностью к антибиотикам, принадлежащих к успешным клонам высокого риска пандемического распространения (ST 21, 131, 38, 405) (Johnson J.R. et. al., 2010; Bielaszewska M. et. al., 2013; Nicolas-Chanoin M.-H. et. al., 2014; Alghoribi M. et. al., 2015; Kruger A. et. al., 2015; Ogura Y. et. al., 2017; Park J. et. al., 2018). В России детекцию эпидемически и клинически значимых международных клонов *E. coli* не проводят.

Одним из актуальных направлений исследований является изучение патогенного потенциала *E. coli*, колонизирующих кишечник человека, и оценка микробиоты здорового человека как резервуара вирулентных и резистентных к антибиотикам штаммов *E. coli* (Bailey J. et. al., 2010; Lee S. et. al., 2010; Erjavec M. et. al., 2015; Conway T. et. al., 2015; Кардымон О.Л. и др., 2016; Здвижкова И.А. и др., 2017; Bok E. et. al., 2018).

В этой связи, комплексное изучение популяции патогенных *E. coli* с использованием молекулярно-генетических методов, позволяющих своевременно оценить клиническую и эпидемиологическую значимость выделенного штамма, необходимо для разработки персонализированных терапевтических стратегий и проведения целенаправленных профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Цель исследования: охарактеризовать популяционную структуру и роль патогенных *Escherichia coli* в развитии кишечных и внекишечных заболеваний с использованием микробиологических и молекулярно - генетических методов исследования.

Задачи исследования

1. Определить особенности биологических свойств и детерминанты вирулентности штаммов *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций, выделенных на территории Российской Федерации.
2. Изучить генетическое разнообразие и оценить патогенный потенциал штаммов *E. coli* – возбудителей внекишечных заболеваний.
3. Дать характеристику штаммов энтероаггративных *E. coli*, выделенных при острых кишечных инфекциях и заболеваниях мочевыводящих путей.
4. Изучить чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов *E. coli*, вызывающих инфекционную патологию.
5. Охарактеризовать бета-лактамазы и молекулярные механизмы резистентности, обуславливающие устойчивость штаммов *E. coli* к бета-лактамам антибиотикам.
6. Оценить уровни распространения генов вирулентности и резистентности к антибиотикам в субпопуляции *E. coli* – представителей нормобиоты кишечника.
7. Выявить «успешные» международные эпидемические клоны *E. coli*, вызывающих заболевания мочевыводящих путей (*E. coli* O25:H4-B2-ST131) и острые кишечные инфекции (*E. coli* O26:H11-B1-ST21) в Санкт-Петербурге.
8. Провести сравнительный анализ данных молекулярно-генетического и культурального методов исследования и обосновать этиологическую значимость штаммов *E. coli* как возбудителей острых кишечных инфекций.

Научная новизна

Впервые в Российской Федерации охарактеризованы биологические свойства штаммов патогенных *Escherichia coli* – возбудителей диарейных и внекишечных заболеваний, представителей нормобиоты кишечника человека с использованием современных молекулярных методов детекции патогенетически значимых генов вирулентности, резистентности к антибиотикам и принадлежности к филогенетическим группам.

Данные о гетерогенности генетических свойств и антигенной характеристике диареогенных *Escherichia coli* существенно расширили сведения о циркулирующих возбудителях острых кишечных инфекций, использование которых послужат основой для разработки эффективных методов лабораторной диагностики, лечения, профилактики и проведения противоэпидемических мероприятий при возникновении очагов с групповой заболеваемостью.

Впервые выявлены штаммы энтероаггративных *Escherichia coli* (EAgEC), ранее не диагностируемой патогруппы в Российской Федерации. С использованием комплекса молекулярных подходов к характеристике генетических свойств EAgEC получены результаты мирового уровня о сочетанном потенциале вирулентности, характерном для диареогенных и внекишечных *Escherichia coli*.

Впервые представлена комплексная характеристика штаммов *Escherichia coli* –

возбудителей заболеваний внекишечной локализации, свидетельствующая о генетической variability патогенного потенциала и резистентности к антимикробным препаратам. Наличие генов вирулентности (*afa*, *pap*, *sfa*, *kps*, *ibeA*) и резистентности (*bla*) является прогностическим признаком риска развития хронического течения болезни, острых жизнеугрожающих состояний и клинической неэффективности эмпирической терапии.

Выявлена высокая частота (49,8%) штаммов с множественной устойчивостью к клинически значимым антимикробным препаратам в популяции *Escherichia coli*: возбудителей диарейных (43,8%), внекишечных гнойно-септических (65,5%) заболеваний, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (100%), и представителей нормобиоты кишечника человека (33,7%). Показана высокая активность меропенема (99,8%), амикацина (93,9%) и нитрофурантоина (95,3%) для российской популяции патогенных штаммов *Escherichia coli*.

Получены новые для Российской Федерации данные о генетических детерминантах резистентности *Escherichia coli* к цефалоспорином III – IV поколения, обусловленной ведущим в мире механизме – продукцией бета-лактамаз генетических семейств CTX-M. С 2015 года отмечено появление в стационарах Санкт-Петербурга штаммов *Escherichia coli*, резистентных к карбапенемам, продуцирующих NDM металло-бета-лактамазу. Информация о генах резистентности является важным инструментом для эпидемиологических исследований при оценке общего пула генов резистентности в популяции патогенных *Escherichia coli* и слежения за появлением новых клинически и эпидемически значимых фенотипов резистентности.

Показано, что на территории Российской Федерации циркулируют штаммы *Escherichia coli*, принадлежащие к глобальным международным клоном высокого риска – STEC O26:H11-B1-ST21 – возбудитель диарейных заболеваний и ExPEC O25:H4-B2-ST131 – возбудитель внекишечных заболеваний.

Впервые установлен факт колонизации кишечника здоровых лиц штаммами возбудителей заболеваний внекишечной локализации, что показывает эпидемиологическую значимость микробиоты кишечника как скрытого резервуара патогенных *Escherichia coli* с множественной резистентностью к антимикробным препаратам, в том числе, международного клона высокого эпидемического риска O25:H4-B2-ST131.

Впервые идентифицирован штамм *Escherichia coli* серологического варианта O144:H45, у которого отсутствуют гены вирулентности диареегенных и внекишечных *Escherichia coli* (патент на изобретение №2707640).

Созданы семь баз данных, которые включили уникальные результаты молекулярных исследований российских штаммов *Escherichia coli* (детерминанты, кодирующие вирулентность, резистентность, О- и Н- антигены, принадлежность к филогенетическим группам) и могут быть использованы для анализа фенотипических и генотипических характеристик штаммов *E. coli*, выделяемых на территории Российской Федерации: «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *E. coli*, выделенных при внекишечных заболеваниях» (ФИПС № 2019621937), «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *E. coli*, выделенных при флегмонозных аппендицитах» (ФИПС № 2019622277), «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов EAgEC, выделенных из проб фекалий пациентов с диарейным синдромом» (ФИПС № 2019622323), «Молекулярно-генетическая характеристика

комменсальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых (без признаков ОКИ) жителей Санкт-Петербурга (ФИПС № 2020620646), «Биологические свойства шигатоксин-продуцирующих штаммов *Escherichia coli* (STEC), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» (ФИПС № 2020621031), «Биологические свойства штаммов энтеропатогенных *Escherichia coli* (EPEC), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» (ФИПС № 2020621032), «Биологические свойства энтеротоксигенных штаммов *Escherichia coli* (ETEC), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» (ФИПС № 2020621033).

Теоретическая и практическая значимость

Научно обоснованы критерии оценки патогенного потенциала штаммов *Escherichia coli*, вызывающих заболевания кишечной, внекишечной локализации и колонизирующих кишечник здоровых лиц, завоза и циркуляции на территории Российской Федерации штаммов, принадлежащих к международным клонам ST 21, 131, 38, 405 высокого эпидемического риска пандемического распространения.

В результате проведенного исследования дано теоретическое обоснование и получено практическое подтверждение значимости и целесообразности использования комплекса культуральных и молекулярных методов при лабораторной диагностике острых кишечных инфекций, обусловленных *E. coli*, которые позволят охарактеризовать популяцию патогенных штаммов *E. coli* по антигенным, вирулентным свойствам, выявить наиболее значимые в клиническом и эпидемическом отношении клональные комплексы, проводить надзор за появлением на территории Российской Федерации возбудителей с новыми или измененными свойствами, уменьшить систематические ошибки при детекции возбудителей на постаналитическом этапе лабораторной диагностики.

Результаты молекулярного изучения штаммов *E. coli* могут быть использованы как теоретическая основа совершенствования лабораторной диагностики заболеваний эшерихиозной этиологии; молекулярно-генетического мониторинга возбудителей и облигатных представителей нормобиоты кишечника; оптимизации методов детекции клональной принадлежности; профилактики жизнеугрожающих осложнений.

Результаты изучения резистентности штаммов *E. coli*, выделенных при инфекционных заболеваниях (ОКИ, ГСИ, ИСМП) и входящих в состав нормобиоты кишечника, существенно дополняют характеристику всей популяции *E. coli*. Данные о распространении бета-лактамаз расширенного спектра имеют важное практическое значение, поскольку позволят актуализировать рекомендации по антибактериальной терапии, разработать универсальные методы выявления клональной принадлежности штаммов.

Созданные электронные базы данных, предназначенные для накопления, хранения и анализа информации о биологических свойствах штаммов *E. coli*, позволяют проводить молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, вызванными патогенными *E. coli*.

Двадцать четыре российских штамма *E. coli* – возбудителей острых кишечных и внекишечных инфекций депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk» как контрольные штаммы для

детекции генов, кодирующих факторы вирулентности патогенных *E. coli*, и устойчивость к антимикробным препаратам (B-7360, B-7440, B-7441, B-7736 - B-7741, B-8033, B-8034, B-8554, B-8555, B-8656, B-8657, B-8855 - B-8657, B-9031, B-9032, B-9037, B-9039 - B-9041).

В международном банке данных GenBank депонированы полная последовательность генома уникального штамма EAgEC, содержащего 610 нуклеотидных последовательностей – номера доступа GenBank WAGY000000000.1 - WAGY00000610.1, нуклеотидные последовательности гена *aatA* - регулятора генов вирулентности EAgEC (номера доступа MG564312, MG564313), гена *cds* – компонента транспортной системы липополисахарида O – антигена (номер доступа MN 638739), гена *wzm*, кодирующего синтез белка пермеазы (номер доступа MN 638740), гена *wzx*, кодирующего синтез антигена O145 (номер доступа JX112707), гена *fliC*, кодирующего синтез антигена H28 (номер доступа JX112708).

Рекомендации по организации системы наблюдения за устойчивостью к антимикробным препаратам штаммов *E. coli* – возбудителей внутрибольничных инфекций в учреждениях здравоохранения учтены при разработке Федеральных клинических рекомендаций «Принципы организации мониторингирования устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно-профилактических медицинских организациях здравоохранения».

Рекомендации по критериям выбора молекулярного типирования штаммов *E. coli* и детекции международных клонов высокого риска приняты при разработке Федеральных клинических рекомендаций «Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».

Рекомендации по единым требованиям к процедуре определения чувствительности к антимикробным препаратам возбудителей бактериальных инфекций человека согласованы при разработке российских Клинических рекомендаций «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам».

Рекомендации по методам выделения штаммов *E. coli* O157:H7 учтены в Методических указаниях 4.2.018-99 «Особенности лабораторной диагностики эшерихиозов, обусловленных энтерогеморрагическими *E. coli* O157:H7».

Рекомендации по организации преаналитического этапа лабораторных исследований согласованы при разработке Практических рекомендаций «Преаналитический этап микробиологических исследований».

Результаты работы представлены в отдельных главах Национального руководства «Клиническая лабораторная диагностика» (под ред. В.В. Долгова. – Москва: ГЭОТАР - Медиа, 2012), справочнике «Лабораторная диагностика инфекционных болезней» (под ред. В.И. Покровского, М.Г. Твороговой, Г.А. Шипулина. – Москва: Издательство БИНОМ, 2013, 2020); вошли в материалы Государственного доклада «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; монографии «Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет» (под ред. А.Ю. Поповой – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – СПб.: ФБУН НИИЭМ имени

Пастера, 2017), «Актуальные направления и перспективы Российско-Вьетнамского сотрудничества в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия» (под ред. А.Ю. Поповой – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Волгоград: ООО «Издательство «Волга-Пресс», 2019), «Микробиологический контроль качества пищевой продукции» (под ред. А.Ю. Поповой, И.А. Дятлова – Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – Москва: Издательство «Династия», 2020).

Материалы диссертации вошли в учебные пособия «Преаналитический этап лабораторного исследования» (акт внедрения от 18.09.2020), «Лабораторная диагностика эшерихиозов» (акт внедрения от 24.03.2020) и внедрены в образовательный процесс кафедры медицинской микробиологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ при проведении сертификационных циклов повышения квалификации для врачей по специальности «Бактериология» и дополнительные профессиональные программы повышения квалификации врачей «Острые кишечные инфекции. Современные подходы к микробиологической диагностике», «Патогенные эшерихии», «Современные методы эпидемиологического маркирования возбудителей кишечных инфекций», «Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам», «Молекулярно-генетический мониторинг за глобальной резистентностью» (акт внедрения от 07.04.2021), а также в лекционный материал сертификационных курсов усовершенствования по специальности «Бактериология» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ (акт внедрения от 19.03.2021 г.).

Предложения по совершенствованию лабораторной диагностики эшерихиозов внедрены в работу специализированной центральной бактериологической лаборатории СПб ГБУЗ «Клиническая инфекционная больница имени С.П. Боткина» (акт внедрения от 08.04.2021), клинко-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 5 им. Н.Ф. Филатова» (акт внедрения от 25.02.2021), бактериологического отдела клинко-диагностической лаборатории СПб ГБУЗ «Детская городская больница № 17 Святителя Николая Чудотворца» (акт внедрения от 22.03.2021).

Методология и методы исследования

Методология научной работы основана на современных научно обоснованных принципах изучения популяционной структуры *E. coli* и спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. В качестве теоретического обоснования исследования использовали данные научной литературы, посвященные эпидемиологическим, микробиологическим и генетическим особенностям штаммов *E. coli*, выделенных при различных инфекционных заболеваниях человека. Планирование структуры проведения исследований осуществляли на основании общенаучных и репрезентативных методов, включающих бактериологические, иммунохроматографические, молекулярные, биоинформационные и статистические. Программа исследования предусматривала 5 этапов:

- подготовительный: сбор и реидентификация штаммов *E. coli* по культурально-ферментативным свойствам и антигенной характеристике;
- экспериментально-исследовательский: определение продукции токсинов (гемолизина, цитотоксины), чувствительности к АМП; детекция генов, кодирующих факторы вирулентности, О - и Н - антигены диареегенных *E. coli*, принадлежность к филогенетическим группам, резистентность к β -лактамам АМП; генотипирование с универсальными праймерами (REP, RAPD – ПЦР), мультилокусное секвенирование-типирование (MLST), полногеномное секвенирование (WGS).
- обработка полученных результатов (визуально, матрично-ассоциированной лазерной десорбции / ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS, автоматические микробиологические анализаторы, визуализация гелей, статистика, создание компьютерных баз данных, веб-сайты, ген банки);
- постаналитический (интерпретация и анализ полученных результатов, формирование заключения);
- разработка практических рекомендаций.

Предметом исследования служили биологические свойства штаммов *E. coli*, отражающие патогенность (гены вирулентности, ассоциированные с адгезией, инвазией, токсинообразованием, персистенцией и др.), антигенное строение, чувствительность к АМП, в том числе механизмы и гены резистентности к β -лактамам препаратам, и принадлежность к филогенетическим группам.

Протокол исследования был одобрен этической комиссией ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 27).

Объекты исследования

Объектами исследования явились 1704 штаммов *E. coli*. Коллекция штаммов DEC и ExPEC формировалась из присланных для ре- и идентификации изолятов, выделенных в бактериологических лабораториях семи ГБУЗ Санкт-Петербурга и ФБУЗ Центров гигиены и эпидемиологии Санкт-Петербурга, Ленинградской области, Вологды, Мурманска, Омска, Челябинска, Владивостока), а также в рамках НИР, заключенных с бактериологическими лабораториями филиалов № 4 и № 6 ФБУЗ ЦГиЭ по городу Санкт-Петербург и включала:

- 884 штамма *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых и детей, обследованных по клиническим и эпидемическим показаниям (больные ОКИ, контактные лица из очагов ОКИ, декретированная группа населения);
- 136 штаммов *E. coli* – возбудителей ИСМП, выделенных из различных биологических материалов (кровь, моча, мокрота, раневое отделяемое);
- 100 штаммов *E. coli*, выделенных из мочи пациентов, проходивших лечение в амбулаторных условиях;
- 65 штаммов *E. coli*, выделенных из интраабдоминальной (перитонеальной) жидкости от экстренно госпитализированных пациентов с диагнозом острый флегмонозный аппендицит;
- 490 штаммов *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых жителей Санкт-Петербурга без признаков острых и хронических заболеваний ЖКТ;

- 29 референтных штаммов – для внутреннего контроля качества экспериментально-исследовательского этапа.

Бактериологические методы

Идентификацию штаммов *E. coli* проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) с использованием системы Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Ферментативные свойства изучали в пробирочных тестах, а также с использованием автоматического бактериологического анализатора VITEK-2 Compact (Biomérieux, Франция) и тест-системы «ENTERO test 24» (ЭрбаЛахема, Чехия). Подвижность оценивали по характеру роста на 0,3% полужидком агаре. Серогрупповую принадлежность определяли в реакции агглютинации с диагностическими поливалентными ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ, типовыми ОК - сыворотками и - иммуноглобулинами и групповыми О - сыворотками (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Россия).

Продукцию гемолизина оценивали по характеру роста на ГМФ агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия) с добавлением 5% дефибринированной крови барана (E&O Laboratories Ltd., Шотландия). Энтерогемолитическую активность определяли на ГМФ агаре с добавлением 5% дефибринированной крови барана и 10,0 М CaCl₂.

Продукцию шигаподобных токсинов определяли в иммунохроматографических экспресс-тестах RIDA QUICK Verotoxin/O157 Combi (Rbiopharm, Германия) и Duopath® Verotoxins (Merck, Германия).

Чувствительность к антимикробным препаратам (АМП) определяли диско-диффузионным методом и градиентной диффузии (Е-тест) с использованием агара Мюллера-Хинтон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), дисков и тестов (Oxoid, Великобритания). Интерпретацию результатов проводили согласно Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и рекомендациям EUCAST 2014-2018 гг. На основании полученных данных штаммы *E. coli* были распределены на следующие категории: чувствительные (Ч), умеренно резистентные (У), резистентные (Р) и нечувствительные (НЧ); к последней были отнесены (У) и (Р) штаммы. Для выявления продукции БЛРС (β-лактамаз расширенного спектра) использовали метод «двойных дисков» с цефтазидимом, цефотаксимом, цефепимом и амоксициллин / клавулановой кислотой; продукции карбапенемаз – CIM тест (Carbapenem inactivation method). К фенотипу множественной резистентности (MDR) относили штаммы, устойчивые к трем классам АМП, включая продуцентов БЛРС и карбапенемаз, фенотипом экстремальной резистентности (XDR) – характеризовали штаммы, устойчивые ко всем АМП, за исключением одного или двух классов.

Молекулярно-генетические методы

Детекция генов, кодирующих факторы вирулентности и резистентности. Экстракцию тотальной ДНК из клинического материала проводили с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм®РИБО-преп» («НекстБио», Россия), бактериальную ДНК выделяли набором «InstaGene™Matrix» (BioRad, США). Для выявления и дифференциации ДНК диареегенных *E. coli* и генов металло - β-лактамаз (MBL): VIM-, IMP- и NDM - типов и сериновых карбапенемаз (групп КРС и ОХА-48) использовали наборы реагентов «АмплиСенс®Эшерихиозы – FL», «АмплиСенс® MDR MBL-FL», «АмплиСенс® MDR

КРС/ОХА-48- FL» и амплификатор с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени» (амплификатор СХТ-96, Bio-Rad, США). Поиск основных и дополнительных генов, кодирующих факторы вирулентности DEC и ExPEC, β -лактамазы, а также молекулярное серотипирование, филогенетическое типирование, субтипирование шигаподобных токсинов проводили методом ПЦР с электрофоретической детекцией (амплификатор СХТ-1000, Bio-Rad, США), используя опубликованные праймеры и стандартизованные протоколы (Clermont O. et. al., 2000; Johnson J. et. al., 2000; Kimata K. et. al., 2005; Fard M. et. al., 2005; Durso L. et. al., 2007; Alikhani M. et. al., 2006; Sabaté M. et. al., 2006; Ewers C. et. al., 2007; Gerrish R. et. al., 2007; Muller D. et. al., 2007; Abe C. et. al., 2008; Li D. et. al., 2010; Tokuda K. et. al., 2010; DebRoy C. et. al., 2011; Woodford N. et. al., 2011; Миронов А.Ю. и др., 2012; Iguchi A. et. al., 2015; Liu Y. et. al., 2015; Sánchez S. et. al., 2015; Sjöling A. et. al., 2015; Zhu Y. et. al., 2017; Banjo M. et. al., 2018; Singh N. et. al., 2018).

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST). По результатам секвенирования по Сэнгеру 136 штаммов *E. coli* и полногеномного секвенирования 28 штаммов проводили оценку полиморфизма семи генов «домашнего хозяйства» - аденилаткиназы (*adk*), фумарат гидратазы (*fumC*), ДНК гиразы (*gyrB*), изоцитрат дегидрогеназы (*icd*), малат дегидрогеназы (*mdh*), аденилосукцинат дегидрогеназы (*purA*) и рекомбиназы А (*recA*) (Wirth T. et. al., 2006). Сиквенс тип (ST) штамма устанавливали согласно международной схеме и стандартами баз данных MLST University of Warwick (Mark Achtman Database, <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli/>) и Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>).

Полногеномное секвенирование (WGS). Геномную ДНК выделяли с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), подготовку библиотек проводили с помощью набора TrueSeq (Illumina Inc, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Аннотацию генома проводили с помощью утилиты Prokka v. 1.11 и геномного сервера FAST. Для анализа последовательностей ДНК полных геномов штаммов *E. coli* использовали веб – сайт Центра геномной эпидемиологии (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Поиск генетических детерминант патогенности, вирулентности, антибиотикорезистентности, принадлежность к сиквенс-типу (ST) и установление антигенной характеристики штамма (О - и Н - антигенов) проводили с использованием онлайн сервисов: PathogenFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PathogenFinder/>); VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>); ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>); MLST-1.8 Server (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>); SerotypeFinder 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>).

Статистическая обработка результатов. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы Excel (Microsoft Office) и программы WINPEPI, предназначенной для практического использования и исследований в области здравоохранения. Для оценки статистической значимости различий показателей (частота, доля) применяли точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при доверительном интервале 95% ($p < 0,05$). Полученные данные представлены в виде таблиц и диаграмм.

Личное участие автора в получении результатов

Автором на основе анализа научной литературы определено обоснование научного исследования, разработаны этапы программы и план исследования, сформулированы цель,

задачи, выбраны объекты, предмет, методология и методы исследования, а также непосредственное участие на всех этапах исследования.

Бактериологические исследования (посев проб биологического материала и штаммов, присланных для реидентификации, изучение ферментативных и серологических свойств, определение чувствительности к АМП методами диско-диффузионным и градиентной диффузии (Е-тесты), продукции гемолизинов, шигаподобных токсинов, БЛРС и карбапенемаз) автор осуществлял лично.

Молекулярно-генетические исследования (экстракция ДНК, постановка ПЦР с электрофоретической и гибридизационно – флуоресцентной детекцией, генотипирование с универсальными праймерами выполнены автором лично. Секвенирование штаммов по Сэнгеру выполнено в рамках международного проекта Baltic Antibiotic Resistance collaborative Network (BARN) совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной генетики г. Тарту Р. Naaber и А. Bilozor. Полногеномное секвенирование проведено совместно с сотрудниками института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук и Новосибирского государственного университета к.м.н. М. Л. Филипенко, А. А. Кечиным и Д. С. Болдыревой.

Автор лично провел анализ, обобщение, статистическую обработку полученных результатов, сформулировал выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшего исследования.

Основные положения, выносимые на защиту

1. *Escherichia coli* – возбудители диарейных заболеваний пяти патогрупп, характеризуются разнообразием биологических свойств и генов вирулентности, определяющих патогенетические особенности заболеваний. Молекулярно-генетические методы исследования обеспечивают достоверную идентификацию «классических» и гибридных патогрупп, антигенную характеристику возбудителя, снижая ошибки интерпретации результатов культурального метода диагностики.
2. *Escherichia coli* – возбудители заболеваний внекишечной локализации, характеризуются гетерогенностью детерминант вирулентности. Септические и менингеальные осложнения ассоциированы с конкретными генами вирулентности штаммов уропатогенных *E. coli*.
3. В общей популяции *E. coli* преобладают штаммы с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Резистентность к цефалоспорином III – IV поколения обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра генетического семейства CTX-M клональных групп CTX-M1 и CTX-M9.
4. В Российской Федерации циркулируют штаммы *E. coli*, принадлежащие к международным клонам высокого риска пандемического распространения – STEC O26:H11-B1-ST21 – возбудитель диарейных заболеваний и ExPEC O25:H4-B2-ST131 – возбудитель внекишечных заболеваний.
5. Нормобиота кишечника человека является скрытым резервуаром устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *E. coli* – возбудителей внекишечных инфекций, в том числе штаммов международного клона высокого риска ST131.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность и обоснованность полученных результатов исследования основаны на использовании современных методологических подходов при лабораторной диагностике инфекционных заболеваний эшерихиозной этиологии. В работе использовали комплекс бактериологических и современных молекулярно-генетических методов исследований. Проведен достаточный объем исследований, позволивший корректно провести статистическую обработку полученных данных. Определение в штаммах *E. coli* генов, кодирующих факторы вирулентности, позволяет достоверно идентифицировать патогруппы диареогенных *E. coli*, патогенные *E. coli* – возбудители инфекций внекишечной локализации и *E. coli* – представителей нормобиоты кишечника.

Диссертационная работа выполнена в рамках отраслевой научно - исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно ориентированные научные исследования в отрасли эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016-2020 гг.», утвержденной Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека А.Ю. Поповой 13.01.2016, приказ № 5; договор НИР «Совершенствование лабораторной диагностики бактериальных возбудителей диарейных заболеваний. Генетическое разнообразие факторов вирулентности, механизмов резистентности к антимикробным препаратам».

Диссертационная работа апробирована на заседании Ученого совета ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера 08 декабря 2020 г. (протокол № 9).

Материалы диссертационной работы были доложены и представлены на 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Copenhagen (Дания, 2015), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии XVIII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2015), VII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2015), II Национальном Конгрессе Бактериологов (Санкт-Петербург, 2016), XI съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2017), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии XX Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2017), итоговой конференции по результатам Российско-Гвинейского научно-технического сотрудничества в области изучения эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике в 2015-2017 гг. (Санкт-Петербург, 2017), X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2018), XX международном конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 2018), международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, посвященной памяти выдающегося микробиолога Н.П. Елинова XXI Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2018), Всероссийской научно-практической конференции «Лабораторная диагностика – клинической медицине: традиции и новации», посвященной 95 – летию со дня рождения члена – корреспондента РАМН Б.Ф. Коровкина (Санкт-Петербург, 2018), международной

конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 2018), межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики» (Екатеринбург, 2018), XI Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2019), 37-th annual meeting of the European society for pediatric infectious diseases (Любляна, 2019), Российско-Вьетнамской научно-практической конференции «Актуальные направления и перспективы сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия» (Москва, 2019), Всероссийском ежегодном Конгрессе «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика» (Санкт-Петербург, 2019), XXI Международном Конгрессе по антимикробной терапии МАКМАХ/ESCMID (Москва, 2019), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения» (Нижний Новгород, 2019), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии и иммунологии XXII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2019), VI Медицинском Конгрессе «Актуальные вопросы врачебной практики» (Ялта, 2019), V Национальном Конгрессе Бактериологов (Москва, 2019), V Российском Конгрессе лабораторной медицины РКЛМ 2019 (Москва, 2019), Российско-Вьетнамской научно-практической конференции «Актуальные направления и перспективы сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия» (Москва, 2019), Заседании отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (Санкт-Петербург, 2020), Всероссийской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии и иммунологии XXIII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2020).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 60 печатных работ, из них 26 статей в рецензируемых изданиях, 5 статей – в других изданиях, 15 тезисов - в рецензируемых изданиях и 14 тезисов в сборниках трудов и материалах конференций. Получен 1 патент на изобретение. Материалы диссертации учтены при разработке методических рекомендаций, четырех клинических рекомендаций, методических указаний и практических рекомендаций, вошли в справочник, разделы трех монографий и национального руководства.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 251 страницах, написана по традиционному плану, содержит введение (включающее методологию и методы исследования), обзор литературы, пять глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список литературы и 12 приложений. Работа иллюстрирована 45 таблицами и 15 рисунками. Список литературы содержит 372 источника, в том числе – 102 отечественных и 250 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Биологические свойства штаммов *E. coli* – возбудителей острых кишечных инфекций

В исследование были включены 824 штамма *E. coli*, выделенных в бактериологических лабораториях семи административных территорий РФ (Санкт-Петербург и Ленинградская область, Вологда, Мурманск, Омск, Челябинск, Владивосток), из испражнений больных ОКИ, контактных лиц из очагов ОКИ и декретированной группы населения, обследованных по клиническим и эпидемическим показаниям. Согласно сопроводительным документам, штаммы 18 серологических групп относились к четырем патогруппам DEC, из них ЕРЕС (n = 109) девяти серологических групп: O26, O55, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142; ЕТЕС (n = 420) трех серологических групп: O6, O25, O128; ЕІЕС (n = 286) пяти серологических групп: O29, O124, O144, O152, O164; ЕНЕС (n = 9) двух серологических групп: O157 и один штамм - неизвестной серогруппы (не - O157). Штаммы патогрупп STEC и EAgEC отсутствовали в перечне присланных изолятов.

Первичный скрининг 824 штаммов *E. coli* на принадлежность к группе диареогенных, проведенный молекулярным методом (ПЦР в режиме «реального времени»), выявил наличие специфичных участков ДНК пяти патогрупп DEC у 160 (19,4%) штаммов: из них 76 (47,5%) – ЕРЕС (O26, O55, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142); 14 (8,8%) – ЕТЕС (O25, O128); 42 (26,3%) – STEC серогрупп O26, O55, O111, включая O157 и один штамм не - O157, принадлежащих к ЕНЕС; 27 (16,9%) – ЕІЕС (O29, O124, O152, O164); 1 (0,6%) – штамм *E. coli* O55 – EAgEC. Штаммы *E. coli* серологических групп O26 и O111 принадлежали к двум патогруппам: ЕРЕС и STEC, серогруппы O55 – к трем: ЕРЕС, STEC и EAgEC (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты идентификации штаммов *E. coli*

Патогруппа	Культуральный метод		Молекулярный метод	
	n (%), штаммов	серогруппа	n (%), штаммов	серогруппа
ЕТЕС	420 (51,0%)	O6, O25, O128	14 (8,8%)	O25, O128
ЕРЕС	109 (13,2%)	O26, O55, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142	76 (47,5%)	O26, O55, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O142
STEC	0	–	33 (20,6%)	O26, O55, O111
ЕНЕС	9 (1,1%)	O157, ONT	9 (5,6%)	O157, «не – O157»
ЕІЕС	286 (34,7%)	O29, O124, O144, O152, O164	27 (16,9%)	O29, O124, O152, O164
EAgEC	0	–	1 (0,6%)	O55

Примечание: «–» не определено

У 664 (80,6%) изученных штаммов *E. coli* серологических групп O25 (n = 27), O6 (n = 380) и O144 (n = 257) не были выявлены кривые накопления флуоресцентных сигналов, что указывало на отсутствие специфичных участков ДНК DEC.

В рамках диссертационной работы культуральным методом было подтверждено присутствие EAgEC в 73 ПЦР - позитивных пробах (из испражнений детей и взрослых с диарейным синдромом – 59, из мочи пациентов с ИМП – 14).

Таким образом, коллекция DEC включала 233 штамма пяти патогрупп (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC, EAgEC).

Изученная популяция DEC характеризовалась вариабельными ферментативными свойствами, которые не имеют клинического значения и не позволяют дифференцировать патогруппы DEC, за исключением EIEC, которые, как правило, не ферментируют лактозу и сахарозу, не декарбоксилируют лизин и EHEC серовара O157:H7 (не ферментируют сорбит, дают отрицательную реакцию в тесте с β -глюкоронидазой).

Из общего числа изученных штаммов DEC 42 (18%) были неподвижными: шесть штаммов EPEC O114 (O114:H-), четыре штамма ETEC O25 (O25:H-), 27 штаммов EIEC (O29:H-, O124:H-, O152:H-, O164:H-) и пять штаммов EHEC 157 (O157:H-).

Методом молекулярного серотипирования у подвижных штаммов DEC были установлены 16 O - серологических групп, из которых 15 совпадали с результатами микробиологического тестирования и одна группа – O145 была установлена молекулярным методом. По результатам детекции генов *fliC*, штаммы шести серологических групп EPEC относились к одному серологическому варианту O26:H11, O55:H6, O111:H2, O119:H6, O125:H6, O126:H2. Штаммы серологических групп *E. coli* O127 и O142 были представлены двумя сероварами: O127:H6 и O127:H40, O142:H6 и O142:H34. ETEC были представлены штаммами двух серологических групп O25:H42 и O128:H7. К патогруппе STEC/EHEC относились штаммы пяти серологических вариантов: O26:H11, O55:H7, O111:H8, O145:H28, O157:H7. Штамм EAgEC O55 относился к неизвестному ранее серовару O55:H21.

Выпускаемые в РФ, диагностические O – сыворотки позволяют идентифицировать 98% известных O-серогрупп EPEC, 63% – EIEC, 37% – ETEC, 24% – STEC и не более 10% – EAgEC. Отсутствие доступных отечественных H - сывороток не позволяет определить серологический вариант штаммов *E. coli*, тем самым снижая достоверную детекцию возбудителя. Кроме того, как показали результаты первичного скрининга, антигенная характеристика *E. coli* не гарантирует достоверную оценку этиологической значимости штамма при диарейных заболеваниях.

Сравнительный анализ геномов 24 штаммов EAgEC на платформе SerotypeFinder 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/Serotype-Finder/>) онлайн-ресурса «Center for Genomic Epidemiology» показал, что по составу нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих синтез O- и H-антигенов, штаммы принадлежали к 10 серогруппам и 13 сероварам: O3:H2, O11:H10, O16:H48, O51:H30, O55:H21, O73:H18, O73:H33, O86:H2, O86:H10, O92:H33, O140:H2, O159:H10. Два штамма имели уникальные нуклеотидные последовательности генов, кодирующих O-антигены, которые отличались от 186 известных O-антигенов, включенных в базу данных SerotypeFinder (O?:H42).

В ходе исследования установлено, что в Российской Федерации в 2014-2018 гг. диарейные заболевания детей и взрослых были обусловлены штаммами DEC, которые принадлежали к разным филогенетическим группам, характеризовались широким разнообразием антигенных вариантов, наличием основных и дополнительных генов вирулентности, кодирующих факторы патогенности, имеющие клиническое и эпидемиологическое значение (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика диареегенных штаммов *E. coli*

О-серогруппа	ОН-серовар	Фило-группа	Гены вирулентности	Подгруппа/патогруппы
Энтеропатогенные <i>E. coli</i>				
O26	O26:H11	B1	<i>eae</i>	a-EPEC
O55	O55:H6	B1	<i>eae</i>	a-EPEC
O111	O111:H2	B1	<i>eae</i>	a-EPEC
O114	O114: H-	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
O119	O119:H6	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
O125	O125:H6	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
O126	O126:H2	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
O127	O127:H6 O127:H40	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
O142	O142:H6 O142:H34	A	<i>eae, bfp</i>	t-EPEC
Энтеротоксигенные <i>E. coli</i>				
O25	O25:H- O25:H42	A	<i>elt</i>	ETEC
		A	<i>elt</i>	ETEC
O128	O128:H7	A	<i>est</i>	ETEC
Энтероинвазивные <i>E. coli</i>				
O29	O29:H-	A	<i>ipaH, invE</i>	EIEC
O124	O124:H-	A	<i>ipaH, ial, invE</i>	EIEC
O152	O152:H-	A	<i>ipaH, ial</i>	EIEC
O164	O164:H-	D	<i>ipaH, invE</i>	EIEC
Шигатоксин-продуцирующие <i>E. coli</i>				
O26	O26:H11	B1	<i>stx1a</i>	STEC
O55	O55:H7	B1	<i>stx1a</i>	STEC
O111	O111:H8	B1	<i>stx1a</i>	STEC
O145	O145:H28	B1	<i>eae, stx2a</i>	EHEC
O157	O157: H7	B1	<i>eae, stx1a, stx2a</i>	EHEC
Энтероаггративные <i>E. coli</i>				
O3	O3:H2	D	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O11	O11:H10	A	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O16	O16:H48	D	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O51	O51:H30	B1	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O55	O55:H21	A	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O73	O73:H18	B2	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
	O73:H33	D	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O86	O86:H2	A	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
	O86:H10	D	<i>aafA</i>	a-EAgEC
O92	O92:H33	B2	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O140	O140:H2	A	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
O159	O159:H10	D	<i>aafA</i>	a-EAgEC
ONT	O?:H42	D	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC
ONT	O?:H?	B2	<i>aggR+aafA</i>	t-EAgEC

Молекулярная характеристика диареегенных *Escherichia coli*

Штаммы DEC по суммарным данным относились к четырем основным филогенетическим группам. К группе А принадлежали 65 (27,9%), В1 – 98 (42,1%), В2 – 54 (23,2%), D – 16 (6,8%) соответственно. Все штаммы STEC, включая ЕНЕС, относились к филогенетической группе В1; ЕТЕС – к группе А; ЕРЕС и ЕІЕС были представлены штаммами двух филогрупп – А и В1 и А и D; ЕАgЕС принадлежали к четырем филогруппам с преобладанием группы D (Рисунок 1).

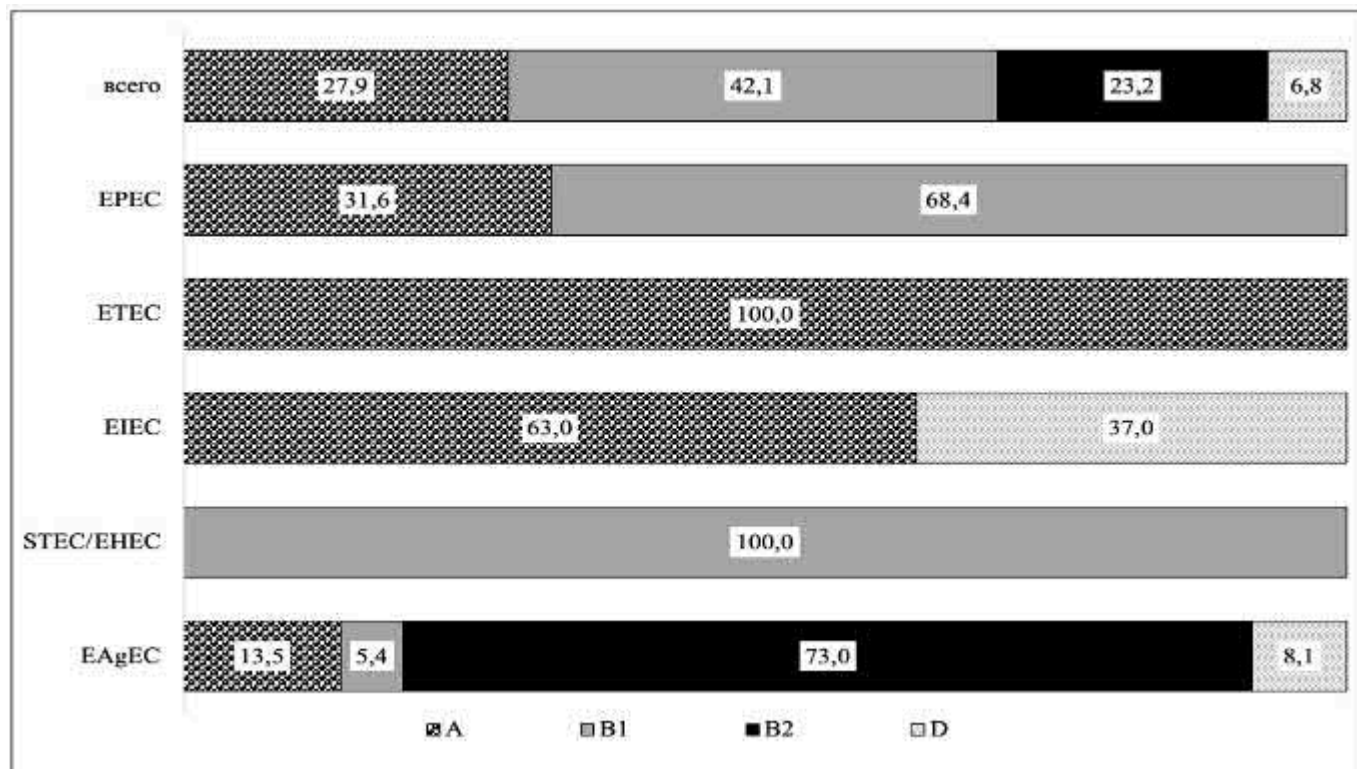


Рисунок 1 – Филогенетические группы штаммов DEC (%)

Энтеропатогенные *E. coli* относились к девяти серологическим группам и 11 серологическим вариантам. ЕРЕС шести серогрупп/восьми сероваров O114:H-, O119:H6, O125:H6, O126:H2, O127:H6, O127:H40, O142:H6 и O142:H34 содержали гены адгезии (*eae* и *bfp*) и принадлежали к «типичным» t-ЕРЕС – возбудителям диарейных заболеваний детей раннего возраста, для которых единственным источником является человек, путь передачи, как правило, контактно - бытовой, реализуемый в условиях детских стационаров, лечебно-профилактических и дошкольных учреждениях (Clarke S. et. al., 2003, Johnston T. et. al., 2010, Ochoa T. et. al., 2011). Штаммы трех сероваров O26:H11, O55:H6 и O111:H2 по наличию гена *eae* и отсутствию гена *bfp* были отнесены к «атипичным» а-ЕРЕС – возбудителям диарейных заболеваний детей и взрослых, резервуаром этих возбудителей являются животные - чаще крупный рогатый скот (КРС), факторами передачи – пищевые продукты животного происхождения (Hu J. et. al., 2015; Gomes T. et. al., 2016).

Шигатоксин-продуцирующие *E. coli*. Исследования последних десятилетий, посвященные изучению STEC, показали наличие в этой патогруппе высоковирулентных для человека штаммов подгруппы энтерогеморрагических *E. coli* (ЕНЕС), которые кроме генов *stx*, кодирующих продукцию шигаподобных токсинов, содержат ген *eae*, кодирующий адгезин интимин – белок наружной мембраны (Подколзин А.Т. и др., 2004; Gomes T. et. al., 2016).

Штаммы STEC, выделенные на территории РФ, принадлежали к пяти серологическим вариантам: O26:H11, O55:H7, O111:H8, O145:H28 и O157:H7, из них ЕНЕС – к двум: O145:H28 и O157:H7. Штаммы различались по типу продуцируемых токсинов (Stx1, Stx2), относились к субтипу «а» – широко распространенному в популяции STEC, выделенных от КРС (Valilis E. et. al., 2018). STEC O26:H11, O55:H7 и O111:H8 содержали ген *stx1a*; ЕНЕС O145:H28 – ген *stx2a*; из восьми ЕНЕС O157:H7 три имели ген *stx1a*, три – *stx2a* и два штамма характеризовались наличием двух генов *stx1a* и *stx2a*.

В последние годы широкое международное распространение получили STEC O26:H11 двух сиквенс-типов ST21 и ST29. В Японии, США, Австралии и многих европейских странах, в которых проводят мониторинг возбудителей STEC-инфекций, этот серовар часто выделяют от больных ОКИ, из проб пищевых продуктов и от КРС (Bielaszewska M. et. al., 2013; Gonzales-Escalona N. et. al., 2016; Ogura Y. et. al., 2017). Биоинформационный анализ результатов полногеномного секвенирования с использованием международных баз данных выявил в российских штаммах STEC O26:H11 детерминанты, кодирующие основной фактор вирулентности STEC - шигаподобный токсин Stx1 (ген *stx1a*), семь дополнительных генов, кодируемых плазмидой pVF (*ehxA*, *katP*, *espP*, *cba*, *gad*, *cif*, *iss*), и принадлежность к сиквенс-типу ST21 – высоковирулентному успешному клону высокого риска. Анализ нуклеотидных последовательностей четырех генов *nleC*, *espP*, *etp*, *katP* с использованием программы BLAST выявил их идентичность штаммам, циркулирующим в настоящее время в Японии, США и Канаде. В России в практических бактериологических лабораториях такие штаммы систематически относят к ЕРЕС.

Энтеротоксигенные *E. coli* принадлежали к трем серологическим вариантам: O25:H-, O25:42, O128:H7 и различались по типу продуцируемых энтеротоксинов. Штаммы ЕТЕС серогруппы O25 имели ген *elt*, кодирующий продукцию термолабильного энтеротоксина (LT), O128:H7 – ген *est*, кодирующий продукцию термостабильного энтеротоксина (ST).

Энтероинвазивные *E. coli* относились к четырем неподвижным серовариантам O29:H-, O124:H-, O152:H- и O164:H-, имели хромосомный ген *ipaH*, кодирующий основной фактор патогенности *Shigella* и ЕИЕС – инвазию, характеризовались гетерогенностью по набору плазмидных генов инвазивности (*ial*, *invE*). В штаммах *E. coli* O29:H- и O164:H- присутствовал ген *invE*, O152:H- ген *ial*, O124:H- *ial* и *invE*.

Энтероаггративные *E. coli* представляют новую патогруппу DEC, вызывают ОКИ у детей и взрослых во всех странах (Подколзин А.Т. и др., 2004; Jensen B. et. al., 2014; Jenkins C. et. al., 2018), не включены в международную классификацию болезней десятого пересмотра (МКБ-10, 1997). Исследования последних лет указывают на появление «гибридных» штаммов EAgEC/ExPEC, способных вызывать заболевания внекишечной локализации – ИМП, уросепсис, менингит и др. (Herzog K. et. al., 2014; Adwan G. et. al., 2016; Nunes K. et. al., 2017; Santos A. et. al., 2020). В РФ нормативно-методические документы по лабораторной диагностике штаммов этой патогруппы отсутствуют.

Коллекция EAgEC была представлена штаммами, выделенными из испражнений пациентов с диарейным синдромом и из мочи пациентов с ИМП. 75% копроизолятов и 100% штаммов, выделенных из мочи, характеризовались гетеропатогенным потенциалом вирулентности – содержали гены EAgEC и UPEC: из них 88,3% и 64,3% штаммов имели ген

aggR и относились к типичным t-EAgEC (Elias W. et. al., 2016; Guerrieri C. et. al., 2019). По сочетанию семи генов, кодирующих факторы вирулентности EAgEC (*aggR*, *aafA*, *aap*, *aatA*, *pet*, *ast*, *aaiA*), штаммы, выделенные из испражнений, характеризовались 15 индивидуальными генотипами, выделенные из мочи – шестью (Таблица 3).

Таблица 3 – Гены вирулентности штаммов EAgEC, выделенных из испражнений и мочи

Гены вирулентности	Биоматериал			
	испражнения (n=60)		моча (n=14)	
	абс (%)	95% ДИ	абс (%)	95% ДИ
типичные (t-EAgEC)				
2 гена вирулентности	14 (23,3)	13,4-36,0	6 (42,9)	17,7-71,1
<i>aggR+astA</i>	2 (3,3)	0,4-11,5	2 (14,3)	1,8-42,8
<i>aggR+aafA</i>	5 (8,3)	2,8-18,4	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aap</i>	7 (11,7)	4,8-22,6	4 (28,6)	8,4-58,1
3 гена вирулентности	14 (23,3)	13,4-36,0	3 (21,4)	4,7-50,8
<i>aggR+aafA+astA</i>	5 (8,3)	2,8-18,4	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap</i>	6 (10,0)	3,8-20,5	3 (21,4)	4,7-50,8
<i>aggR+aafA+aat</i>	3 (5,0)	1,0-13,9	0 (0)	0-23,2
4 гена вирулентности	15 (25,0)	14,7-37,9	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap+aatA</i>	15 (25,0)	14,7-37,9	0 (0)	0-23,2
5 генов вирулентности	5 (8,3)	2,8-18,4	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap+aatA+aaiA</i>	1 (1,7)	0-8,9	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap+aatA+astA</i>	2 (3,3)	0,4-11,5	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap+astA+aaiA</i>	2 (3,3)	0,4-11,5	0 (0)	0-23,2
6 генов вирулентности	5 (8,3)	2,8-18,4	0 (0)	0-23,2
<i>aggR+aafA+aap+aatA+astA+aaiA</i>	5 (8,3)	2,8-18,4	0 (0)	0-23,2
атипичные (a-EAgEC)				
1 ген вирулентности	2 (3,3)	0,4-11,5	1 (7,1)	0,2-33,9
<i>aafA</i>	2 (3,3)	0,4-11,5	1 (7,1)	0,2-33,9
2 гена вирулентности	4 (6,7)	1,9-16,2	4 (28,6)	8,4-58,1
<i>aafA+astA</i>	3 (5,0)	1,0-13,9	3 (21,4)	4,7-50,8
<i>aafA+aatA</i>	1 (1,7)	0-8,9	1 (7,1)	0,2-33,9
4 гена вирулентности	1 (1,7)	0-8,9	0 (0)	0-23,2
<i>aafA+aap+astA+aaiA</i>	1 (1,7)	0-8,9	0 (0)	0-23,2

Полная последовательность генома штамма EAgEC, выделенного от пациента с диарейным синдромом, депонирована в GenBank банке данных NCBI (номера доступа: WAGY000000000.1 - WAGY00000610.1). Штамм по результатам SerotypeFinder принадлежал к серологическому варианту O92:H33. Анализ генома на платформе VirulenceFinder 1.5 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) показал, что штамм принадлежит к гибричному варианту, имеет гены типичных EAgEC – возбудителей диарейных заболеваний (*aaiC*, *aap*, *aatA*, *aaf*, *aggR*, *capU*, *pic*) и уропатогенных *E. coli* (*fyuA*, *iss*, *sat*, *fimH*, *hlyA*) (Таблица 4).

Таблица 4 – Гены факторов вирулентности гибридного штамма *E. coli* O92:H33, выделенного из испражнений пациента с диарейным синдромом

Ген	Идентичность %	Референт/образец, п.н.	Функция белка	Референс-номер
DEC/EAgEC				
<i>aaiC</i>	99,61	507/507	VI тип секреции	FN554766
<i>aap</i>	100	351/351	Антиагрегационный белок, дисперзин	Z32523
<i>aatA</i>	99,68	1239/1239	Транспортер дисперзина	CU928159
<i>aaf</i>	99,8	504/504	Аггегативно – адгезивные фимбрии	SSIAA788
<i>aggR</i>	99,87	799/798	Активатор транскрипции	55989
<i>capU</i>	100	1089/1089	Гомолог гексозилтрансферазы	CU928145
<i>pic</i>	100	4119/4119	Аутопортранспортер сериновой протеазы	AB011549
ExPEC/UPEC				
<i>fyuA</i>	100	2022/2022	Рецептор сидерофора, иерсинибактин	ANAX01000032
<i>iss</i>	99,32	294/294	Устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови	CP001509
<i>sat</i>	99,38	3888/3888	Секретируемый токсин-транспортёр уropатогенных <i>E. coli</i>	JX050263
<i>fimH</i>	100	335/335	Маннозочувствительные фимбрии	CP003289
<i>hlyA</i>	99,9	303/303	α -гемолизин	AP010953

Результаты исследования показали, что неоднородность по генам вирулентности штаммов DEC, принадлежащих к одной серогруппе (O25, O55, O111 и др.) и даже одному серовару O26:H11, диктует необходимость подтверждать молекулярными методами патогенность штамма, так как вызываемые ими заболевания характеризуются различиями в патогенезе и клинической симптоматике, а также эпидемиологическими особенностями (источниками и факторами передачи). От принадлежности возбудителя к определенному патовару (DEC или ExPEC) зависят подходы к лечению, профилактике и проведению противоэпидемических мероприятий. Полученные данные показывают, что важным условием повышения эффективности культурального метода исследования испражнений является адекватный выбор молекулярных методов детекции всех патогрупп DEC.

Чувствительность диареогенных *Escherichia coli* к антимикробным препаратам

Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 82 (35,2%) из 233 штаммов DEC, из них EPEC 52,6%, STEC 45,2%, ETEC 50,0%, EIEC 77,8% и EAgEC 10,8%. У всех штаммов отмечена 100% чувствительность к меропенему и амикацину (Таблица 5). В группе β -лактамов АМП выявлена статистически значимо выраженная активность ингибиторозащищенного аминопенициллина, цефалоспоринов III-IV поколений и карбапенемов по сравнению с ампициллином ($p < 0,05$). Преимущества фторхинолонов (ципрофлоксацин) над хинолинами (налидиксовая кислота), аминогликозидов III и II поколения (амикацин и гентамицин) и комбинированного триметоприма с сульфаниламидом выявлены не были ($p > 0,05$). В популяции возбудителей ОКИ штаммы, продуцирующие БЛРС, значительно преобладали ($p < 0,05$) среди EAgEC (69,2%) по сравнению со штаммами других патогрупп: EPEC (20,0%), STEC (7,7%) и EIEC (3,1%). Среди штаммов ETEC продуценты БЛРС не обнаружены.

Таблица 5 – Чувствительность диареегенных штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам

Антимикробный препарат	EPEC n=76			STEC n=42			ETEC n=14			EIEC n=27			EAgEC n=74		
	abc	%	95% ДИ	abc	%	95% ДИ	abc	%	95% ДИ	abc	%	95% ДИ	abc	%	95% ДИ
ампициллин	51	67,1	55,4-77,5	23	54,8	38,7-70,2	11	78,6	49,2-95,3	5	27,8	9,7-53,5	9	12,2	5,7-21,8
амоксациллин/ клавуланат	66	86,8	77,1-93,5	36	85,7	71,5-94,6	12	85,7	57,2-98,9	17	94,4	72,7-99,9	31	41,9	30,5-53,9
цефтазидим	68	89,5	80,3-95,3	38	90,5	77,4-97,3	14	100	76,8-100	17	94,4	72,7-99,9	28	37,8	26,8-49,9
цефотаксим	63	82,9	72,5-90,6	34	81,0	65,9-91,4	14	100	76,8-100	16	88,9	65,3-98,6	29	39,2	28,0-51,2
цефепим	72	94,7	87,1-98,6	39	92,9	80,5-98,5	14	100	76,8-100	16	88,9	65,3-98,6	31	41,9	30,5-53,9
меропенем	76	100	95,3-100	42	100	91,6-100	14	100	76,8-100	18	100	81,5-100	74	100	95,1-100
налидиксовая кислота	61	80,3	69,5-88,5	34	81,0	65,9-91,4	11	78,6	49,2-95,3	15	83,3	58,6-96,4	49	66,2	54,3-76,8
ципрофлоксацин	62	81,6	71,0-89,6	34	81,0	65,9-91,4	11	78,6	49,2-95,3	15	83,3	58,6-96,4	64	86,5	76,6-93,3
гентамицин	68	89,5	80,3-95,3	39	92,9	80,5-98,5	12	85,7	57,2-98,9	15	83,3	58,6-96,4	49	66,2	54,3-76,8
амикацин	76	100	95,3-100	42	100	91,6-100	14	100	76,8-100	18	100	81,5-100	49	66,2	54,3-76,8
тетрациклин	62	81,6	71,0-89,6	36	85,7	71,5-94,6	12	85,7	57,2-98,9	13	72,2	46,5-90,3	21	28,4	18,5-40,1
хлорамфеникол	72	94,7	87,1-98,6	40	95,2	83,8-99,4	14	100	76,8-100	17	94,4	72,7-99,9	34	45,9	34,3-57,9
нитрофурантоин	73	96,1	88,9-99,2	41	97,6	87,4-99,9	14	100	76,8-100	18	100	81,5-100	73	98,6	92,7-100
сульфаниламид	58	76,3	65,2-85,3	36	85,7	71,5-94,6	10	71,4	41,9-91,6	15	83,3	58,6-96,4	55	74,3	62,8-83,8
триметоприм/ сульфаметоксазол	58	76,3	65,2-85,3	36	85,7	71,5-94,6	12	85,7	57,2-98,9	16	88,9	65,3-98,6	28	37,8	26,8-49,9

Характеристика биологических свойств штаммов *Escherichia coli* – возбудителей заболеваний внекишечной локализации

Коллекция ExPEC включала 301 штамм, выделенных из биоматериалов (кровь, моча, раневое отделяемое, мокрота, перитонеальная жидкость) пациентов, проходивших стационарное или амбулаторное лечение. Статистически значимо ($p < 0,05$) штаммы *E. coli* принадлежали к филогенетическим группам B2 – 153 (50,8%, 95% ДИ 45,0 - 56,6) и D – 92 (31,5%, 95% ДИ 27,3 - 36,5), к которым, как правило, относят ExPEC. К группам A и B1 относились 35 (11,6%, 95% ДИ 8,2 - 15,8) и 21 (7,0%, 95% ДИ 4,4 - 10,5) штаммов, с которыми ассоциируют комменсальные *E. coli*. Патогенетически значимые для возбудителей заболеваний внекишечной локализации детерминанты вирулентности были выявлены у 96,0% штаммов. Распространенность 17 генов, кодирующих факторы вирулентности ExPEC, ассоциированные с адгезией (*fimH*, *pap*, *afa*, *sfa* и *focG*), синтезом сидерофоров (*fyuA* и *iutA*), капсул (*kpsMTII*, *kpsMTIII* и *kpsMT K1*), токсинов (*hlyA*, *cnf*, *cdt* и *cvaC*), инвазинов (*ibeA*), а также с резистентностью к действию сыворотки (*traT*) и наличием острова патогенности UPEC (*PAI*), в штаммах, выделенных из различных биоматериалов, представлена в таблице 6. Анализ наличия генетических детерминант ExPEC показал, что гены, ассоциированные с адгезией, синтезом токсинов, сидерофоров и капсул, без статистически значимых различий ($p > 0,05$) встречались в штаммах *E. coli* независимо от локализации инфекционного процесса.

Генетические детерминанты вирулентности ExPEC в изученных штаммах присутствовали в сочетаниях и изолированно. В геномах 1,7% (95% ДИ 0,5-3,8%) штаммов – по одному гену вирулентности; 98,3% (95% ДИ 96,2-99,5%) штаммов характеризовались наличием комбинаций от двух до десяти генов. По сочетанию 17 генов, выявлены 206 индивидуальных генотипов вирулентности.

Маркеры неблагоприятного прогноза течения ИМП содержали 12% штаммов, из них 10,7% имели гены, ассоциированные с развитием сепсиса (*sfa* и *kpsK1*), и 1,3% – менингита по наличию гена *ibeA*, ответственного за инвазию эндотелия сосудов головного мозга.

Основную сложность при интерпретации результатов бактериологического исследования представляют изоляты, выделенные из мочи и перитонеальной жидкости, за счет возможной контаминации и отсутствия конкретных алгоритмов детекции штаммов ExPEC. Согласно ряду исследовательских работ, критерием отнесения изолята к ExPEC является наличие двух или более основных генов вирулентности (*pap*, *sfa*, *afa*, *kpsMTII*, *iutA*). Другие, так называемые дополнительные гены (*fimH*, *hlyA*, *cvaC*, *cnf*, *cdtB*, *kpsMTIII*, *ibeA*, *traT* и *PAI*), могут быть потенциально связаны с ExPEC, так как способствуют адаптивной и конкурентной колонизации (Russo T. et. al., 2003; Johonson J., et. al., 2005). Все штаммы *E. coli*, выделенные из крови, мокроты, раневого отделяемого и мочи, пациентов с ИСМП, а также из перитонеальной жидкости (87,7%) и мочи амбулаторных пациентов (93,0%) удовлетворяли критериям ExPEC – имели от трех до десяти генов, принадлежали к филогруппам B2 и D. 19,3% штаммов, выделенные из перитонеальной жидкости (12,3%) и мочи амбулаторных пациентов (7,0%), принадлежали к филогруппам A и B1, не имели основных и дополнительных генов вирулентности и были расценены как контаминанты.

Таблица 6 – Частота встречаемости генов, кодирующих факторы вирулентности в штаммах *E. coli*, выделенных из различных биоматериалов

Гены и факторы вирулентности	Вид биологического материала												Всего*** n=301		
	моча n=194			мокрота n=12			раневое отделяемое n=25			перитонеальная жидкость, n=65					
	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ
Адгезины	192	98,7	96,3-99,9	12	100	73,5-100	24	96,0	79,7-99,9	57	87,7	77,2-94,5	296	98,3	96,2-99,5
<i>fimH</i>	181	93,3	88,8-96,4	12	100	73,5-100	24	96,0	79,7-99,9	57	87,7	77,2-94,5	281	93,4	89,9-95,9
<i>pap</i>	57	29,4	23,1-36,3	6	50,0	21,1-78,9	8	32,0	15,0-53,5	17	26,2	16,0-38,5	92	30,6	25,4-36,1
<i>afa</i>	15	7,7	4,4-12,4	2	16,7	2,1-48,4	1	4,0	0,1-20,4	8	12,3	5,5-22,8	27	9,0	6,0-12,8
<i>sfa</i>	15	7,7	4,4-12,4	0	0,0	0,0-26,5	1	4,0	0,1-20,4	4	6,2	1,7-15,0	20	6,6	4,1-10,1
<i>focG</i>	6	3,1	1,1-6,6	0	0,0	0,0-26,5	0	0,0	0,0-13,7	4	6,2	1,7-15,0	10	3,3	1,6-6,0
Токсины	94	48,5	41,2-55,7	7	58,3	27,7-84,8	9	36,0	18,0-57,5	12	18,5	9,9-30,0	122	40,5	34,9-46,3
<i>hlyA</i>	41	21,1	15,6-27,6	4	33,3	9,9-65,1	4	16,0	4,5-36,1	6	9,2	3,5-19,0	56	18,6	14,4-23,5
<i>cnf</i>	34	17,5	12,5-23,6	3	25,0	5,6-57,2	7	32,0	15,0-53,5	9	13,8	6,5-24,7	55	18,3	14,1-23,1
<i>cvaC</i>	30	15,5	10,7-21,3	1	8,3	0,2-38,5	1	4,0	0,1-20,4	5	7,7	2,5-17,1	37	12,3	8,8-16,5
Инвазины	4	2,1	0,6-5,2	0	0,0	0,0-26,5	0	0,0	0,0-13,7	0	0,0	0,0-5,5	4	1,3	0,4-3,4
<i>ibeA</i>	4	2,1	0,6-5,2	0	0,0	0,0-26,5	0	0,0	0,0-13,7	0	0,0	0,0-5,5	4	1,3	0,4-3,4
Сидерофоры	194	100	98,1-100	11	91,7	61,5-99,8	24	96,0	79,7-99,9	41	63,1	50,2-74,7	275	91,4	87,6-94,3
<i>fyuA</i>	166	85,6	79,8-90,2	11	91,7	61,5-99,8	21	84,0	63,9-95,5	35	53,8	41,0-66,3	240	79,7	74,7-84,1
<i>iutA</i>	161	83,0	77,0-88,0	11	91,7	61,5-99,8	22	88,0	68,8-97,5	35	53,8	41,0-66,3	235	78,1	72,9-82,6
Капсула	120	61,9	54,6-68,7	6	50,0	21,1-78,9	12	48,0	27,8-68,7	40	61,6	48,6-73,4	165	54,8	49,0-60,5
<i>kpsMT III</i>	47	24,2	18,4-30,9	3	25,0	5,6-57,2	9	36,0	18,0-57,5	13	20,0	11,1-31,8	72	23,9	19,2-29,2
<i>kpsMT K1</i>	53	27,3	21,2-34,2	0	0,0	0,0-26,5	0	0,0	0,0-13,7	7	10,8	4,4-20,9	60	19,9	15,6-24,9
<i>kpsMT II</i>	57	29,4	23,1-34,2	3	25,0	5,6-57,2	3	12,0	2,6-31,2	27	41,5	29,4-54,4	93	30,9	25,7-36,5
Другие															
<i>traT*</i>	115	59,3	52,0-66,3	11	91,7	61,5-99,8	21	84,0	63,9-95,5	40	61,5	48,6-73,4	192	63,8	58,1-69,2
<i>PAI**</i>	71	36,6	29,8-43,8	6	50,0	21,1-78,9	11	44,0	24,4-65,1	0	0,0	0,0-5,5	93	30,9	25,7-36,5

Примечание: * фактор устойчивости бактериальной клетки к бактерицидному действию сыворотки крови;

** остров патогенности уropатогенных *E. coli*; *** с учетом штаммов, выделенных из крови

Характеристика биологических свойств штаммов *Escherichia coli* – представителей микробиоты кишечника

В настоящее время актуальным научным направлением является изучение видовой структуры и патогенного потенциала симбиотических микроорганизмов, колонизирующих кишечник, для оценки возможных рисков возникновения заболеваний, вызываемых постоянно живущими при человеке бактериями (Vila J. et. al., 2016; Юдин С. М. и др., 2018).

В исследование были включены 499 типичных (лактозоположительных) штаммов *E. coli*, выделенных из испражнений взрослых жителей Санкт-Петербурга без клинических признаков острых и хронических заболеваний ЖКТ. Штаммы не содержали гены вирулентности DEC (EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAEC), что позволило отнести их к облигатным факультативно-анаэробным индигенным представителям биоценоза кишечника. Молекулярными методами установлено значимое превалирование штаммов филогенетической группы А – 62,7% (95% ДИ 58,3-67,0%), к которой, как правило, относят комменсальные *E. coli* (Clermont O. et. al., 2000; Tenaillon D. et. al., 2010; Raimondi S. et. al., 2019). К группе В1 принадлежали 3,2% (95% ДИ 1,8-5,2%); В2 – 22,4% (95% ДИ 18,9-2,4%); D – 11,6% (95% ДИ 9,0-14,8%) штаммов соответственно. Детекция генов вирулентности ExPEC, ассоциированных с адгезией: кодирующих фимбрии I типа (*fimH*), имеющих высокий тропизм к рецепторам мочевыводящих путей, пиелонефрит – ассоциированные пили (*pap*), производные сиаловой кислоты S-фимбрии (*sfa*) и афимбриальные адгезины (*afa*); синтезом компонентов системы утилизации железа – сидерофора аэробактина (*iutA*) и определяющих секрецию токсинов – α -гемолизина (*hlyA*) и цитонекротического фактора (*cnf*), выявила их неравномерное присутствие в штаммах разных филогенетических групп. У 306 (61,3%) из 499 штаммов *E. coli* – представителей нормобиоты кишечника гены вирулентности ExPEC отсутствовали, остальные штаммы имели гены вирулентности ExPEC, которые с разной частотой встречались в штаммах четырех филогенетических группах (Рисунок 2).

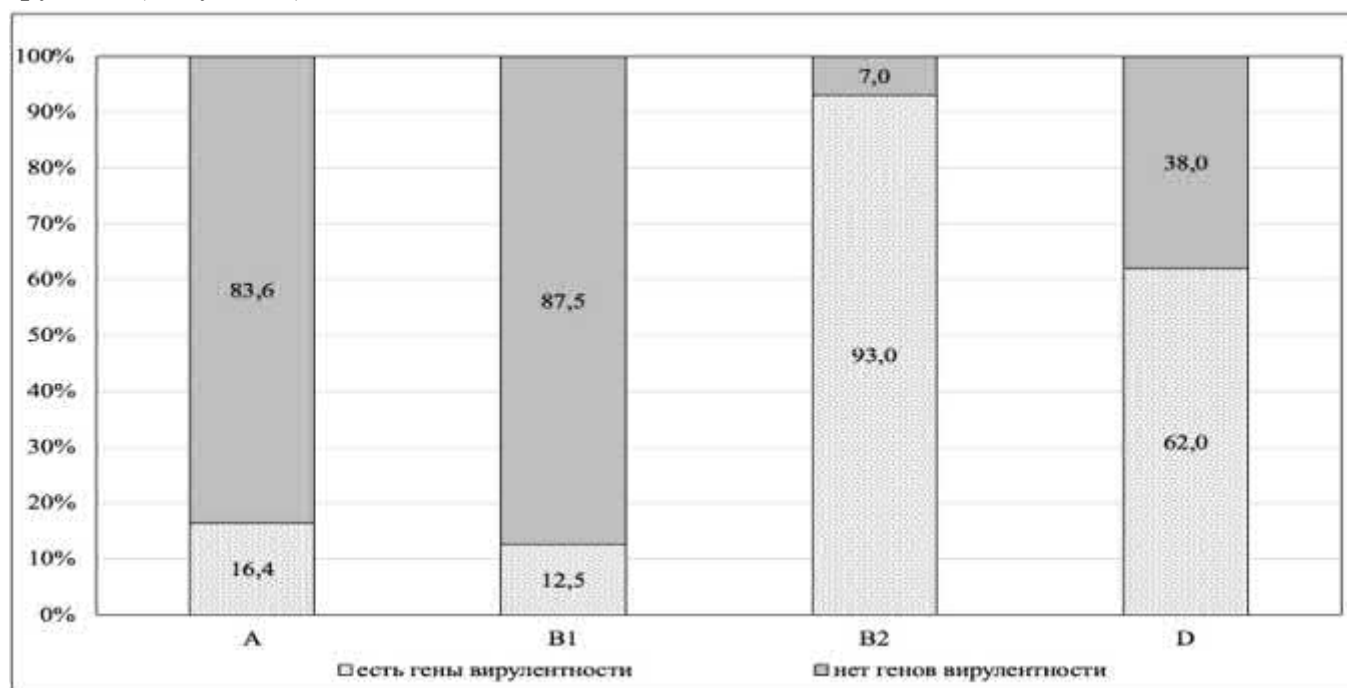


Рисунок 2 – Частота встречаемости генов ExPEC в штаммах *E. coli* различных филогенетических групп

Среди *E. coli* филогрупп А и В1 значимо реже встречались штаммы, у которых присутствовали гены, ассоциированные с ExPEC – 16,4% и 12,5%, по сравнению со штаммами филогрупп В2 и D – 93,0% и 62,0% соответственно. Высоким потенциалом развития внекишечных инфекций (ИМП) характеризовались 38,7% штаммов, в том числе 22,8% – сепсиса и вторичного менингита.

Полученные результаты подтверждают, что микробиота кишечника человека, может рассматриваться как резервуар ExPEC – эндогенных потенциальных уропатогенов (преморбидный этап) (Гриценко В. А. и др., 2012; Conway T. et. al., 2015). Приведенные данные свидетельствуют о необходимости изучения биоценоза кишечника, которое существенно дополнит традиционные представления о биологических свойствах *E. coli* как облигатного представителя нормобиоты кишечника.

Характеристика резистентности к антимикробным препаратам популяции *Escherichia coli*, выделенных от больных и здоровых лиц

Для характеристики резистентности и механизмов устойчивости к β-лактамам антибиотикам изучены 1033 штамма *E. coli*, которые включали возбудителей внекишечных внутрибольничных (ИСМП) и внебольничных инфекций, острых кишечных инфекций, а также представителей нормобиоты кишечника. В изученной популяции *E. coli* чувствительными ко всем АМП были 27% штаммов, за исключением возбудителей внутрибольничных инфекций (ИСМП), среди которых такие штаммы отсутствовали. Резистентность была отмечена ко всем группам АМП: β-лактамам, включая карбапенемы, хинолонам/фторхинолонам, аминогликозидам, тетрациклину, хлорамфениколу, нитрофуранам, сульфаниламидам и триметоприму. Характеристика резистентности к АМП штаммов *E. coli* представлена на рисунке 3 и таблице 7.

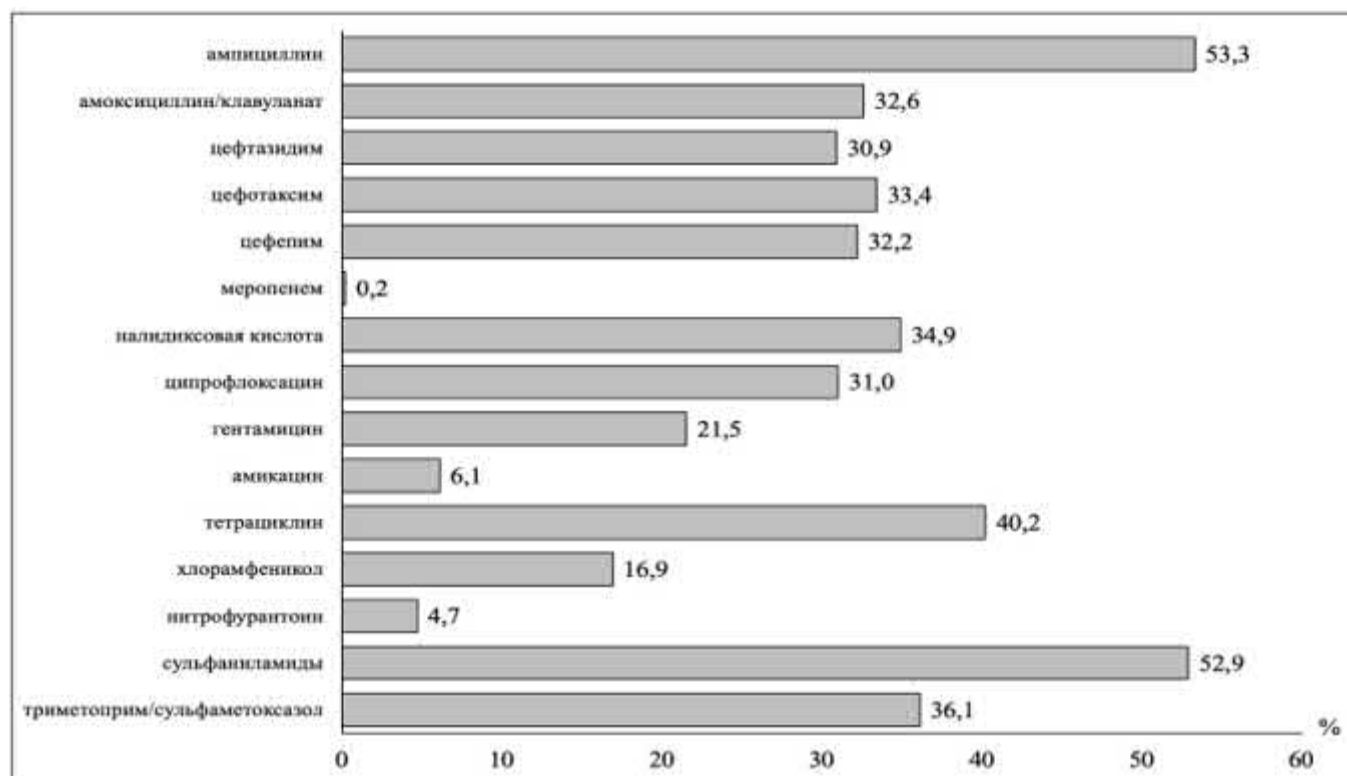


Рисунок 3 – Частота резистентных к антибиотикам штаммов в изученной популяции *E. coli*

Таблица 7 – Общая характеристика резистентности к АМП штаммов *E. coli*

Антимикробный препарат	Группа 1 <i>E. coli</i> – возбудители ОКИ (DEC) n = 233			Группа 2 <i>E. coli</i> – возбудители ГСИ n = 165			Группа 3 <i>E. coli</i> – возбудители ИСМП n = 136			Группа 4 <i>E. coli</i> нормобиота кишечника n = 499			Итого n = 1033		
	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ	абс	%	95% ДИ
ампициллин	126	54,1	47,5-60,6	103	62,4	54,6-69,8	136	100	97,3-100	186	37,3	33,0-41,7	551	53,3	50,2-56,4
амоксациллин / клавуланат	68	29,2	23,4-35,5	74	44,8	37,1-52,8	123	90,4	84,2-94,8	72	14,4	11,5-17,8	337	32,6	29,8-35,6
цефтазидим	64	27,5	21,8-33,7	72	43,6	35,9-51,6	132	97,1	92,6-99,2	51	10,2	7,7-13,2	319	30,9	28,1-33,8
цефотаксим	76	32,6	26,6-39,1	74	44,8	37,1-52,8	135	99,3	95,9-99,9	60	12,0	9,3-15,2	345	33,4	30,5-36,4
цефепим	59	25,3	19,9-31,4	74	44,8	37,1-52,8	136	100	97,3-100	54	10,8	8,2-13,9	333	32,2	29,4-35,2
меропенем	0	0	0-1,6	0	0	0-2,2	2	1,5	0,2-5,2	0	0	0-0,7	2	0,2	0-0,7
налидиксовая кислота	59	25,3	19,9-31,4	98	59,4	51,5-66,9	103	75,7	67,6-82,7	101	20,2	16,8-24,0	361	34,9	32,0-37,9
ципрофлоксацин	45	19,3	14,5-25,0	93	56,4	48,4-64,1	99	72,8	64,5-80,1	83	16,6	13,5-20,2	320	31,0	28,2-33,9
гентамицин	44	18,9	14,1-24,5	38	23,0	16,8-30,2	85	62,5	53,8-70,7	55	11,0	8,4-14,1	222	21,5	19,0-24,1
амикацин	2	0,9	0,1-3,1	9	5,5	2,5-10,1	41	30,1	22,6-38,6	11	2,2	1,1-3,9	63	6,1	4,7-7,7
тетрациклин	85	36,5	30,3-43,0	97	58,8	50,9-66,4	99	72,8	64,5-80,1	134	26,9	23,0-31,0	415	40,2	37,2-43,2
хлорамфеникол	47	20,2	15,2-25,9	35	21,2	15,2-28,3	52	38,2	30,0-47,0	41	8,2	5,9-11,0	175	16,9	14,7-19,4
нитрофурантоин	5	2,1	0,7-4,9	9	5,5	2,5-10,1	20	14,7	9,2-21,8	15	3,0	1,7-5,0	49	4,7	3,5-6,2
сульфаниламид	54	23,2	17,9-29,1	91	55,2	47,2-62,9	117	86,0	79,1-91,4	124	24,8	21,1-28,9	546	52,9	49,8-55,9
триметоприм / сульфаметоксазол	78	33,5	27,5-39,9	65	39,4	31,9-47,3	100	73,5	65,3-80,7	130	26,1	22,3-30,1	373	36,1	33,2-39,1
Всего	151	64,8	58,3-70,9	146	88,5	82,6-92,9	136	100	97,3-100	321	64,3	60,0-68,5	754	73,0	70,2-75,7

Штаммы *E. coli*, входящие в состав нормобиоты кишечника, значительно реже (14,2%) были резистентные к АМП по сравнению с возбудителями внекишечных внутрибольничных, внебольничных и острых кишечных инфекций. Штаммы с фенотипом множественной резистентности (MDR) значительно чаще ($p < 0,05$) встречались в группе возбудителей внутрибольничных инфекций (ИСМП) – 100% по сравнению с внебольничными ГСИ – 65,5% и ОКИ – 43,8%: из них резистентными к цефалоспорином III–IV поколения были 100%, 43,0% и 27,9% соответственно. Молекулярными методами установлено, что в каждой субпопуляции *E. coli* резистентность к цефалоспорином III–IV поколения была обусловлена единым (общим, глобальным) механизмом – продукцией БЛРС генетического семейства CTX-M (Рисунок 4), а также появлением штаммов (43,0%), содержащих несколько (до четырех) генов β -лактамаз различных классов. Подобная ситуация является отражением аллодемии – наличие множества генетических источников (генов, мобильных элементов и клонов), формирующих пул резистентных микроорганизмов с одновременным распространением разных ферментов (Ваquerо F. et. al., 2002; Шек Е.А. и др., 2018). В популяции возбудителей ОКИ штаммы, продуцирующие БЛРС, значительно чаще ($p < 0,05$) относились к патогруппе EAgEC (69,2%) по сравнению со штаммами других патогрупп: EPEC (20,0%), STEC (7,7%) и EIEC (3,1%). Среди штаммов ETEC продуценты БЛРС выделены не были.

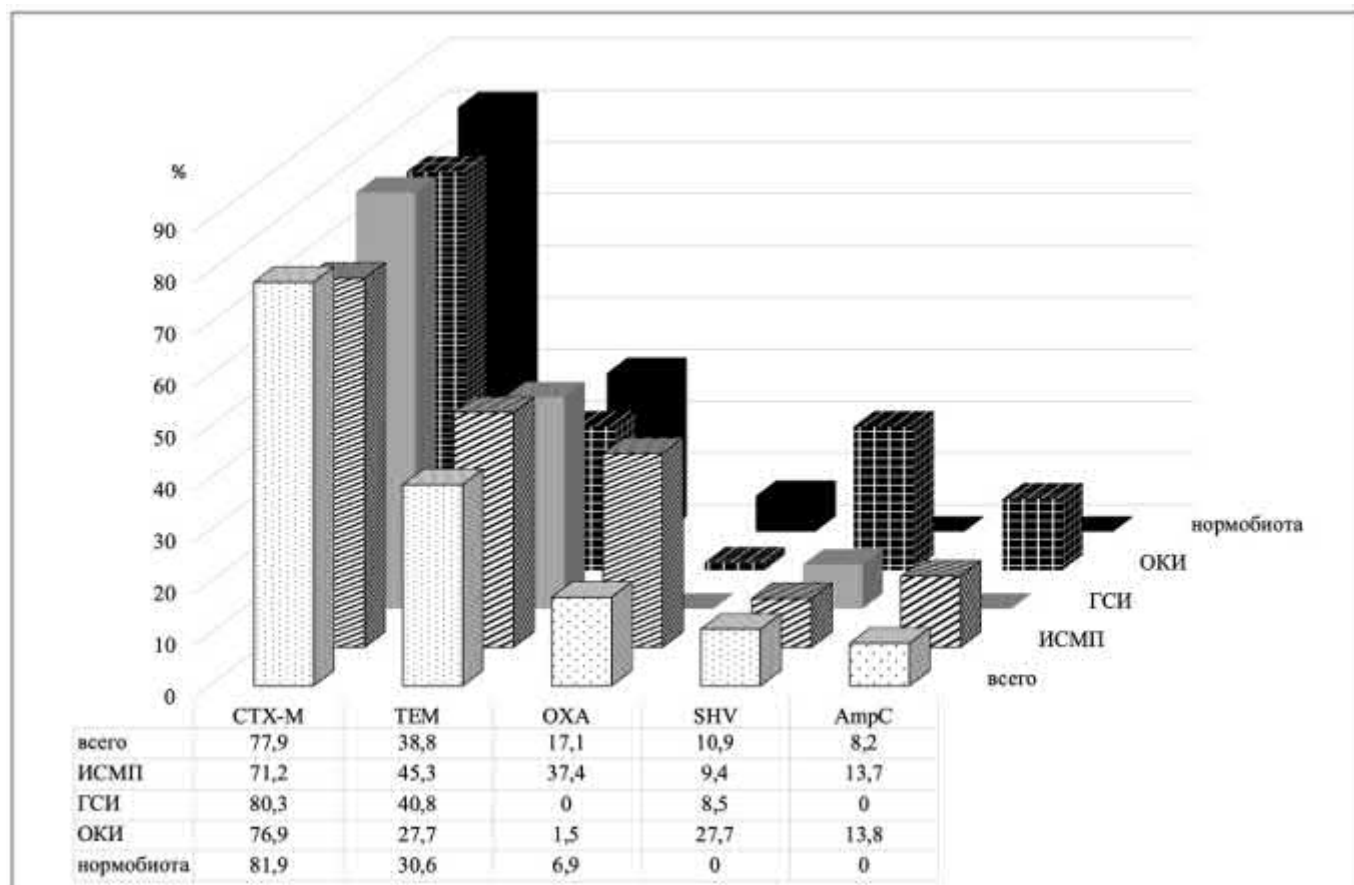


Рисунок 4 – Бета-лактамазы расширенного спектра в популяции *E. coli*

Среди ExPEC доминирующим вариантом CTX-M была эпидемически значимая цефалоспориноаза CTX-M-15, ассоциируемая с вирулентным клоном высокого риска пандемического распространения *E. coli* ST131, которым в течение последних двух

десятилетий обусловлены внутрибольничные вспышки и внебольничные случаи ИМП во многих странах мира (Johnson J. et.al., 2010; Nicolas-Chanoin M. et. al., 2014; Alghoribi M. et.al., 2015; Raeisour M., et.al., 2018). У резистентных к карбапенемам штаммов были выявлены гены двух β - лактамаз: CTX-M-15 и NDM металло- β - лактамаза.

Проведенное MLST - типирование 136 штаммов ExPEC – возбудителей ИСМП выявило 28 индивидуальных сиквенс-типов, со значимым доминированием (72,1%) трех международных клонов высокого эпидемического риска ST131 (34,6%), ST38 (19,1%), ST405 (18,4%). Полученные результаты подтверждают сформировавшееся представление о популяционной структуре резистентных *E. coli*, которую характеризуют как «эпидемическая» за счет доминирования нескольких успешных клонов на фоне выраженного разнообразия генотипов (ST). Подобная ситуация возникает в результате селекции штаммов из большого числа неродственных клонов, обладающих высокой частотой рекомбинаций и способных адаптироваться к меняющимся условиям существования. Такие «адаптивные» клоны со временем приобретают широкое глобальное распространение среди клинически значимых возбудителей, отвечая на селективное давление АМП – формированием MDR - и XDR - фенотипов (Magiorakos A. et. al., 2012).

Штаммы *E. coli* ST38, выделенные из мочи, характеризовались MDR - фенотипом и гетеропатогенным генотипом – содержали гены ExPEC (UPEC) и DEC (EAgEC). Наличие широкого спектра генов свидетельствует о формировании этой генетической линии из множества источников генов резистентности и вирулентности, а не клональной экспансии из одного источника. По данным литературы, *E. coli* ST38 относят к высоковирулентным гибридным штаммам UPEC / EAgEC (Chattaway M. et. al., 2014).

E. coli ST405 часто вызывают жизнеугрожающее осложнение – уросепсис, что подтверждается находками штаммов этого ST во всех изученных пробах биологического материала, включая пробы крови - до 80% (Doumith, M. et. al., 2015).

E. coli ST131 в течение последних десятилетий получил глобальное распространение как возбудитель внебольничных ИМП и ИСМП. *E. coli* O25:H4-B2-ST131 является ведущим возбудителем патогруппы ExPEC во многих странах мира, включая Россию, характеризуется высоким потенциалом вирулентности и резистентности к АМП (Nicolas-Chanoin M.-H. et. al., 2014; Matsumura Y. et. al., 2017; Park J. et. al., 2018; Sepp E. et. al., 2019). Целенаправленный поиск штаммов *E. coli* O25:H4-B2-ST131, принадлежащих к пандемическому международному клону высокого риска, среди возбудителей внекишечных внебольничных заболеваний, а также представителей нормобиоты кишечника, выявил, что к этому клону относились 17,0% изолятов, выделенных из мочи, 9,2% - из перитонеальной жидкости и 3,0% штаммов, входящих в состав нормобиоты кишечника.

В заключительном разделе работы приведены «ошибки» интерпретации результатов лабораторных исследований, проведенных культуральным методом, при обосновании этиологической значимости штаммов *E. coli* как возбудителей ОКИ. Штаммы трех серогрупп O6 (n = 380), O25 (n = 27) и O144 (n = 259), выделенные из испражнений детей и взрослых, обследованных по клиническим и эпидемическим показаниям, были реидентифицированы молекулярным методом. Гены вирулентности DEC (EPEC, ETEC, ENEC, EIEC, EAgEC) не были выявлены ни у одного штамма. *E. coli* O6 и O25 принадлежали

к филогенетической группе B2, с которой ассоциируют ExPEC, штаммы серогруппы O144 принадлежали к филогенетической группе A, к которой, как правило, принадлежат непатогенные (комменсальные) *E. coli*. Методом молекулярного серотипирования установлены серологические варианты штаммов *E. coli*: O6:H1, O6:H5, O6:H7, O25:H4 и O144:H45. По наличию 11 генов, кодирующих адгезию (*pap*, *fimH*, *sfa*, *afa*), продукцию токсинов (*hlyA*, *cnf*), сидерофоров (*fyuA*, *chu*, *iutA*), все штаммы *E. coli* O6 и O25 относились к возбудителям внекишечных заболеваний, в частности ИМП, что согласуется с данными литературы о том, что кишечник человека является естественным резервуаром штаммов ExPEC (Камалов А.А. и др., 2015; Erjavec M. et al., 2015; Дружинин В.Г. и др., 2018). Штаммы *E. coli* O144:H45 не имели ни один из тестируемых генов ExPEC. *E. coli* O25:H4 относились к широко распространенному успешному международному клону высокого риска пандемического распространения ST131 (Таблица 8).

Таблица 8 – Результаты реидентификации штаммов *E. coli* серогрупп O6, O25, O144

Культуральный метод		Молекулярный метод		
О-группа	Результат	Серовар	Гены вирулентности	Результат
O6	ETEC	O6:H1	<i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i> , <i>kpsMTIII</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyA</i>	ExPEC/UPEC
		O6:H5	<i>pap</i> , <i>kpsMT II</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyA</i> , <i>cnf</i>	ExPEC/UPEC
		O6:H7	<i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>kpsMT III</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyA</i>	ExPEC/UPEC
O25	ETEC	O25:H4	<i>pap</i> , <i>sfa</i> , <i>afa</i> , <i>iutA</i> , <i>hlyA</i>	ExPEC /UPEC *
O144	EIEC	O144:H45	отсутствуют	Не патоген

Примечание: * O25:H4-B2-ST131

При выделении *E. coli* из биоматериала мы сталкиваемся с серьезной проблемой доказательства этиологической значимости находки. Представленные результаты свидетельствуют, что выделение из испражнений *E. coli* с типичными культуральными свойствами, принадлежащих к определенным О-группам, не является бесспорным доказательством их этиологической значимости как возбудителей диарейных заболеваний, так как поиск патогенных *E. coli* проводится в присутствии облигатных *E. coli* – представителей нормобиоты популяционной плотности 10^7 - 10^8 КОЕ/грамм фекалий.

Патогенность не является видовым признаком *E. coli*. Однако в процессе эволюции вида (за счет горизонтального переноса генов) в штаммах *E. coli* с различными О- и Н-антигенами появились генетические элементы, кодирующие факторы вирулентности, сочетание которых позволило выделить множество не таксономических групп - патоваров. Поскольку реализация патогенного потенциала ограничена набором генетических детерминант, дифференциация комменсальных и патогенных штаммов *E. coli*, принадлежащих к одной серологической группе, приобретает важное значение для диагностики заболеваний кишечной и внекишечной локализации.

Проведенные исследования показали, что использование молекулярных методов в лабораторной диагностике диарейных заболеваний позволяет выявлять штаммы всех патогрупп диареогенных *E. coli*. Детекция комплекса генов в штаммах *E. coli*, выделенных при внекишечных заболеваниях, подтверждает не только этиологическую значимость изолята, но и позволяет оценить патогенный потенциал развития тяжелых жизнеугрожающих осложнений (сепсис, менингит).

Таким образом, выявленная гетерогенность популяции патогенных *E. coli* свидетельствует о необходимости оптимизации алгоритма лабораторной диагностики не только ОКИ, но и заболеваний внекишечной локализации.

Сочетание стандартных микробиологических методов культивирования с молекулярно-генетическими, включая полногеномное секвенирование, использование стандартизованных программ анализа и международных баз данных, позволяет оценить этиологическую значимость выделенного штамма *E. coli*, получить подробную информацию о генетической и клональной характеристике, предполагаемых источниках и конкретных факторах передачи, а также выявлять на территории Российской Федерации международные клоны высокого риска, оценивать их эволюцию и географию циркуляции.

ВЫВОДЫ

1. Включенные в исследование возбудители острых кишечных инфекций – *E. coli* различных серологических вариантов принадлежали к пяти патогруппам (энтеропатогенные, шигатоксин-продуцирующие, энтеротоксигенные, энтероинвазивные, энтероаггративные) и обладали вариабельными наборами генов, кодирующих антигены и факторы вирулентности, определяющие клиническую и эпидемиологическую значимость штаммов.
2. У штаммов, возбудителей внекишечных заболеваний, выявлено 206 индивидуальных генотипов вирулентности, ассоциированных с уропатогенными *E. coli*, из них 10,7% штаммов имели детерминанты септицемических *E. coli*, 1,3% – менингеальных *E. coli*; 14,9% штаммов, возбудителей инфекций мочевыводящих путей характеризовались гибридным энтероаггративным / уропатогенным (EAgEC/UPEC) генотипом.
3. Гены, кодирующие факторы вирулентности диареегенных и уропатогенных *E. coli*, содержали 79,7% штаммов патогруппы энтероаггративных *E. coli*.
4. Множественная устойчивость к антимикробным препаратам выявлена в субпопуляциях возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (100%), внекишечных (65,5%), диарейных (43,8%) заболеваний и нормобиоты кишечника (33,7%). Штаммы с экстремальной резистентностью встречались во всех субпопуляциях *E. coli*, однако значимо чаще среди возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (32,4%; $p < 0,05$), по сравнению с возбудителями гнойно-септических (12,0%), диарейных (6,9%) инфекций и нормобиоты кишечника – (2,4%).
5. В общей популяции *E. coli* продуцентами бета – лактамаз расширенного спектра были 33,4% штаммов, включая возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (100%), гнойно – септических инфекций (43,0%), острых кишечных инфекций (27,9%), нормобиоты кишечника (14,4%). Устойчивость к цефалоспорином III–IV поколения обусловлена продукцией бета-лактамаз расширенного спектра генетического семейства CTX-M (77,0%) клональных групп CTX-M1 и CTX-M9.
6. Микробиота кишечника человека является скрытым резервуаром патогенных *E. coli* – возбудителей гнойно-септических заболеваний, инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с множественной резистентностью к антимикробным препаратам, в том числе, международного клона высокого эпидемического риска *E. coli* O25:H4-B2-ST131.

7. Выявление в популяции *E. coli* штаммов STEC O26:H11-B1-ST21 – возбудитель диарейных заболеваний и ExPEC O25:H4-B2-ST131 – возбудитель внекишечных заболеваний, свидетельствует о циркуляции в Российской Федерации высоковирулентных резистентных к антимикробным препаратам международных клонов высокого риска пандемического распространения.

8. Оценка этиологической значимости штамма *E. coli* как возбудителя острой кишечной инфекции на основе антигенной характеристики в 80% случаев затрудняет интерпретацию результатов исследования и приводит к диагностическим ошибкам. Определение принадлежности к серологической группе без подтверждения присутствия генов вирулентности не позволяет достоверно определить патогенный потенциал штамма возбудителя.

9. Учитывая значимую роль *E. coli* в патологии человека, целесообразно пересмотреть существующие принципы и этапы лабораторного исследования. Идентификация штаммов *E. coli* наравне с определением фенотипических свойств должна включать детекцию генов вирулентности для подтверждения этиологической значимости выделенного штамма.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Результаты работы обосновывают необходимость использования молекулярных методов, подтверждающих патогенность выделенного изолята *E. coli*, для обоснования его этиологической значимости.

2. Для повышения эффективности диагностики эшерихиозов необходимо переоснащение бактериологических лабораторий и внедрение высокотехнологичных исследований, обеспечивающих детекцию антигенного комплекса, генов/факторов вирулентности и резистентности.

3. Проводить детекцию генов вирулентности, резистентности к антибиотикам и других биологических свойств *E. coli*, выделяемых при проведении санитарно-микробиологических исследованиях пищевых продуктов, водных ресурсов и других объектов внешней среды, для целенаправленных мер профилактики по ограничению «завоза» международных клонов высокого эпидемического риска и их циркуляции на территории Российской Федерации.

4. Для выявления шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli* на территории Российской Федерации рекомендуется внедрение молекулярно-эпидемиологического мониторинга для своевременного выявления подобных изолятов. Необходимыми являются постановка скрининг-теста (полимеразная цепная реакция, иммунохроматографический тест), подтверждающего продукцию токсинов или генов, кодирующих их. Для заболеваний, вызванных штаммами, серогрупп «не - O157», своевременная информация о генотипе вирулентности позволит снизить риски развития тяжелых осложнений и летальности.

5. При проведении профилактических бактериологических обследований декретированной категории лиц необходимо у выделенных штаммов *E. coli* серологических групп O6, O25 и O144 для уменьшения диагностических ошибок проводить детекцию генов вирулентности при оценке этиологической значимости носительства этих возбудителей ОКИ.

6. Учитывая глобальное распространение детерминант резистентности к клинически

значимым антибиотикам, необходимо на всех уровнях (территориальном, региональном, федеральном) включить в систему мониторинга развития резистентности к антибиотикам диареогенные и комменсальные *E. coli* как индикаторы резистентности всей популяции.

7. Для проведения своевременных разграничительных мероприятий по ограничению распространения и «заноса» в стационары международных эпидемических клонов *E. coli* – возбудителей внекишечных заболеваний, необходимо включить в программы инфекционного контроля скрининг на носительство таких штаммов пациентами при поступлении в стационар и медицинским персоналом при профилактических осмотрах.

8. Организовать целенаправленный поиск штаммов *E. coli*, ассоциированных с возбудителями менингитов новорожденных, колонизирующих кишечник беременных и рожениц или с заболеваниями мочевыводящих путей, в центрах репродукции, женских консультациях и других учреждениях, оказывающих специализированную медицинскую помощь данной группе населения.

9. Профилактика осложнений заболеваний желудочно-кишечного тракта и внекишечной локализации должна включать меры, направленные на коррекцию нормобиоты кишечника – снижение доли облигатных *E. coli*, способных к реализации патогенного потенциала и нарушению барьерных функций эпителия кишечника. В клинико-диагностических лабораториях на преморбидном этапе рекомендуется использовать молекулярные методы детекции определенных генов вирулентности штаммов *E. coli* для оценки риска развития жизнеугрожающих осложнений.

10. Патогенные *E. coli* должны рассматриваться не как условно-патогенные микроорганизмы - возбудители различных заболеваний человека, а как пул с высоким гетеропатогенным потенциалом - разнообразием комбинаций генов, кодирующих ключевые факторы патогенности.

Предложенные практические рекомендации могут быть внедрены в лаборатории центров гигиены и эпидемиологии, практического здравоохранения, иного другого подчинения, что позволит осуществить более полное информационное обеспечение, качественную микробиологическую и эпидемиологическую диагностику заболеваний.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Для достижения целей Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации в рамках оптимизации национальной системы эпидемиологического надзора за инфекциями целесообразно разработать отечественные ускоренные экономически упрощенные методы и диагностические наборы реагентов для детекции международных высоковирулентных успешных клонов высоко риска пандемического распространения *E. coli* ST131, ST38, ST405 – возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и ST21, ST29 – возбудителей диарейных заболеваний, обусловленных пищевыми продуктами.

2. Для реализации Концепции научного обеспечения деятельности органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках приоритетных направлений развития фундаментальных и прикладных

- исследований с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и прогнозирования рисков в области биологической безопасности:
- необходимо продолжить работу по расширению коллекционных фондов патогенных микроорганизмов штаммами *E. coli*, способными к широкому эпидемическому распространению;
 - создать национальную компьютерную базу данных *E. coli* – возбудителей инфекционных заболеваний человека, включающую информационное сопровождение штаммов результатами развернутых микробиологических, молекулярно-генетических и эпидемиологических исследований;
 - продолжить наблюдение за циркуляцией и изменениями патогенного потенциала клинически и эпидемиологически значимых штаммов *E. coli* – возбудителей инфекционных заболеваний различной локализации с целью своевременного их выявления, совершенствования этиологической диагностики, а также профилактики и лечения, вызываемых ими заболеваний.
 - оптимизировать лабораторную диагностику заболеваний, обусловленных патогенными *E. coli* – возбудителями инфекций кишечной и внекишечной локализации, на основе комплекса культурального и молекулярных методов выявления генетического разнообразия и оценки взаимосвязи с клиническими особенностями инфекционного процесса.
3. Для достижения целей Национальной стратегии предупреждения распространения резистентности к АМП на территории Российской Федерации необходимо дальнейшее изучение механизмов резистентности и мониторинг клинически значимой устойчивости в популяции патогенных *E. coli*, а также оптимизация эпидемиологического надзора и инфекционного контроля на основе молекулярно-генетических методов, позволяющих проследить качественные и количественные изменения структуры популяции и тенденции развития резистентности.
4. Для реализации национальных целей и стратегических задач развития Российской Федерации (Указ Президента от 07.05.2018 № 204) в рамках перспектив развития профилактической медицины продолжить изучение:
- патогенного потенциала *E. coli*, колонизирующих кишечник человека, для разработки комплекса профилактических мер по снижению эндогенных факторов, обуславливающих высокий риск развития заболеваний и их осложнений;
 - роли микробиоты кишечника как резервуара вирулентных и резистентных к антибиотикам штаммов, включая клоны высокого риска пандемического распространения;
 - патогенетических механизмов и факторов, предрасполагающих к формированию постинфекционных нарушений микробиоценоза кишечника.
5. В рамках приоритетных научных направлений отраслевой научно-исследовательской Программы Роспотребнадзора продолжить исследование механизмов, лежащих в основе комплекса эпидемических, микробиологических, клинических и экологических процессов, с целью разработки универсального метода лабораторной диагностики заболеваний эшерихиозной этиологии, целенаправленных профилактических, противоэпидемических мероприятий и персонализированных терапевтических стратегий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кафтырева, Л.А. Резистентность к дезинфектантам энтеробактерий - возбудителей зооантропонозных инфекций / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Дезинфекционное дело. – 2008. – № 3. – С. 12-14.
2. Кафтырева, Л.А. Резистентность энтеробактерий к антимикробным препаратам выбора при лечении острых кишечных инфекций / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Е.А. Кожухова, Н.С. Козлова, З.Н. Матвеева, Т.И. Шестакова, Л.Ю. Петрова, Е.В. Кича // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90, № 5. – С. 699-704.
3. Макарова, М.А. Характеристика госпитальных штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих бета-лактамазы, в Санкт-Петербурге / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, Л.Н. Попенко, М.И. Любушкина, О.В. Полухина, М.Ф. Пясецкая, С.А. Егорова // Всерос. науч. конф. «Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 19-20 ноября 2009 г.: сб. трудов. – 2009. – С. 268.
4. Кафтырева, Л.А. Распространенность и характеристика БЛРС - продуцирующих энтеробактерий – возбудителей различных инфекционных заболеваний / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Е.Н. Колосовская, М.Г. Дарьина // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2010. – № 17. – С. 124-129.
5. Егорова, С.А. Этиологическая значимость условно патогенных энтеробактерий при острых кишечных заболеваниях и дисбиотических состояниях кишечника / С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Инфекция и иммунитет. – 2011. – Т. 1, № 2. – С. 181-184.
6. Макарова, М.А. Маркеры вирулентности у штаммов *Escherichia coli* O1 / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, Н.С. Григорьева, Е.В. Кича, Л.А. Липатова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 71-73.
7. Кафтырева, Л.А. Вспышки острой кишечной инфекции, вызванные *Escherichia coli* O104:H4, зарегистрированные в странах Европы, и биологические особенности возбудителя / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, А.В. Забровская, З.Н. Матвеева, Л.В. Сужаева, Ю.А. Артамонова // Вестник Санкт-Петербургского университета. – Серия 11. Медицина. – 2011. – Вып. 4. – С. 119-126.
8. Макарова, М.А. Применение молекулярно-генетических методов для определения серологического варианта и факторов вирулентности эшерихий / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Профилактическая и клиническая медицина. – 2011. – № 3 (40). – С. 369-372.
9. Кафтырева, Л.А. Изменение визуальной чистоты и микробного фона поверхностей и объектов хирургического отделения стационара при использовании современных технологий уборки / Л.А. Кафтырева, Е.Н. Колосовская, В.Н. Ушакова, Н.Б. Ведерникова, М.В. Клемешова, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева // Дезинфекционное дело. – 2011. – № 3. – С. 42-45.
10. Кафтырева, Л.А. Молекулярно-генетические методы расширяют аналитические возможности современной бактериологической диагностики / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М. А. Макарова // Мат. науч.-практ. конф. «Обеспечение доступности

современных клинических лабораторных исследований: аналитические возможности, клинические потребности, организационно-экономические условия», Москва, 4-6 октября 2011 г. - Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 9. – С. 41.

11. Егорова, С.А. Особенность чувствительности энтеробактерий к антимикробным препаратам в зависимости от среды выделения / С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, Л.А. Кафтырева // труды VI Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения», Санкт-Петербург, 24-26 ноября 2011 г. – 2011. – С. 154-156.

12. Кафтырева, Л.А. Характеристика биологических свойств *E. coli* O104:H4 – возбудителя крупной пищевой вспышки, возникшей в Германии в мае 2011 г. / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, А.В. Забровская, З.Н. Матвеева, Л.В. Сужаева, Ю.А. Артамонова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 1. – С. 44-47.

13. Забровская, А.В. Энтерогеоморрагические эшерихии у животных и человека / А. В. Забровская, М.А. Макарова, С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Л.И.Смирнова // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2012. – № 1. – С.22-25.

14. Макарова, М.А. Резистентность к антибиотикам штаммов *Escherichia coli* серологической группы O145, продуцирующих шигаподобный токсин / М. А. Макарова, Л.А. Кафтырева, З.Н. Матвеева, С.А. Егорова // Тезисы XIV Междунар. конгр. МАКМАХ по антимикробной терапии, Москва, 23-25 мая 2012 г. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т.14, № 2. – Прил. 1. – С. 36.

15. Кафтырева, Л.А. Значение энтеробактерий в этиологии инфекции мочевыводящих путей /Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева // Мат. науч.-практ. конф. «Реальные клинико-диагностические лабораторные услуги: степень соответствия стандартам лабораторной медицины, качество, себестоимость и цена», Москва, 2-4 октября 2012 г. – Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 9. – С. 47.

16. Макарова, М.А. Первые находки эшерихий, резистентных к антимикробным препаратам и продуцирующих шигаподобный токсин / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, З.Н. Матвеева, С.А. Егорова // Мат. X съезда всеросс. науч.-практ. общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», Москва, 12-13 апреля 2012 г. – Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1-2. – С. 295.

17. Макарова, М.А. Находки *Escherichia coli*, продуцирующие шигаподобные токсины / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, Т.А. Коновалова, А.Т. Подколзин, С.А. Егорова // XV Кашкинские чтения: мат. науч. – практ. конф. по мед. микробиологии и микологии, Санкт-Петербург, 27-28 июня 2012 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2012. – Т. 14, № 2. – С. 108.

18. Егорова, С.А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло β-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах балтийского региона / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко, М.Ф. Пясецкая, Т.С. Курчикова, Н.Б. Ведерникова, О.Т. Морозова. М.В. Смирнова,

- Л.Н. Попенко, М.И. Любушкина, Ю.Ф. Савочкина, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, Ю.В. Останкова, М.Н. Иванова, А.М. Павелкович, П. Наабер, Э. Сепп, С. Кыльялг, И. Мицюлявичене, А. Балодэ // *Инфекция и иммунитет*. – 2013. – Т. 3, № 1. – С. 29-36.
19. Кафтырева, Л.А. Характеристика энтерогеморрагической *Escherichia coli* O145:H28, выделенной от пациента с гемолитико-уремическим синдромом / Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, Т.А. Коновалова, З.Н. Матвеева // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2013. – № 5. – С. 100-104.
20. Кафтырева, Л.А. Особенности лабораторной диагностики патогенных энтеробактерий / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // *Журнал Лаборатория*. – 2013. – № 2. – С. 10-11.
21. Кафтырева, Л.А. Характеристика энтеробактерий, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и металло-бета-лактамазу NDM-1, выделенных от госпитализированных пациентов в странах Балтийского региона / Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко, М.Ф. Пясецкая, Т. С. Курчикова, Н.Б. Ведерникова, О.Т. Морозова, М.В. Смирнова, Л.Н. Попенко, М.И. Любушкина // *Справочник заведующего КДЛ*. – 2013. – № 6. – С. 7-17.
22. Макарова, М.А. Использование современных методов диагностики энтерогеморрагических *Escherichia coli* / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, Т.А. Коновалова // Мат. междунар. конф. «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций». – *Инфекция и иммунитет*. – 2013. – Т. 3, № 2. – С. 151-152.
23. Макарова, М.А. Бета-лактамазы расширенного спектра у штаммов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* в стационарах Санкт-Петербурга / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Л.В. Сужаева, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко, Е.В. Оксема, М.В. Смирнова, Т.С. Курчикова, Н.Б. Ведерникова, М.Ф. Пясецкая, О.Т. Морозова // XVI Кашкинские чтения: мат. науч.-практ. конф. по мед. микробиологии и микологии, Санкт-Петербург, 19-21 июня 2013 г. – Проблемы медицинской микологии. – 2013. – Т.15, №2. – С. 101- 102.
24. Макарова, М.А. Серологические группы энтерогеморрагических *Escherichia coli*, выделенных в 2005-2010 гг. от пациентов с диарейным синдромом / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, Т.А. Коновалова, А.Т. Подколзин // Мат. V ежегодного Всеросс. конгр. по инфекционным болезням, Москва, 25-27 марта 2013 г. – *Инфекционные болезни*. – 2013. – Т. 11. – Прил. 1. – С. 244.
25. Светличная, Ю.С. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями / Ю.С. Светличная, Е.Н. Колосовская, Л.А. Кафтырева, М.Г. Дарьина, С.А. Егорова, М.А. Макарова // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2014. – № 1 (74). – С. 8-13.
26. Кафтырева, Л. А. Аналитические возможности лабораторий стационаров в детекции механизмов резистентности к антибактериальным препаратам штаммов энтеробактерий / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, А.В. Забровская, Ю.С. Светличная // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. – 2014. – № 1 (74). – С. 23-27.
27. Lillo, J. Differences in Extended-Spectrum Beta-Lactamase producing *Escherichia coli* virulence factor genes in the Baltic Sea region / J. Lillo, K. Pai, A. Balode, M. Makarova, K.

- Huik, S. Kõljalg, M. Ivanova, L. Kaftyreva, J. Miciuleviciene, P. Naaber, K. Parv, A. Pavelkovich, T. Rööp, K. Toompere, L. Suzhaeva, E. Sepp // *BioMed Research International*. – 2014. – Article ID 427254. – Электронный ресурс: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/427254>.
28. Кафтырева, Л.А. Этиологическая структура и чувствительность к антибиотикам штаммов возбудителей ОКИ в Санкт – Петербурге в 2013 г. / Л.А. Кафтырева, И.Б. Блимман, С.А. Егорова, Н.В. Толузакова, И.В. Шулайкина, М.Г. Кейта, **М.А. Макарова** // Мат. VI ежегод. Всеросс. конгр. по инф. болезням, Москва, 24-26 марта 2014 г. – Инфекционные болезни. – 2014. – Т. 12. – Прил. 1. – С. 125.
29. **Онищенко, Г.Г.** Молекулярно - генетическая характеристика шига-токсинпродуцирующих *Escherichia coli*, выделенных при вспышке пищевой инфекции в Санкт-Петербурге в 2013 году / Г.Г. Онищенко, И.А. Дятлов, Э.А. Светоч, Н.В. Воложанцев, В.А. Баннов, Н.Н. Карцев, В.Н. Борзенков, Н.К. Фурсова, И.Г. Шемякин, А.Г. Богун, А.А. Кисличкина, А.В. Попова, В.П. Мякинина, М.Г. Теймуразов, О.В. Полосенко, Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Т.А. Гречанинова, Н.С. Григорьева, Е.В. Кича, Г.В. Забалуева, Т.Б. Кутасова, Ю.Н. Коржаев, Н.С. Башкетова, О.Н. Бушманова, А.В. Сталевская, И.Г. Чхинджерия, А.Б. Жебрун // *Вестник РАМН*. – 2015. – № 1. – С. 70-81.
30. Кафтырева, Л.А. Использование молекулярно-генетических методов для скрининга истинных *E. coli* – возбудителей острых кишечных заболеваний / Л.А. Кафтырева, **М.А. Макарова**, И.Б. Блимман, Н.В. Толузакова, И.В. Шулайкина, М.Г. Кейта // Мат. VII ежегод. Всеросс. конгр. по инф. болезням, Москва, 30 марта – 1 апреля 2015 г. – Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13. – Прил. 1. – С. 153.
31. **Макарова, М.А.** Распространенность энтероаггративных *E. coli* среди детей раннего возраста с дисбиозом кишечника / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Мат. VII ежегод. Всеросс. конгр. по инф. болезням, Москва, 30 марта – 1 апреля 2015 г. – Инфекционные болезни. – 2015. – Т. 13. – Прил. 1. – С. 203.
32. **Макарова, М.А.** Особенности идентификации и обоснование этиологической роли *E. coli* / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Мат. регион. ежегод. науч.-практ. конф. эпидемиологов, «Актуальные вопросы профилактики инфекционных и неинфекционных заболеваний в Санкт-Петербурге», Санкт-Петербург, 24 июня 2015 г. – ИПК Береста. – 2015. – С. 33-34.
33. **Соколова, Е.Д.** Полимеразная цепная реакция в диагностике острых кишечных инфекций в детском инфекционном стационаре: возможности и проблемы / Е.Д. Соколова, А.М. Галтаева, О.Ю. Замурый, О.В. Дидиченко, О.В. Соколова, В.А. Муратова, О.Ю. Лигорова, И.Н. Журавлева, М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // *Инфекция и иммунитет*. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 225-231.
34. **Светличная, Ю.С.** Распространенность устойчивости к антимикробным препаратам в популяции штаммов *K. pneumoniae* и *E. coli* / Ю.С. Светличная, С.А. Егорова, М.А. Макарова, Л.А. Корноухова, М.Г. Дарьина, Е.Н. Колосовская, Л.А. Кафтырева // *Профилактическая и клиническая медицина*. – 2016. – № 4 (61). – С. 44-52.

35. **Popova, A. Yu.** Comparative characteristics of intestine microbiome of Republic of Guinea and Russian Federation residents / A.Yu. Popova, L.A. Kaftyreva, L.V. Suzhaeva, E.V. Voitenkova, A.V. Zabrovskaya, S.A. Egorova, M.A. Makarova, Z.N. Matveeva, E.V. Zueva, A.A. Porin, M.Y. Boiro, O.K. Konstantinov, Areg A. Totolian // **Инфекция и иммунитет.** – 2017. – Т. 1, № 4. – С. 375-382.
36. **Макарова, М.А.** Дети раннего возраста с дисбиозом кишечника как носители энтероаггративных *Escherichia coli* / М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, Л.А. Кафтырева // **Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.** – 2017. – № 4. – С. 54-58.
37. **Макарова, М.А.** Характеристика штаммов *E. coli* серогрупп O111:H8 и O26:H11, выделенных от детей с острой кишечной инфекцией / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // **Мат. III Нац. конгр. бактериологов, Москва, 16-17 ноября 2017 г. – Бактериология.** – 2017. – Т. 2, № 3. – С. 78.
38. **Макарова, М.А.** Характеристика факторов вирулентности штаммов *E. coli* серогрупп O111, O26, O55, выделенных от детей с острой кишечной инфекцией / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // **IX Всеросс. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Молекулярная диагностика 2017», Москва, 18-20 апреля 2017 г.: сб. трудов.** – 2017. – Т. 2. – С. 334-335.
39. **Egorova, S.A.** Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from intestinal microbiota of residents of the Republic of Guinea and Russia (Saint-Petersburg) / S.A. Egorova, M.A. Makarova, L.A. Kaftyreva, L.V. Suzhaeva, A.V. Zabrovskaya, Z.N. Matveeva, E.V. Voitenkova // **Инфекция и иммунитет.** – 2018. – Т. 8, № 3. – С. 349-360.
40. **Макарова, М.А.** Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Escherichia coli* серогруппы O26, вызывающих диарейные заболевания у детей / М.А. Макарова, А.В. Дмитриев, З.Н. Матвеева, Л.А. Кафтырева // **Медицинский академический журнал.** – 2018. – Т. 18, № 3. – С. 85-90.
41. **Макарова, М.А.** Биологические свойства штаммов *E. coli* серогруппы O144, регистрируемые в Санкт-Петербурге как возбудители острых кишечных инфекций / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, З.Н. Матвеева // **Бактериология.** – 2018. – Т. 3, № 4. – С. 12-15.
42. **Макарова, М.А.** Современная лабораторная диагностика эшерихиозов / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Л.А. Кафтырева // **Мат. V конгр. Евро-Азиат. общества по инф. болезням, Новосибирск, 6-18 мая 2018 г. – Журнал инфектологии.** – 2018. – Т. 10, № 2. – Прил. 1. – С. 72.
43. **Макарова, М.А.** Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Escherichia coli* – возбудителей гнойно-септических инфекций / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // **Межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики», Екатеринбург, 17-18 октября 2018: сб. трудов.** – 2018. – С. 57-59.
44. **Кафтырева, Л.А.** Микробиота пациентов как резервуар патогенных и условно-патогенных микроорганизмов / Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова // **Межрегион. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики», Екатеринбург, 17-18 октября 2018 г.: сб. трудов.** – 2018. – С. 41-43.

45. **Макарова, М.А.** Выделение *E. coli*, продуцирующих бета – лактамазы расширенного спектра, сиквенс – типа 131 при инфекциях мочевыводящих путей в Санкт-Петербурге / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Ю.С. Никуткина, А.Н. Булкин // X Всерос. науч.-практ. конф. с международ. уч. «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27-28 сентября 2018 г.: сб. трудов. – 2018. – С. 52.
46. Кафтырева, Л.А. Микробиота человека как резервуар патогенных и условно-патогенных бактерий / Л.А. Кафтырева, О.П. Гумилевская, **М.А. Макарова** // Мат. XIII Всерос. науч.-практ. конф. «Актуальные вопросы клиники, диагностики и лечения в многопрофильных лечебных учреждениях», Санкт-Петербург, 26-27 апреля 2018 г. – Вестник Российской Военно – медицинской Академии. – 2018. – №. 2 (61). – Прил. 2. – С. 123.
47. **Макарова, М.А.** Энтерогеморрагические *Escherichia coli*, выделенные в 2010 – 2015 гг. от пациентов с диарейным синдромом / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Л.А. Кафтырева // Мат. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Паразитарные и инфекционные болезни в краевой патологии Центрально – Азиатского региона», Самарканд, 14 – 15 июня 2018 г.: сб. трудов под ред. Проф. А.М. Шамсиева. – Проблемы биологии и медицины. – 2018. - № 3 (103). – С. 56.
48. **Makarova, M.A.** Pathogenic potential of commensal *Escherichia coli* isolated from adults in Saint-Petersburg / M.A. Makarova // Мат. междунар. конф. «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2018 г. – Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8, №. 4. – С. 606-607.
49. **Макарова, М.А.** Устойчивость к антибактериальным препаратам эшерихий – представителей нормальной микрофлоры кишечника / М.А. Макарова, С.А. Егорова, З.Н. Матвеева // Мат. рос. науч.-практ. конф. «Инфекционные болезни: современные проблемы диагностики и лечения». – Санкт-Петербург. – 2018. – С. 136-137.
50. **Sepp, E.** Phenotypic and molecular epidemiology of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe / E. Sepp, A. Bilozor, K. Huik, S. Kõljalg, K. Pai, T. Rööp, P. Naaber, R. Andreson, A. Brauer, T. Kõressaar, M. Remm, A. Balode, M. Ivanova, S. Egorova, L. Kaftyreva, M. Makarova, J. Miciuleviciene // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – Article 2465. – Электронный ресурс: doi:10.3389/fmicb.2019.02465.
51. **Макарова, М.А.** Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Escherichia coli* серогруппы O55, выделенных от детей в Санкт-Петербурге / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева // Мат. XI ежегод. Всерос. конгр. по инф. болезням с междунар. уч. «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы», Москва, 1-3 апреля 2019 г. / под ред. Академика РАН В.И. Покровского. – М.: «Медицинское Маркетинговое Агентство». – 2019. – С. 119.
52. **Макарова, М.А.** Современные факторы передачи и особенности лабораторной диагностики эшерихиозов / М.А. Макарова // Мат. науч.-практ. конф. в рамках V Росс. конгр. лаб. мед. (РКЛМ 2019): сб. трудов. – М.: ИПО «У Никитских ворот». – 2019. – С. 21-22.

53. **Макарова, М.А.** Взаимосвязь внутривидового разнообразия и генетических детерминант патогенности *Escherichia coli* / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. уч. «Научное обеспечение противоэпидемической защиты населения: актуальные проблемы и решения»: сб. трудов / под ред. Е.И. Ефимова. – Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье. – 2019. – С. 230-236.
54. **Макарова, М.А.** Распространенность ST131 среди БЛРС-продуцирующих штаммов *Escherichia coli*, выделенных при инфекциях мочевыводящих путей / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Ю.С. Филатова // Мат. XXI междунар. конгр. МАКМАХ по антимикроб. терапии и клин. микробиол., Москва, 22 – 24 мая 2019 г. – Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2019. – Т. 21. – Прил. 1. – С. 42.
55. **Макарова, М.А.** Современная лабораторная диагностика острых кишечных инфекций бактериальной этиологии / М.А. Макарова // Мат. V Нац. конгр. бактериологов, Москва, 16-17 сентября 2019 г. – Москва: Издательство «Династия». – 2019. – С. 53-54.
56. **Кафтырева, Л.А.** Детекция международных клонов высокого риска *Salmonella* и *Escherichia coli* – возбудителей заболеваний, передающихся с пищевыми продуктами / Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, М.А. Макарова // Инфекция и иммунитет. – 2020. – Т. 10 (3). – С. 565-569.
57. **Макарова, М.А.** Лабораторные ошибки идентификации штаммов *Escherichia coli* серологических групп O6 и O25 как возбудителей острых кишечных инфекции / М.А. Макарова, З.Н. Матвеева, Е.В. Смирнова, Л.И. Семченкова, И.А. Деревянченко, С.Е. Сокольник, Л.Ю. Жирнова, Н.К. Котова, Т.Ф. Пеленко, Д.С. Дудников, Н.В. Васильева, Л.А. Кафтырева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, №6. – С. 368-374
58. **Макарова, М.А.** Генетическое разнообразие штаммов энтероаггративных *Escherichia coli* / М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 11. – С. 707-711.
59. **Круглов, Е.Е.** Филогенетическая группировка и генетические предикторы бета – лактамазной активности *Escherichia coli*, изолированных от пациентов с язвенным колитом / Е.Е. Круглов, М.А. Макарова, Ю.В. Мякишева, А.В. Жестков // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 57-66.
60. **Макарова, М.А.** Характеристика штаммов *Escherichia coli*, выделенных при остром аппендиците и хроническом язвенном колите / М.А. Макарова, Е.Е. Круглов, З.Н. Матвеева, Н.Н. Зверякина, Л.А. Кафтырева // Проблемы медицинской микологии. – 2020. – Т. 22, № 4. – С. 66-71.

Патент

1. Патент RU 2707640 C1 Российская Федерация, МПК C12N 1/20, C12Q 1/02, A61P 1/00, C12R 1/19. Штамм бактерий *Escherichia coli* в качестве контрольного тест-штамма для фенотипических и молекулярных исследований эшерихий серологической группы O144 / **Макарова М.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель ФБУН НИИЭМ имени Пастера. - № 2019101944; заявл. 24.01.2019; опубл. 28.11.2019, Бюл. № 34. – 8 с.

Свидетельства о регистрации баз данных

1. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020620646 Российская Федерация. «Молекулярно-генетическая характеристика комменсальных штаммов *Escherichia coli*, выделенных от здоровых (без признаков острой кишечной инфекции) взрослых жителей Санкт-Петербурга» / **Макарова М.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2020620506; заявл. 24.03.2020; опубли. 08.04.2020.
2. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019621937 Российская Федерация. «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Escherichia coli*, выделенных при внекишечных заболеваниях» / **Макарова М.А.**; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2019621899; заявл. 18.10.2019; опубли. 29.10.2019.
3. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019622277 Российская Федерация. «Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Escherichia coli*, выделенных при флегмонозных аппендицитах» / **Макарова М.А.**; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2019622254; заявл. 28.11.2019; опубли. 06.12.2019.
4. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2019622323 Российская Федерация. «Молекулярно-генетическая характеристика энтероаггративных штаммов *Escherichia coli*, выделенных из проб фекалий пациентов с диарейным синдромом» / **Макарова М.А.**; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2019622249; заявл. 28.11.2019; опубли. 10.12.2019.
5. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020621032 Российская Федерация. «Биологические свойства штаммов энтеропатогенных *Escherichia coli* (ЕPEC), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» / **Макарова М.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2020620887; заявл. 04.06.2020; опубли. 22.06.2020.
6. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020621033 Российская Федерация. «Биологические свойства штаммов энтеротоксигенных *Escherichia coli* (ЕТЕС), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» / **Макарова М.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2020620888; заявл. 04.06.2020; опубли. 22.06.2020.
7. Свидетельство о регистрации базы данных RU 2020621031 Российская Федерация. «Биологические свойства штаммов шигатоксин-продуцирующих *Escherichia coli* (STEC), выделенных из проб испражнений пациентов с диарейным синдромом» / **Макарова М.А.**, Кафтырева Л.А.; заявитель и правообладатель: ФБУН НИИЭМ имени Пастера (RU). - № 2020620883; заявл. 04.06.2020; опубли. 22.06.2020.

Методические и клинические рекомендации

1. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Методические рекомендации. Версия 2014-01/ Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Сидоренко С.В., Партина И.В., Гостев В.В., Агеевец В.А., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., **Макарова М.А.**, Васильева Н.В., Климко Н.Н., Богомоллова Т.С., Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Тартаковский И.С. –

- [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2014.pdf>
2. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Версия 2015-02/ Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Сидоренко С.В., Партина И.В., Гостев В.В., Агеевец В.А., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., **Макарова М.А.**, Васильева Н.В., Климко Н.Н., Богомоллова Т.С., Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Тартаковский И.С. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2015.pdf>
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Клинические рекомендации. Версия 2018-03/ Козлов Р.С., Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Склеенова Е.Ю., Романов А.В., Дехнич А.В., Сидоренко С.В., Партина И.В., Гостев В.В., Агеевец В.А., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., **Макарова М.А.**, Васильева Н.В., Климко Н.Н., Богомоллова Т.С., Рауш Е.Р., Выборнова И.В., Рябинин И.А., Борзова Ю.В., Тартаковский И.С. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/clrec-dsma2018.pdf>
4. Молекулярно – генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации / Гончаров А.Е., Зуева Л.П., Колоджиева В.В., Кафтырева Л.А., Егорова С.А., **Макарова М.А.** // Москва. – 2014. – 45 с.
5. Принципы организации мониторингов устойчивости ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к антимикробным препаратам в лечебно – профилактических медицинских организациях здравоохранения. Федеральные клинические рекомендации. / Кафтырева Л.А., Зуева Л.П., Колосовская Е.Н., Егорова С.А., **Макарова М.А.**, Светличная Ю.С., Кузин А.А., Свистунов С.А. // Москва. – 2014. – 37 с.
6. Особенности лабораторной диагностики эшерихиозов, обусловленных энтерогеморрагическими *E. coli* O157:H7: методические указания МУ 4.2.018-99: утверждены Главным государственным санитарным врачом по Санкт-Петербургу Постановлением № 28 от 10.12.1999 г. – СПб.: Центр Госсанэпиднадзора в Санкт-Петербурге, 1999. – 19 с.
7. Практические рекомендации по преаналитическому этапу микробиологических исследований. Часть I. Бактериологические исследования / Е.В. Алиева, Л.А. Кафтырева, **М.А. Макарова**, И.С. Тартаковский И.С. // Лабораторная служба. – 2019. – Т. 9, №. 2. – С. 45-66.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП	– Антимикробный препарат
БЛРС	– Бета-лактамазы расширенного спектра
ВОЗ	– Всемирная организация здравоохранения
ГСИ	– Гнойно-септические инфекции
ДИ	– Доверительный интервал
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– Желудочно-кишечный тракт
ИМП	– Инфекции мочевыводящих путей
ИСМП	– Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КОЕ	– Колонии образующие единицы
КРС	– Крупный рогатый скот
НИИ	– Научно-исследовательский институт
ОКИ	– Острые кишечные инфекции
ОКИНЭ	– Острые кишечные инфекции неясной этиологии
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
ФБУЗ	– Федеральное бюджетное учреждение здравоохранения
ФБУН	– Федеральное бюджетное учреждение науки
a-EAgEC	– Атипичные энтероаггративные <i>E. coli</i>
a-EPEC	– Атипичные энтеропатогенные <i>E. coli</i>
DEC	– Диареегенные <i>E. coli</i>
EAgEC	– Энтероаггративные <i>E. coli</i>
ЕНЕС	– Энтерогеморрагические <i>E. coli</i>
ЕІЕС	– Энтероинвазивные <i>E. coli</i>
ЕРЕС	– Энтеропатогенные <i>E. coli</i>
ЕТЕС	– Энтеротоксигенные <i>E. coli</i>
ExPEC	– Внекишечные патогенные <i>E. coli</i>
LT	– Термолабильный энтеротоксин
MDR	– Multidrug resistance; Множественная устойчивость к антимикробным препаратам
MLST	– Multi-locus Sequence Typing; Мультилокусное секвенирование-типирование
ST	– Термостабильный энтеротоксин
ST	– Сиквенс тип
Stx	– Шигаподобный токсин
STEC	– Шигатоксин-продуцирующие <i>E. coli</i>
t-EAgEC	– Типичные энтероаггративные <i>E. coli</i>
t-EPEC	– Типичные энтеропатогенные <i>E. coli</i>
UPEC	– Уропатогенные <i>E. coli</i>
WGS	– Whole genome sequencing; Полногеномное секвенирование
XDR	– Extra drug resistance; Экстремальная устойчивость к антибиотикам