

МИКРОБИОЛОГИЯ, ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

УДК 579.252.59, 618.6-008.8

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ У ИЗОЛЯТОВ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ ПАЦИЕНТОВ ПЕРИНАТАЛЬНОГО ЦЕНТРА

Авдюнин Дмитрий Дмитриевич^{1,2}, Смирнова Светлана Сергеевна^{1,3}, Телепова Наталья Ивановна⁴, Беломестнов Сергей Разумович⁴

¹ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора

²ФГАОУ ВО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н. Ельцина»

³Кафедра эпидемиологии, социальной гигиены и организации госсанэпидслужбы
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

⁴ГБУЗ СО «Екатеринбургский клинический перинатальный центр»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Антимикробная резистентность относится к числу биологических угроз современности и негативно влияет на здоровье популяции. Изменение профиля резистентности антимикробным препаратам у условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) увеличивает риски внутрибольничного распространения данных патогенов. Перинатальные центры являются объектами риска возникновения и распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). **Цель исследования** – провести анализ результатов высокопроизводительного секвенирования штаммов УПМ, их фенотипического и генотипического профилей, для интеграции данных в систему эпидемиологического надзора за ИСМП. **Материал и методы.** В исследование были включены клинически здоровые пациентки перинатального центра г. Екатеринбург, у которых при выписке из роддома на 3–4 сутки послеродового периода проводился забор биологического материала из цервикального канала. Всего было выделено 62 культуры микроорганизмов. Фенотипический и генотипический профили антимикробной резистентности изучены у 52 изолятов методами микроразведений в бульоне (Multiskan FC) и высокопроизводительного секвенирования («NextSeq2000») соответственно. **Результаты.** Показано наличие широкого спектра сиквенс-типов циркулирующих микроорганизмов, определены ведущие сиквенс-типы (*E.faecalis* – ST16, ST40, ST28, ST287; *S.aureus* – ST22). Гены, детерминирующие резистентность к антимикробным препаратам, выявлены в 88,5% изолятов, гены детерминирующие вирулентность – в 94,2%, плазмиды – 82,7%. Изоляты *E.faecalis* фенотипически были резистентны в 20,6%, при генотипическом исследовании в структуре генома 100% изолятов были выявлены гены резистентности к макролидам, тетрациклинам, аминогликозидам, фениколам и бета-лактамам в различных комбинациях. **Выводы.** В результате проведенного анализа установлена циркуляция широкого спектра сиквенс-типов изолятов УПМ группы ESCAPE в перинатальном центре. Присутствие генов, детерминирующих антимикробную резистентность, наличие плазмид установлено у 80–90% исследованных штаммов. У ряда штаммов выявлено несоответствие генотипического профиля антимикробной резистентности фенотипическому. Полученные данные служат основанием для формирования новых подходов к проведению молекулярно-генетического мониторинга в медицинских организациях

Ключевые слова: антимикробная резистентность, условно-патогенные микроорганизмы, высокопроизводительное секвенирование, плазмиды

ANALYSIS OF PHENOTYPIC AND GENETIC MARKERS OF RESISTANCE IN ISOLATES OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM HEALTHY PATIENTS OF THE PERINATAL CENTER

Avdyunin Dmitry Dmitrievich^{1,2}, Smirnova Svetlana Sergeevna^{1,3}, Telepova Natalia Ivanovna⁴, Belomestnov Sergey Razumovich⁴

¹FSRIVI «Virome» Rospotrebnadzor

²Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin

³Department of Epidemiology, Social Hygiene and Organization of the State Sanitary and Epidemiological Service

Ural State Medical University

⁴Yekaterinburg Clinical Perinatal Center

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The global problem of antimicrobial resistance is one of the major biological threats of our time, and it negatively affects the health of the population. The changing profile of antimicrobial resistance among opportunistic pathogens is another modern health challenge, significantly increasing the risk of nosocomial transmission of these pathogens. Perinatal centers are traditionally at high risk of the occurrence and transmission of healthcare-associated infections (HAIs). **The aim of the study** is to analyze the results of high-performance sequencing of opportunistic pathogen strains, their phenotypic and genotypic profiles, in order to integrate data into the system for epidemiological surveillance of healthcare-associated infections (HAIs). **Material and methods.** The study involved clinically healthy patients at the perinatal center in Yekaterinburg, who had their cervical canal sampled at discharge from a maternity hospital within the first 3-4 days after childbirth. 62 cultures of microorganisms were isolated. The phenotypic and genotypic patterns of antimicrobial resistance in 52 of these isolates were then studied using broth microdilution (Multiskan FC) and high-performance sequencing (NextSeq2000). **Results.** The presence of a diverse range of sequence types of circulating microbes has been demonstrated, and the predominant sequence types have been identified (*E. faecalis* – ST16, ST40, ST28, and ST287; *S. aureus* – T22). Antimicrobial resistance genes were detected in 88.5% of the isolates, virulence-determining genes in 94.2%, and plasmids in 82.7%. *E. faecalis* isolates were phenotypically resistant at 20.6%. Genotypic analysis revealed resistance genes for macrolides, tetracyclines, aminoglycosides, phenicols, and beta-lactams, in various combinations, within the genome structure of all 100% of the *E. faecalis* isolates. **Conclusion.** As a result of the analysis, it was found that a wide range of opportunistic pathogens group ESCAPE sequence-type strains circulated in the perinatal center. Eighty to ninety percent of the strains studied contained genes that determine antimicrobial resistance and plasmids. A number of the strains showed a discrepancy between their genotypic and phenotypic profiles of antimicrobial resistance. These findings provide the basis for developing new approaches to molecular genetic monitoring within medical organizations.

Keywords: antimicrobial resistance, opportunistic microorganisms, high-performance sequencing, plasmids

ВВЕДЕНИЕ

Глобальная проблема антимикробной резистентности (АМР) относится к числу основных биологических угроз современности [ВОЗ, ФЗ-492]. АМР – глобальное явление, влекущее за собой тяжелые последствия для здравоохранения: длительные госпитализации, рост медицинских расходов и смертности. По оценкам, в 2019 году 4,95 миллиона смертей были связаны с инфицированием микроорганизмами, обладающих АМР [1]. В постпандемический период устойчивость к антимикробным препаратам (АМП) колоссально возросла среды всех известных патогенов, в связи с этим необходимо изменять подходы к проведению микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП)

В настоящее время представления об условно-патогенных микроорганизмах существенно изменились. Наиболее частых агентов ИСМП выделили в группу ESCAPE, представители которой зачастую являются компонентами нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека – комменсалами, выполняющими и регулируемыми определённые функции для поддержания гомеостаза [2]. Изменение антимикробной резистентности данных микроорганизмов может привести к росту заболеваемости ИСМП и существенному осложнению эпидемиологической ситуации в медицинских организациях, среди которых особое место как объекты риска занимают Перинатальные центры.

Цель исследования – провести анализ результатов высокопроизводительного секвенирования штаммов УПМ, их фенотипического и генотипического профилей, для интеграции данных в систему эпидемиологического надзора за ИСМП.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе ФБУН ФНИИВИ «Виром» Роспотребнадзора совместно с ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора. В исследование были включены клинически здоровые пациентки перинатального центра г. Екатеринбурга, у которых при выписке из роддома на 3–4 сутки послеродового периода проводился забор биологического материала из цервикального канала. Всего было выделено 62 культуры микроорганизмов, в т.ч. *E. faecalis* (34; 54,9%), *E. coli* (22; 35,6%), *S. aureus* (2; 3,2%), *S. agalactiae* (2; 3,2%), *K. pneumoniae* (1; 1,6%), *P. mirabilis* (1; 1,6%).

Фенотипический и генотипический профили антимикробной резистентности изучены у 52 изолятов методами микроразведений в бульоне (Multiskan FC) и высокопроизводительного секвенирования («NextSeq2000») соответственно.

Первичная оценка последовательностей, проведение множественного выравнивания на референсные последовательности базы данных NCBI, построение филогенетических дендрограмм с использованием модели Тамуры, метода «ближайших соседей» проведена в программной среде GeneiousPrime 2023.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате исследования выявлен широкий спектр сиквенс-типов циркулирующих микроорганизмов. Гены, детерминирующие резистентность к АМП, выявлены в 46 изолятах (88,5%), гены, детерминирующие вирулентность – в 49 (94,2%), плазмиды – 43 (82,7%).

Изоляты *E.coli* относились к 12 разным сиквенс-типам (*ST10*; *ST23*; *ST28*; *ST69*; *ST73*; *ST131*; *ST141*; *ST355*; *ST442*; *ST569*; *ST648*; *ST10936*). Фенотипическая резистентность к АМП была выявлена у 7 изолятов (58,3%) и проявлялась в отношении пенициллинов (6 изолятов), в т.ч. защищенных (2), цефалоспоринов (6) и фторхинолонов (2). У 3 штаммов была выявлена резистентность одновременно к пенициллинам и цефалоспорином, у 2-х – к пенициллинам, цефалоспорином и фторхинолоном. При генотипическом исследовании в структуре генома всех 7 устойчивых изолятов *E.coli* были выявлены гены резистентности к АМП, определяющими резистентность к β-лактамам (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM-1-B}*, *bla_{CTX-M-27}*, *bla_{OXA-1-B}*; 100%), аминогликозидам (*aadA5*, *dfrA17*; 5(71,4%)), сульфаниламидам (*sul1*; 5(71,4%)), тетрациклинам (*tet(A)*, *tet(B)*; 4(57,1%)), фторхинолоном (*aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1*; 4(57,1%)), хлорамфениколу (*catA1*, *catB3*; 2(28,6%)), макролидам (*erm(B)*; 1(14,2%)). 6 штаммов содержали более 2-х генов резистентности (до 10) в различных комбинациях.

Проведен сравнительный анализ профилей фенотипической и генотипической резистентности изолятов *E.coli* с переносимыми плазмидами, в результате которого был идентифицирован предположительный переносчик гена резистентности к В-лактамам препаратам (*bla_{CTX-M-15}*) – плазида IncFII.

Изоляты *E.faecalis* относились к 14 сиквенс-типам, ведущими из которых были ST16 (4; 11,7%) и ST28 (4; 11,7%). *E.faecalis* фенотипически были резистентны в 20,6% (7 из 34): 3 изолята проявляли резистентность к аминогликозидам, 2 – к фторхинолонам, 2 – к аминогликозидам и фторхинолонам. При генотипическом исследовании в структуре генома всех исследованных изолятов *E.faecalis* были выявлены гены резистентности к макролидам, тетрациклинам, аминогликозидам и фениколам: *Isa(A)* (97,1%), *tet(M)* (73,5%), *erm(B)* (41,2%), *aph(3')-III* (32,4%) и *ant(6)-Ia* (20,6%), два штамма *E.faecalis* содержали ген *bla_{OXA-10}* (резистентность к бета-лактамам). 26 исследованных штаммов (76,5%) содержали 2 и более гена резистентности в различных комбинациях.

На основе филогенетического анализа (рис. 1) в группе *E.faecalis* были выделены четыре кластера: ST16, ST28, ST40, ST287. Эпидемиологический анализ данных кластеров позволяет предположить внутрибольничный характер их распространения.

Проведен сравнительный анализ профилей фенотипической (данные приведены по препаратам, к которым была зафиксирована устойчивость как минимум 1-го штамма) и генотипической резистентности (таблица 1) с переносимыми плазмидами (таблица 2), в результате которого был идентифицирован предположительный переносчик генов резистентности к аминогликозидам (*aph(3')-III*, *aac(6')-aph(2'')*, *ant(6)-Ia*) – плазида *repUS43_CDS12738(DOp1)*.

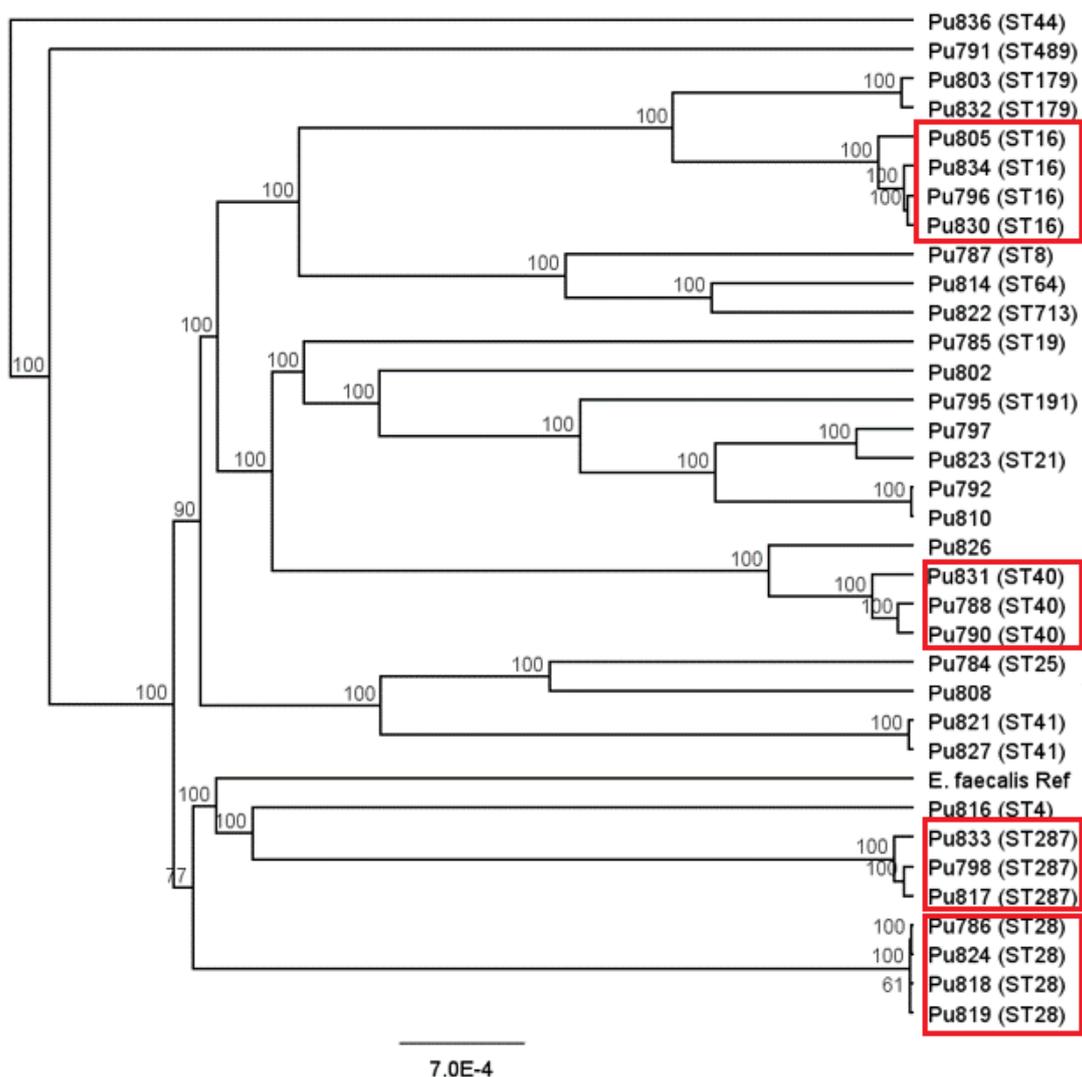


Рис. 1 Филогенетическая дендрограмма изолятов *E. faecalis*, выделенных от здоровых родильниц

Таблица 1.

Фенотипический и генотипический профили резистентности изолятов *E. faecalis* ST16, ST28, ST40, ST287

Фенотипическая резистентность						Генотипическая резистентность											
Name	ST	гентамицин	левофлоксацин	норфлоксацин	ципрофлоксацин	aac(6)-aph(2'')	aph(3')-III	ant(6)-Ia	cat(pC194)	tet(M)	dfrG	Isa(A)	erm(B)	str	optrA	aadA1	blaOXA-10
Pu786	28	R	R	R	R	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Pu788	40	S	S	S	S	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Pu790	40	S	S	S	S	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Pu796	16	S	S	S	S	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0
Pu805	16	S	S	S	S	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Pu817	287	S	S	S	S	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0
Pu818	28	S	R	R	R	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Pu819	28	R	R	R	R	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0
Pu824	28	S	S	S	S	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0

Pu830	16	R	S	S	S		0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0
Pu831	40	S	S	S	S		0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1
Pu833	287	S	S	S	S		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Pu834	16	S	S	S	S		0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0

Примечание: R – resistance; S – sensitive; 1 – имеется; 0 – отсутствует

Таблица 2.

Плазмиды изолятов *E.faecalis* ST16, ST28, ST40, ST287

Name	rep6_repA(pS86)	rep8b_repA(pEI97p1)	rep9a_repA(pAD1)	rep9b_repA(pMG2200)	repUS11_AE016832	repUS43_CDS12738(DOp1)	rep9b_repA2(pTEF2)	rep9c_repA(pTW9)	rep2_orf1(pRE25)	rep7a_ORF11(pRE25)	rep32_repB(pVF22)	rep9b_prgW(EF62pC)	rep7a_CDS4(pS194)	rep11b_repA
Pu786	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Pu788	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu790	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0
Pu796	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu805	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu817	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Pu818	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu819	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu824	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Pu830	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu831	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu833	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pu834	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание: * 1 – имеется; 0 – отсутствует

ОБСУЖДЕНИЕ

По данным Всемирной организации здравоохранения, *S.aureus* и *K.pneumoniae* являются ведущими возбудителями ИСМП. В 2020 году средняя доля метициллинрезистентного золотистого стафилококка в странах ЕС/ЕЭЗ составила 24,9%, растет число инфекций, ассоциированных с *K.pneumoniae*, что представляет угрозу, как для пациентов с ослабленным иммунитетом [3], так и родильниц [4].

Бактерии группы ESCAPE благодаря высокой скорости рекомбинации ДНК способны в короткие сроки адаптироваться к изменяющимся условиям среды. Результатом этой адаптации является появление генов, формирующих факторы вирулентности и АМР у различных штаммов. Этот процесс обусловлен генетически и ассоциирован с модификацией генома (мутация или изменение уровня экспрессии гена) или изменением генетической информации посредством горизонтального переноса генов [5].

Подвижные генетические элементы – единицы (конъюгативные плазмиды и транспозоны, генные кассеты, интегроны и др. [5]), способные самостоятельно переносить генетический материал. Этот перенос имеет как внутривидовой характер, так и межвидовой, в ряде случаев и межродовой. Механизмов передачи три: трансформация, трансдукция и конъюгация. Последний – наиболее эффективный в условиях замкнутой экосистемы медицинской организации [6].

На фоне ведущих возбудителей недостаточное внимание уделяется *E.faecalis*, который выступает этиологическим агентом при развитии широкого спектра инфекций, таких как

инфекции кровотока, мочевыводящих путей, кожи, мягких тканей. Растет частота упоминаний об *E. faecalis* в качестве инфекционных агентов в акушерстве (перитонит, эндометрит, инфекции области хирургического вмешательства) [4]. Встречаемость этого микроорганизма при инфекции мочевыводящей системы по разным данным составляет 13,2%–75% [7]. Выявление плазмид-переносчиков генов резистентности к аминогликозидам может существенно изменить представление об эпидемиологическом потенциале *E. faecalis* и о его роли в эпидемиологическом процессе внутрибольничных инфекций.

ВЫВОДЫ

1. В учреждении родовспоможения установлена циркуляция широкого спектра сиквенс-типов изолятов УПМ группы ESCAPE.

2. Присутствие генов, детерминирующих антимикробную резистентность, наличие плазмид установлено у 80–90% исследованных штаммов.

3. У ряда штаммов выявлено несоответствие генотипического профиля антимикробной резистентности фенотипическому.

4. Полученные данные служат основанием для формирования новых подходов к проведению молекулярно-генетического мониторинга в медицинских организациях высокого риска распространения ИСМП с целью адекватной оценки эпидемиологической ситуации.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / Lancet. – 2022. – Vol. 399 №10325. – P. 629–655.
2. Exploration of the role of the virulence factor ElrA during Enterococcus faecalis cell infection / N. Nunez, A. Derré-Bobillot, S. Gaubert [et al.] // Scientific Reports. – 2018. – Vol. 8 № 1749
3. Molecular characterization, serotypes and phenotypic and genotypic evaluation of antibiotic resistance of the Klebsiella pneumoniae strains isolated from different types of hospital-acquired infections/ R. Ranjbar, A. Fatahian Kelisha drokhi, M. Chehelgerdi // Infect Drug Resist. – 2019. – Vol. 12. – P. 603–611.
4. Гнойно-септические инфекции у родильниц. Часть 2. Клинико-патогенетическая характеристика нозологических форм, этиология и антибиотикорезистентность (обзор литературы) / С.С. Смирнова, И.А. Егоров, А.А. Голубкова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. № 2. – С. 244–259.
5. Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing/ S.B. Zaman, M.A. Hussain, R. Nye [et al.] // Cureus. – 2017. – Vol 9 (6), № 1403.
6. Т. С. Коменкова, Е. А. Зайцева Современные представления о механизмах резистентности к антимикробным препаратам. Enterococcus faecalis и Enterococcus faecium / Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65 № 11–12. – С. 38-48.
8. Virulence profiles of vancomycin-resistant enterococci isolated from surface and ground water utilized by humans in the North West Province, South Africa: a public health perspective/ Matlou DP, Bissong MEA, Tchatchouang CK [et al.] // Environmental science and pollution research international. – 2019. – Vol. 26 № 15. – P. 15105-15114.

Сведения об авторах

Д.Д. Авдюнин* – стажер-исследователь

С.С. Смирнова – кандидат медицинских наук, доцент

Н.И. Телепова – врач-методист

С.Р. Беломестнов – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.D. Avdyunin* – Research Intern

S.S. Smirnova – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

N.I. Telepova – Methodologist

S.R. Belomestnov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

Avdyunin_dd@niivrom.ru

УДК: 618.146

ОСОБЕННОСТИ РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У ПАЦИЕНТОК В ПЕРИОД МЕНОПАУЗЫ С ЦЕРВИКАЛЬНЫМИ ИНТРАЭПИТЕОИАЛЬНЫМИ НЕОПЛАЗИЯМИ РАЗНОЙ СТЕПЕНИ И ПЛОСКОКЛЕТОЧНОЙ КАРЦИНОМОЙ

Белуосова Анна Валерьевна¹, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,2}, Зорников Данила Леонидович¹, Пахарукова Мария Игоревна³

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России