



*На правах рукописи*

**КОЛЕСНИКОВА ЕЛЕНА АЛЕКСАНДРОВНА**

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БАКТЕРИЙ РОДОВ  
*UREAPLASMA* И *Mycoplasma*, АССОЦИИРОВАННЫХ С  
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ УРОГЕНИТАЛЬНОГО  
ТРАКТА**

03.02.03-микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Казань – 2018

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор

**Ефимов Евгений Игоревич**

**Официальные оппоненты:**

**Исаева Гузель Шавхатовна** - доктор медицинских наук, заведующая кафедрой микробиологии ГБОУ ВПО "Казанский медицинский университет" МЗ РФ, директор ФБУН «Казанский НИИЭМ» Роспотребнадзора

**Гординская Наталья Александровна** – доктор медицинских наук, главный научный сотрудник НИИ профилактической медицины Университетской клинки ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

**Ведущая организация:**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «21» февраля 2019г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.36 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420012, г. Казань, ул. Карла Маркса, 74, ауд. 205

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Автореферат разослан «16» января 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



З.И. Абрамова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Возрастающие темпы роста лекарственной резистентности микроорганизмов, в том числе и урогенитальных микоплазм, являются серьезной проблемой современного здравоохранения. ВОЗ считает решение проблемы антимикробной резистентности одной из первостепенных задач, о чем свидетельствует «Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию резистентности к противомикробным препаратам», опубликованная в 2001г. Понимание важности этой проблемы нашло отражение и на государственном уровне. Распоряжением Правительства РФ от 25.09.2017г. №2045-р утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030г., основными задачами которой являются изучение механизмов возникновения резистентности, мониторинг ее распространения, повышение осведомленности населения о рациональном применении противомикробных лекарственных препаратов.

Бактерии родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* доминируют в последнее время в этиологии урогенитальных инфекций и характеризуются высоким уровнем генетического полиморфизма, ответственного за формирование антибиотикорезистентности. По данным разных авторов частота выявления *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum*, и *U. parvum* варьирует в широких пределах от 2% до 80% в зависимости от нозологической формы заболевания, социального статуса и возраста больного (Савичева М.А., 2010, 2014; Рахматулина М.Р., 2013; Белова А.В., 2014; Фофанова И.Ю., 2014; Dhandayuthapani S., 2011; Ekiel A., 2016; Fernandez J., 2016). В литературе имеются многочисленные данные, свидетельствующие о том, что урогенитальные микоплазмы могут быть причиной бесплодия у женщин и мужчин, влиять на течение и исход беременности, а также вызывать инфекционные заболевания у новорожденных (Фофанова И.Ю., 2010; Мустафина Л.Р., 2012; Савичева М.А., 2014; Белова А.В., 2014, 2015; Карапетян Т.Э., 2017; Redelinguys M.J., 2014; Zeinab A.A., 2014; Azizmohammadi S., 2015; Beeton M.L., 2016).

В настоящее время проблема сохранения репродуктивного здоровья населения является глобальной и социально значимой. В России и зарубежных странах проводятся исследования, посвященные анализу распространенности антибиотикорезистентных штаммов урогенитальных микоплазм среди различных групп населения. Однако подобные работы ограничиваются небольшой выборкой обследуемых групп, характеристикой общих биологических свойств микоплазм и фенотипических проявлений их устойчивости (Лысенко О.В., 2010; Херувимова Е.С., 2010; Белькова Ю.А., 2011; Андреева И.В., 2012; Руденкова Т.В., 2013; Гусейнадзе М.И., 2014; Байтяков В.В., 2016; William A.A., 2014; Zeng X.Y., 2016). Единичными являются публикации, посвященные изучению распространенности различных генетических детерминант резистентности и молекулярных

механизмов устойчивости *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*.

Важно отметить, что в настоящее время, как в Российской Федерации, так и за рубежом имеется существенный недостаток информации о полной последовательности генома штаммов урогенитальных микоплазм, включая детерминанты резистентности и патогенности. В международной базе GenBank/NCBI депонированы полные последовательности генома лишь 12 штаммов *M. hominis*, 14 - *U. urealyticum* и 10 - *U. parvum*, что существенно осложняет изучение их эволюционного разнообразия.

Все вышеперечисленное определяет целесообразность исследований, направленных на изучение молекулярных механизмов устойчивости урогенитальных микоплазм, ассоциированных с инфекциями органов репродукции и мочевыводящих путей.

**Цель работы** – оценка динамики антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм, циркулирующих среди населения г. Нижнего Новгорода в период с 2006 по 2017гг., характеристика механизмов резистентности с использованием молекулярно-генетических технологий.

**Задачи исследования:**

1. Определить распространенность и фенотип антибиотикорезистентности штаммов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, выделенных в период с 2006 по 2017гг. у женщин и мужчин репродуктивного возраста.
2. Провести поиск tetM детерминаты резистентности у изолятов *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.*
3. Оценить распространенность мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* и 23S рРНК штаммов *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*.
4. С использованием полногеномного секвенирования определить механизмы резистентности к фторхинолонам и макролидам клинических изолятов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*.
5. Провести филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей генома российских изолятов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*, резистентных к фторхинолонам и макролидам.

#### **Научная новизна**

Впервые в условиях промышленного мегаполиса проведено крупномасштабное динамическое исследование антибиотикорезистентности к антибиотикам клинических изолятов микоплазм и уреаплазм, ассоциированных с широким спектром заболеваний органов урогенитального тракта.

Получены новые данные о распространенности *M. hominis*, *M. genitalium*, *U. urealyticum* и *U. parvum*, циркулирующих среди населения Нижнего Новгорода.

Впервые с использованием высокотехнологичных методов, в частности NGS-секвенирования, получена молекулярно-генетическая характеристика

маркеров резистентности к макролидам и фторхинолонам урогенитальных микоплазм.

Впервые в Российской Федерации описаны и охарактеризованы гены, кодирующие белки семейства эффлюксной системы MATE, у клинических изолятов *Mycoplasma hominis*.

Информация о распространенности антибиотикорезистентных штаммов *M. genitalium*, выделенных у женщин и мужчин репродуктивного возраста г. Нижнего Новгорода, впервые размещена в системе мониторинга антибиотикорезистентности Российской Федерации - «AMRmap» (<http://map.antibiotic.ru/>) и доступна специалистам научных и медицинских организаций.

Полученные нуклеотидные последовательности полного генома российских изолятов *M. hominis* (10), *U. urealyticum* (4) и *U. parvum* (2) депонированы в международной базе данных GenBank/EMBL/DBJ.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Новые знания, полученные в результате проведенных исследований, вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов формирования антибиотикорезистентности микоплазм и уреоплазм, доминирующих в этиологии инфекций мочеполовой системы и органов репродукции, и могут быть использованы в системе подготовки учащихся медицинских и биологических ВУЗов.

Выявленные мутационные изменения в генах, кодирующих субъединицы топоизомераз (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), рибосомные белки L4 и L22, а также белки эффлюксной системы MATE могут служить дополнительными эпидемиологическими маркерами урогенитальных микоплазм.

Результаты выполненного исследования использованы при разработке информационно-методического письма «Новые данные о распространенности и способах детекции генетических детерминант антибактериальной резистентности генитальных микоплазм, ассоциированных с заболеваниями УГТ», методических рекомендаций «Молекулярная диагностика инфекций, вызванных бактериями рода *Mycoplasma*, у детей», ноу – хау «Способ подготовки библиотеки с таргетным обогащением для последующего полногеномного секвенирования образцов ДНК, экстрагированных из культур генитальных микоплазм».

Результаты диссертации используются в работе специалистов гинекологического отделения ГБУЗ НО «Городской клинической больницы №12 Сормовского района г. Нижнего Новгорода» при назначении рациональной антибиотикотерапии воспалительных заболеваний органов урогенитального тракта различной локализации и нарушений функции репродукции, что подтверждено актом внедрения.

Международная база данных GenBank/EMBL/DBJ пополнена полными нуклеотидными последовательностями геномов 16 российских изолятов урогенитальных микоплазм.

### Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм, циркулирующих среди населения репродуктивного возраста г. Нижнего Новгорода. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использовали микробиологические, молекулярно-генетические, биоинформационные и статистические методы.

#### Личный вклад автора.

Представленные в работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследования, включая планирование и проведение экспериментов, статистическую обработку и анализ полученных результатов, оформление и публикацию статей. Микробиологические исследования (индикация, идентификация *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp* и определение их чувствительности к антибиотикам) выполнены лично автором. Молекулярно-генетические исследования (поиск генетических детерминант резистентности к тетрациклам и эритромицину, полногеномное секвенирование изолятов *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*) проведены на базе лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов (руководитель Бруснигина Н.Ф.) Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной при непосредственном участии автора. Исследования по изучению механизмов резистентности клинических изолятов *M. genitalium* к макролидам и фторхинолонам выполнены совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) ФГБОУ ВО «СГМУ» МЗ РФ под руководством Эйдельштейн И.А.

#### Положения, выносимые на защиту:

1. Урогенитальные микоплазмы, выделенные у репродуктивного населения Нижегородского региона в 2006 - 2017гг., характеризуются устойчивостью к фторхинолонам (95,5% *Ureaplasma spp.* и 41% *M. hominis*) и макролидам (27% *M. hominis* и 11,2% *Ureaplasma spp.*), наиболее часто применяемым в терапии урогенитальных инфекций.
2. Устойчивость к фторхинолонам у 50% клинических изолятов микоплазм и уреаплазм обусловлена классическими мутационными изменениями в генах *gyrA*, *parC* и *parE*, у других - активным выведением антибиотика из клетки посредством различных эффлюксных систем: ABC и MATE. Гены, кодирующие белки семейства MATE, у российских изолятов *Mycoplasma hominis* описаны впервые.
3. Резистентность к макролидам *U. urealyticum* и *U. parvum* обусловлена впервые выявленными мутационными изменениями в рибосомных белках L4 и L22, а также метилированием 23S рРНК посредством *erm* генов. У клинических изолятов *M. hominis*, циркулирующих в Нижегородском регионе, резистентность к макролидам связана с наличием нуклеотидной замены цитозина на урацил (C→U) в позиции 2610 V домена 23S рРНК, а также с

ранее не описанной аминокислотной заменой изолейцина на валин (I→V) в 120 позиции рибосомного белка L22.

### **Апробация результатов**

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на Всероссийских и международных конференциях: Всероссийской НПК, посвященной 95 – летию ФБУН НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной «Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения» (Нижний Новгород, 2014); XVI Всероссийском научном форуме «Мать и дитя» (Москва, 2015); Всероссийской НПК, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Нижний Новгород, 2016); VIII, IX, X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016, 2017, 2018); VIII, X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Москва, 2016; 2018); XVIII, XIX Международном медицинском форуме «Качество и безопасность оказания медицинской помощи» (Нижний Новгород, 2017; 2018), Окружной НПК эпидемиологов ПФО «Эпидемиологическая безопасность медицинской помощи и противоэпидемическое обеспечение населения», Межрегиональной НПК эпидемиологов ПФО «Эпидемиологическая и микробиологическая характеристика актуальных инфекций и технологии управления заболеваемостью населения» (Нижний Новгород, 2018); XXII Нижегородской сессии молодых ученых (Княгинино, 2017); IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2017» (Москва, 2017); 28-ом Европейском конгрессе Клинической микробиологии и Инфекционных болезней ECCMID (Мадрид, Испания, 2018).

Исследования осуществлялись в рамках отраслевых научно-исследовательских программ «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011-2015гг. и «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» на 2015-2020гг. (регистрационный номер – АААА-А16-116111610215-2).

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ, среди которых 4 публикации в рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК для защиты кандидатских и докторских диссертаций, 3 в рецензируемых изданиях, 1 депонированная рукопись в ВИНТИ РАН и 6 тезисов в материалах Международных и Всероссийских научных конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста и состоит из введения, одной главы обзора литературы, трех глав собственных

исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективных направлений дальнейшей разработки темы и списка цитируемой литературы. Диссертация иллюстрирована 23 таблицами и 26 рисунками. Библиографический указатель включает 177 источника литературы (91 – отечественных и 86 зарубежных авторов).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы.** Проведено исследование 77810 образцов клинического материала (соскобов эпителия цервикального канала, уретры и вагины), собранного у женщин и мужчин репродуктивного возраста, обратившихся в медицинские организации с профилактической целью, с признаками воспалительных заболеваний УГТ (уретрит, оофорит, кольпит, вагинит, цервицит, эрозия шейки матки), нарушением репродуктивной функции (бесплодие, ОАГА). В группу сравнения включены образцы клинического материала, полученные от женщин (n=20867) и мужчин (n=1238), не имеющих жалоб на момент обращения в лечебно-профилактические учреждения. Клинические образцы на исследование поступали из медицинских организаций г. Нижнего Новгорода: ГБУЗ НО «Женская консультация №1», «Женская консультация №3» и «Женская консультация №5»; ГБУЗ НО «Родильный дом №1» и «Родильный дом №7»; ГБУЗ НО «Городская клиническая больница № 12»; медицинские центры: «Аист», «Элегра». Отбор и транспортировка материала осуществлялись в соответствии с МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории» в процедурных кабинетах стационаров и женских консультаций. С целью изучения распространенности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* среди населения Нижегородского региона были исследованы 27460 образцов (25241 женщин и 2219 мужчин), *M. genitalium* - 50350 образцов (49330 женщин и 1020 мужчин). Определена чувствительность 1816 изолятов *M. hominis*, 48 *M. genitalium* и 9178 *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам различных групп. Проведено полногеномное секвенирование 16 клинических изолятов *M. hominis* (10), *U. urealyticum* (4), *U. parvum* (2), устойчивых к фторхинолонам и макролидам.

**Микробиологические методы исследования.** Индикацию, идентификацию, определение клинически значимого титра (концентрация  $\geq 10^4$  КОЕ) и антибиотикограммы *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* осуществляли с использованием коммерческих питательных сред «Микоплазма Микротест» (ФСР 2008/03366) и «Уреаплазма Микротест» (ФСР 2008/03367) производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва. Чувствительность *M. hominis* определяли к 7 АБП: доксициклину, гентамицину, офлоксацину и ципрофлоксацину, клиндамицину, мидекамицину и джозамицину; *Ureaplasma spp.* к 9 АБП: доксициклину, эритромицину, рокситромицину, кларитромицину, азитромицину, мидекамицину, джозамицину, офлоксацину и ципрофлоксацину методом серийных разведений в жидкой питательной среде в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.1890-04



«Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

**Молекулярно-генетические методы исследования.** Выделение и очистку ДНК *M. genitalium*, *M. hominis* и *U. urealyticum*, *U. parvum* проводили сорбционным методом с применением наборов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ФСР 2012/14204) и «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ФСР 2012/14019) согласно инструкции производителя (ЦНИИЭ, Москва). Скрининг образцов на наличие ДНК *M. genitalium* осуществляли с применением коммерческой тест-системы «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» (ФСР 2007/00580), (ЦНИИЭ) с гибридизационно - флуоресцентной детекцией («по конечной точке»). Поиск генетических детерминант резистентности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* к тетрациклам проводили методом классической ПЦР с использованием коммерческой тест-системы «Тетрапол», выявление детерминант устойчивости к эритромицину изолятов уреаплазм осуществляли при помощи коммерческого набора «Эритропол» согласно инструкциям производителя (НПФ «Литех», Москва). Детекцию продуктов амплификации проводили путем горизонтального электрофореза в 1,8% агарозном геле. Визуализацию и учет результатов ПЦР осуществляли с помощью гель-документирующей видеосистемы «Geldoc EZ» и программы Image Lab 5.0 (Bio-Rad).

Наличие мутаций в V домене 23S рРНК и QRDR области генов *parC* и *gyrA*, обуславливающих устойчивость штаммов *M. genitalium* к макролидам и фторхинолонам, определяли с использованием ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером согласно протоколу патентообладателя (Романов А.В. с соавт., патент на изобретение РФ от 27.09.2017г. №2646123 «Способ выявления мутаций, приводящих к резистентности у *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma pneumoniae* к макролидным антибиотикам»). Секвенирование генов *parC* и 23S рРНК *M. genitalium* проводили с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США) и набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно прилагаемым протоколам. Полногеномное секвенирование клинических изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum*, *U. parvum* проводили на платформе Illumina - секвенаторе MiSeq (США). Подготовку библиотеки ДНК для секвенирования осуществляли с использованием набора Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, США), согласно инструкции производителя. Оценку качества подготовленной библиотеки ДНК для секвенирования определяли с использованием флуориметра Qubit и набора Qubit DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США), автоматизированной системы капиллярного гель - электрофореза QIAxcel Advanced System и набора реагентов для быстрого разделения фрагментов ДНК «QIAxcel DNA Fast Analysis Kit (3000)» (QIAGEN, Германия). Секвенирование проводили с использованием набора MiSeq reagent kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов.

**Биоинформационные и статистические методы исследования.** Выравнивание и сборку полученных коротких чтений относительно

референс генома осуществляли с использованием встроенного в секвенатор программного обеспечения. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали программу Burrows-Wheeler Aligner (BWA). В качестве референса служили полногеномные последовательности штаммов: *Mycoplasma hominis* ATCC 23114 (номер GenBank FP236530.1), *Ureaplasma urealyticum* serovar 10 str. ATCC 33699 (номер GenBank NC\_011374.1), *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 700970 (номер GenBank NC\_002162.1). Визуализацию и анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения UGENE Unipro (Okonechnikov K., 2012). Аннотацию генома проводили с использованием сервера Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) и NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). Анализ последовательности генов (*guyA*, *guyB*, *parC*, *parE*, 23S рРНК, L4, L22, МАТЕ, АВС) *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*, проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTALX 2.0 (<http://bips.ustrasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>) (Thompson J.D., 1994). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов исследуемых штаммов проводили с использованием web-сервиса REALPHY Online tool версия 1.12 (<https://realphy.unibas.ch/cgi/realphy>). Построение филогенетических деревьев осуществляли методом Neighbour joining с использованием программного обеспечения MEGA 7.

Статистическую обработку и анализ данных проводили методами вариационной статистики с определением среднеарифметической величины, показателя средней ошибки среднеарифметической величины ( $m$ ), и вычислением критерия достоверности ( $t$ ). Доверительным считали различие между сравниваемыми величинами с уровнем доверительной вероятности 95% и 99%. При этом  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ . Статистический анализ проводили с помощью общепринятых алгоритмов в программах Microsoft office (Excel), пакета статистических программ Statz, Statistica 6,0, Biostat.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

### *Распространенность и клиническая значимость урогенитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин г. Нижнего Новгорода.*

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о широком распространении *Ureaplasma spp.* среди взрослого населения крупного промышленного центра. Определено, что частота выявления *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* в клинически значимых титрах ( $\geq 10^4$  КОЕ) у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями УГТ была выше, чем в группах сравнения. Наиболее ярко это выражено при вагините, кольпите, аднексите и эрозии шейки матки у женщин, уретрите у мужчин, что свидетельствует о значении *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* в развитии данных форм патологий (Таблица 1, 2).

Таблица 1.

Распространение урогенитальных микоплазм у женщин с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта

Заболевание	Частота выявления (в %)		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>
Аднексит (n=307)	<b>61,3±2,8*</b>	<b>26,8±2,5*</b>	0,8±0,5
Вагинит (n=170)	<b>68,2±3,6*</b>	<b>27,6±3,4*</b>	0,6±0,5
Кольпит (n=312)	<b>68±2,6*</b>	<b>40,7±2,8*</b>	0,8±0,5
Цервицит (n=211)	56,2±3,4*	25,3±3,0*	1,4±0,8
Сальпингит (n=129)	61±4,3*	22,8±3,7*	0,9±0,7
Эндометриит (n=149)	51,7±4,1*	31,3±3,8*	0,6±0,6
Эрозия шейки матки (n=296)	<b>63,8±2,8*</b>	<b>36±2,8*</b>	0,5±0,4
Гр.сравнения(n=20867)	28,3±0,3	7,5±1,2	0,4±0,01

Примечание: \* данные, достоверно различающиеся с группой сравнения,  $p < 0,01$ .

Таблица 2.

Распространение урогенитальных микоплазм у мужчин с воспалительными заболеваниями органов урогенитального тракта

Заболевание	Частота выявления (в %)		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>
Уретрит (n=228)	<b>41,7±3,2*</b>	<b>21,5±2,7*</b>	1,1±0,7
Простатит (n=187)	33,7±3,4*	11,2±2,3*	0,8±0,6
Гр.сравнения (n=1238)	18,7±1,1	5,6±0,6	0,6±0,2

Примечание: \* данные, достоверно различающиеся с группой сравнения,  $p < 0,01$ .

Показатели инфицированности женщин и мужчин *M. genitalium* практически не отличались, и составляли в среднем 1,2% и 1,4% соответственно.

### Характеристика антибиотикорезистентности клинических изолятов *Ureaplasma spp.* и *M. hominis*

На протяжении всего периода мониторинга (с 2006 по 2017гг.) антибиотикорезистентности зафиксированы высокие показатели частоты выявления устойчивых штаммов *Ureaplasma spp.* (Рисунок 1). Устойчивыми к действию одного и более классов антибактериальных препаратов оказались 85,7% *Ureaplasma spp.*



Рисунок 1. Частота выявления антибиотикорезистентных *Ureaplasma spp.* в период с 2006 по 2017гг.

Доля полирезистентных изолятов уреаплазм в течение всего периода наблюдения была невысокой и варьировала от 3% в 2012г. до 14,4% в 2017г., максимальные показатели зарегистрированы в 2006 (29,8%) и 2014гг. (23,1%) (Рисунок 2).

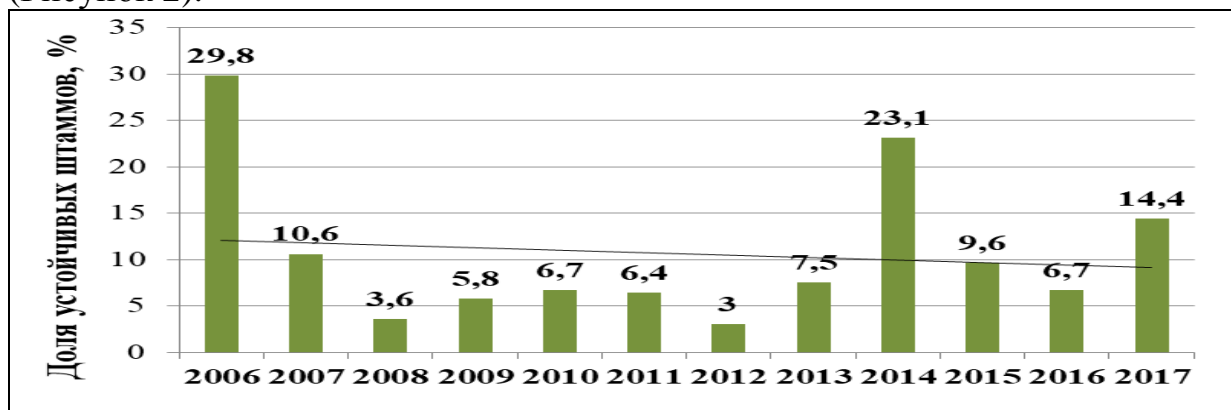


Рисунок 2. Частота выявления полирезистентных *Ureaplasma spp.* в период с 2006 по 2017гг.

На протяжении всего периода наблюдения подавляющее большинство изолятов *Ureaplasma spp.* характеризовалось устойчивостью к препаратам фторхинолонового ряда, а именно к ципрофлоксацину (от 93,3% в 2006г. до 99,8% в 2012г.). Доля офлоксацин-резистентных форм уреаплазм варьировала от 63,7% в 2006г. до 84,6% в 2012г., с 2013г. отмечается снижение этого показателя с 42,7% до 26,4% (2017г.) (Рисунок 3).

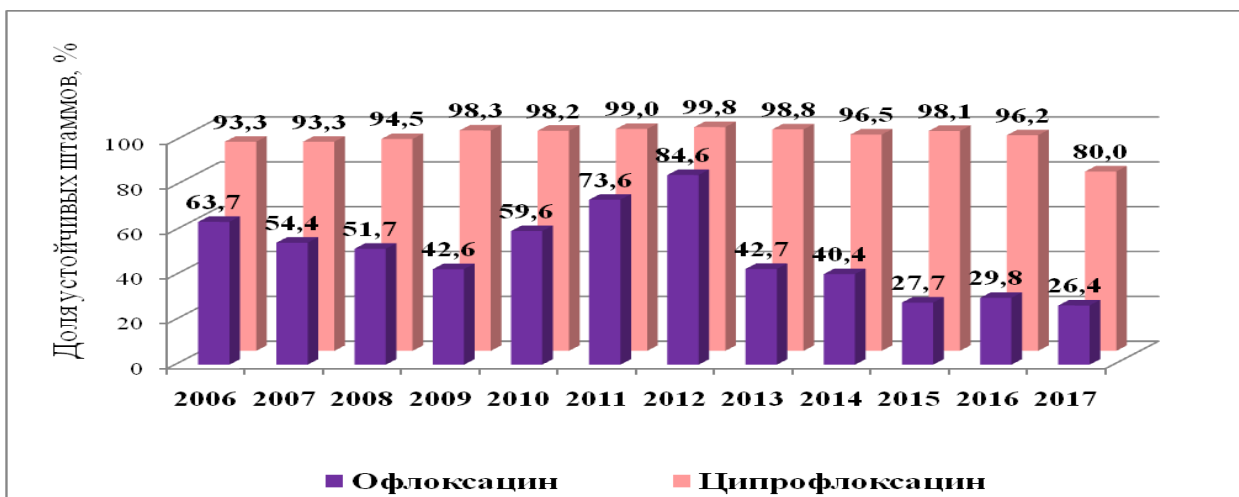


Рисунок 3. Доля фторхинолон-резистентных изолятов *Ureaplasma spp.* в период с 2006 по 2017гг.

Установлено, что препаратами, эффективно подавляющими рост уреаплазм, являются джозамицин (0,2% устойчивых изолятов), кларитромицин (0,4%), мидекамицин (0,6%), рокситромицин (1,5%) и доксициклин (2,5%). Спектры резистентности *Ureaplasma spp.* отличались разнообразием, выявлено более 40 вариантов комбинаций антибиотикоустойчивости.

Частота выявления устойчивых изолятов *M. hominis* была существенно ниже, чем уреаплазм и составила 10,3%. Подавляющее большинство изолятов *M. hominis* характеризовались монорезистентностью (76,8%). Доля полирезистентных *M. hominis* была высокой и составила 23,2%. Высокоактивным препаратом в отношении *M. hominis* оказался гентамицин (3,6% резистентных изолятов) (Рисунок 4).

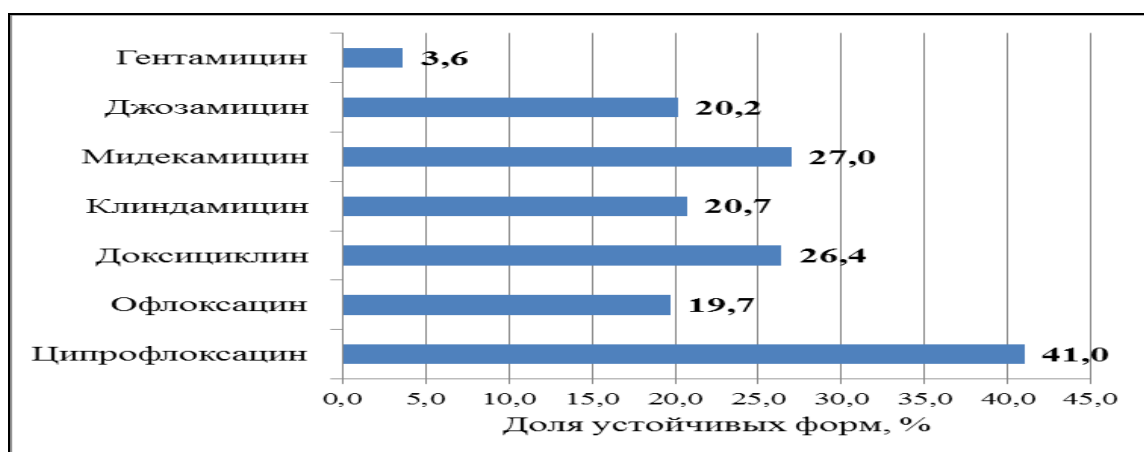


Рисунок 4. Доля устойчивых *M. hominis* к различным антибиотикам в период с 2006 по 2017гг.

Спектры резистентности *M. hominis* были менее разнообразными, чем у уреаплазм, выявлено менее 10 вариантов комбинаций устойчивости.

### **Выявление генетических детерминант резистентности *Ureaplasma spp.* и *M. hominis* с использованием метода ПЦР**

Один из этапов исследования заключался в определении механизмов резистентности *Ureaplasma spp.* (n=121) и *M. hominis* (n=60) к тетрациклинам с использованием метода классической ПЦР. Установлено широкое распространение tetM детерминанты как у клинических изолятов *M. hominis* (28%), так и *Ureaplasma spp.* (26%) (Рисунок 5).

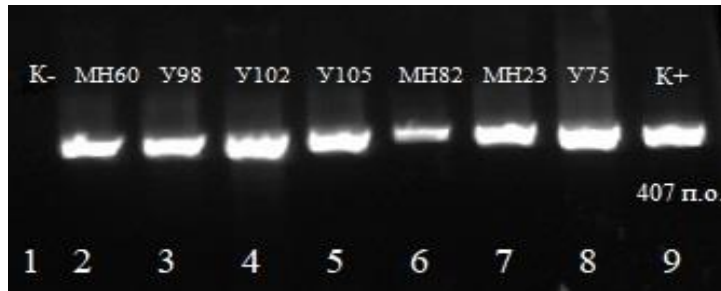


Рисунок 5. Электрофореграмма продуктов амплификации участка tetM - детерминанты, выделенной у клинических изолятов микоплазм и уреаплазм.

Примечание: 1 трек - K— отрицательный контроль, 9 трек - K+ -положительный контроль, содержащий специфический фрагмент ДНК длиной 407 п.о. треки 2, 4, 5 - положительные пробы, содержащие специфический фрагмент ДНК tetM детерминанты, выявленной у изолятов *M. hominis*, треки 3, 4, 5, 8 - положительные пробы, содержащие специфический фрагмент ДНК tetM детерминанты, выявленной у изолятов уреаплазм.

С целью определения механизма устойчивости изолятов *Ureaplasma spp.* (n=121), имеющих эритромицин-резистентный фенотип, был проведен поиск гена ermB (Рисунок 6).

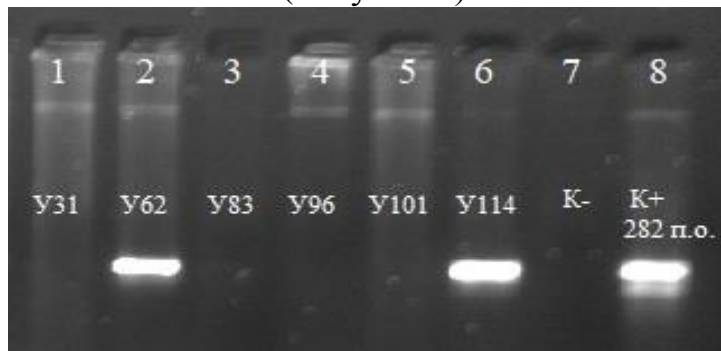


Рисунок 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР участка гена ermB, на примере клинических изолятов уреаплазм.

Примечание: трек 7 - K— отрицательный контроль, трек 8 - K+ - положительный контроль, содержащий специфический участок ДНК гена ermB длиной 282 п.о. Треки 1,3,4,5 - отрицательные образцы, треки 2 и 6 - положительные образцы *Ureaplasma spp.*

Показано, что в 16 % случаев резистентность уреаплазм к эритромицину была обусловлена метилированием 23S рРНК посредством гена ermB.

### **Определение устойчивости к макролидам и фторхинолонам *M. genitalium* с использованием ПЦР-РВ**

При оценке устойчивости к макролидам установлено, что два штамма *M. genitalium* из 48 включенных в исследование в гене 23S рРНК имели точечную замену аденина (A) на гуанин (G) в позиции 2058, другие штаммы (n=46) не имели мутаций в гене 23S рРНК, т.е. имели фенотип «дикого типа».

Эти же штаммы *M. genitalium* были протестированы на наличие устойчивости к препаратам фторхинолонового ряда. У одного штамма *M.*

*genitalium* была выявлена мутация в QRDR области гена *parC*, в результате которой произошла аминокислотная замена D84Y, приводящая к нарушению связывания фторхинолонов с топоизомеразой IV.

***Изучение молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов U. urealyticum, U. parvum и M. hominis с использованием полногеномного секвенирования***

С целью определения молекулярных механизмов резистентности *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* проведено полногеномное секвенирование 10 клинических изолятов *M. hominis*, 4 - *U. urealyticum*, 2 - *U. parvum*, резистентных к фторхинолонам и макролидам. Большинство изолятов *M. hominis* обладали устойчивостью к одному из следующих препаратов: офлоксацину, ципрофлоксацину или мидекамицину. Все изоляты уреоплазм, включенные в исследование, характеризовались полирезистентностью.

Обнаружены множественные мутационные изменения в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* исследуемых клинических изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*, что свидетельствует о высоком уровне их видового полиморфизма. Установлено, что молекулярными механизмами фторхинолон-резистентности у части исследуемых штаммов *M. hominis* (4/10) и *U. parvum* (1/2) и *U. urealyticum* (1/4) являются мутационные изменения в «горячих точках» QRDR области генов - *gyrA*, *parC* и *parE*, кодирующих субъединицы топоизомераз. В структуре QRDR области гена *gyrA* у двух штаммов *M. hominis* M45 и M57 обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции. У двух исследуемых штаммов *M. hominis* MH1002 и MH1866 в гене *parC* выявлена мутация, приводящая к замене лизина (K) на аргинин (R) в 144 положении. У *U. parvum* 445a выявлена замена серина (S) на лейцин (L) в 83 положении А субъединицы топоизомеразы IV (Рисунок 7).

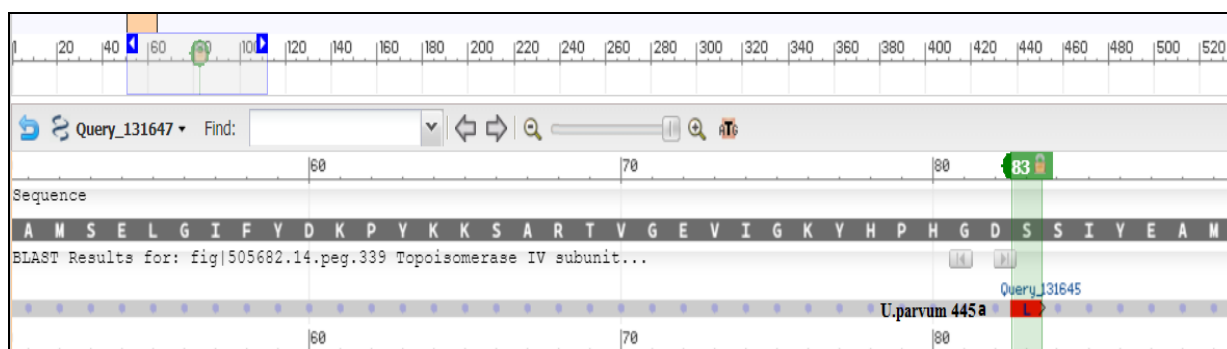


Рисунок 7. Участок А субъединицы топоизомеразы IV клинического изолята *U. parvum* 445 (выделена аминокислотная замена серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции).

В гене *parE* изолята *U. urealyticum* 1000a установлена мутация, детерминирующая замену аспарагина (N) на аспарагиновую кислоту (D) в 151 положении. Кроме этого, в позициях 145 и 153 также найдены дополнительные, ранее не описанные аминокислотные замены, вероятно, участвующие в процессе формирования фторхинолон-резистентности данного изолята.

В геноме всех исследуемых изолятов микоплазм и уреаплазм обнаружены гены, кодирующие белки семейства ABC транспортеров, роль которых в формировании антибиотикоустойчивости урогенитальных микоплазм экспериментально доказана Raheerison S. et al. (2002г.). У половины изученных изолятов микоплазм и уреаплазм устойчивость к фторхинолонам, вероятно, обусловлена активным выведением антибиотика из клетки посредством ABC транспортеров. Кроме ABC – транспортеров в геноме всех исследуемых *M. hominis* обнаружены гены, кодирующие белки семейства MATE, являющиеся аналогами эффлюксной системы многих бактерий и ответственные за формирование множественной лекарственной устойчивости. Все анализируемые гены, кодирующие белки эффлюксной системы MATE, являются многокомпонентными и содержат в себе неполные гомологичные последовательности двух доменов, таких как суперсемейства - MATE\_like superfamily (MATE\_like 5, 8, 4, 14, 6, MATE\_MepA\_like, MATE\_yoeA\_like) и NorM superfamily (vmrA, NorM, matE) (Рисунок 8).

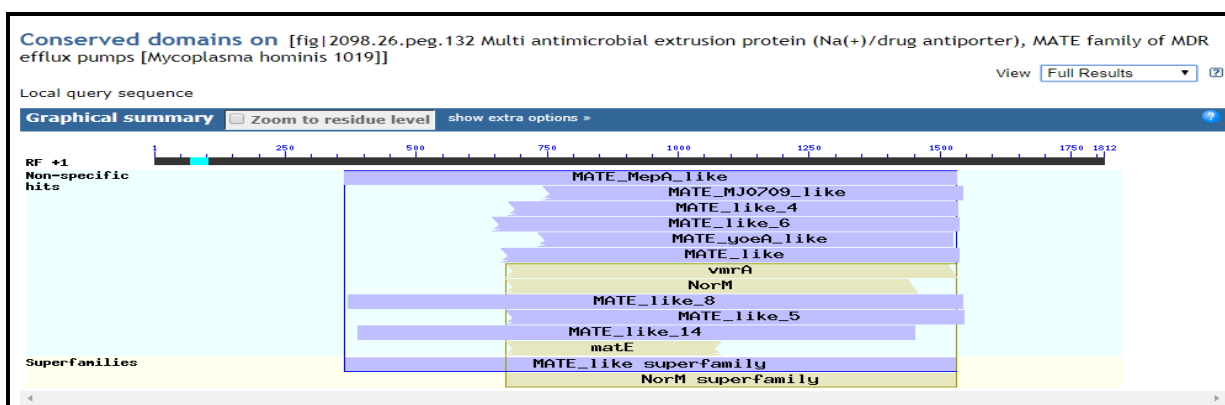


Рисунок 8. Структура генов, кодирующих белки семейства MATE, на примере клинического изолята *M. hominis* 1019.

Сравнительный анализ последовательности генов, кодирующих белки MATE, десяти изолятов *M. hominis* относительно эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1) выявил существенные различия, заключающиеся в количестве нуклеотидных замен (от 30 до 49). В то же время точечные мутации, приводящие к изменению кодонов аминокислот, встречались гораздо реже: от одной у *M. hominis* M45 до четырех у *M. hominis* 1817, *M. hominis* 1019, *M. hominis* M57. Характеристика генов, кодирующих белки семейства эффлюксной системы MATE, у российских изолятов *M. hominis* дана впервые.

С целью определения молекулярного механизма макролид-резистентности клинических изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum* проведено выравнивание и анализ генов 23S рРНК и генов, кодирующих рибосомные белки L4 и L22. Установлено, что основным молекулярным механизмом устойчивости *M. hominis* к макролидам является структурное изменение в V домене 23S рРНК в результате замены цитозина на урацил в положении 2610. Отмечено, что у изолята *M. hominis* 529, кроме точечных



нуклеотидных замен в 23S рРНК впервые найдены изменения в рибосомном белке L22, а именно замена валина (V) на изолейцин (I) в положении 120 (Рисунок 9).

50S ribosomal protein L22 [Mycoplasma hominis]				
Sequence ID: <a href="#">gi 502618702 WP_012855569.1</a> Length: 129 Number of Matches: 1				
<a href="#">▶ See 8 more title(s)</a>				
Range 1: 1 to 129 <a href="#">GenPept</a> <a href="#">Graphics</a>			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
249 bits(636)	1e-83	128/129(99%)	129/129(100%)	0/129(0%)
MH529 1	MAKEILQNSAHASVRMORISPRKARLVADLIRYKSATQAIIVILKHTHKKASEIILKLLNS			60
Sbjct 1	MAKEILQNSAHASVRMORISPRKARLVADLIRYKSATQAIIVILKHTHKKASEIILKLLNS			60
MH529 61	AIANATNNAGLDATKLYVTITLVNDGPTLKRFPHSRGRAYAILKRTSHFFIELTEINIV			120
Sbjct 61	AIANATNNAGLDATKLYVTITLVNDGPTLKRFPHSRGRAYAILKRTSHFFIELTEINIV			120
MH529 121	EEINKKGDK 129			
Sbjct 121	EEINKKGDK 129			

Рисунок 9. Выравнивание аминокислотной последовательности белка L22 изолята *M. hominis* 529. Выделена замена I120V.

У исследуемых клинических изолятов *U. urealyticum* и *U. parvum* классических нуклеотидных замен в V домene гена 23S рРНК нами не обнаружено. Устойчивость изученных штаммов *U. urealyticum* и *U. parvum* к макролидам обусловлена впервые описанными мутационными изменениями в генах, кодирующих рибосомные белки L4 и L22 (Таблица 5, 6).

Таблица 5.

Аминокислотные замены в белке L4 изолятов *Ureaplasma ssp.*

Изолят	Мутации	
	Нуклеотидные замены	Аминокислотные замены
<i>U. urealyticum</i> 445	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)
<i>U. parvum</i> 445a	A241G	81 аланин (A) – треонин (T)
	C480A	160 валин (V) – аланин (A)
	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)
<i>U. urealyticum</i> 1000 <i>U. urealyticum</i> 1051	G242C	81 аланин (A) – глицин (G)
	C480A	160 валин (V) – аланин (A)
	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)

Таблица 6.

Аминокислотные замены в белке L22 изолятов *Ureaplasma ssp.*

Изолят	Мутации	
	Нуклеотидные замены	Аминокислотные замены
<i>U. urealyticum</i> 445	G654A	219 валин (V) → изолейцин (I)
<i>U. urealyticum</i> 1000a <i>U. parvum</i> 1051a	C394U	132 аланин (A) – валин (V)
	A406G	136 изолейцин (I) - валин (V)
	C454U	152 изолейцин (I) - треонин (T)
	G556A	186 лизин (K) – глут.кис-та (E)
	A655G	219 изолейцин (I) - валин (V)
	G773A	258 серин (S) - аспарагин(N)

С целью определения эволюционного разнообразия антибиотикорезистентных клинических изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*, циркулирующих на территории Нижегородского региона, нами был проведен филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей их генома. Показана генетическая гетерогенность клинических изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*.

Определено, что изолят *M. hominis* M45 наиболее отдален от российских изолятов микоплазм и выделен в отдельную филогенетическую ветвь (Рисунок 10). Наибольшая степень гомологии филогенетического родства наблюдается в парах клинических изолятов, образующих друг с другом единые кластеры *M. hominis* 1817 – *M. hominis* 1866 и *M. hominis* 1861 – *M. hominis* 1991. Следует отметить, что изолят *M. hominis* 621 и эталонный штамм *M. hominis strain H34*, выделенный в России (Гущин А.Е. с соавт., 2017), образуют единый кластер, филогенетически ближе к ним российский изолят *M. hominis strain TOA*.

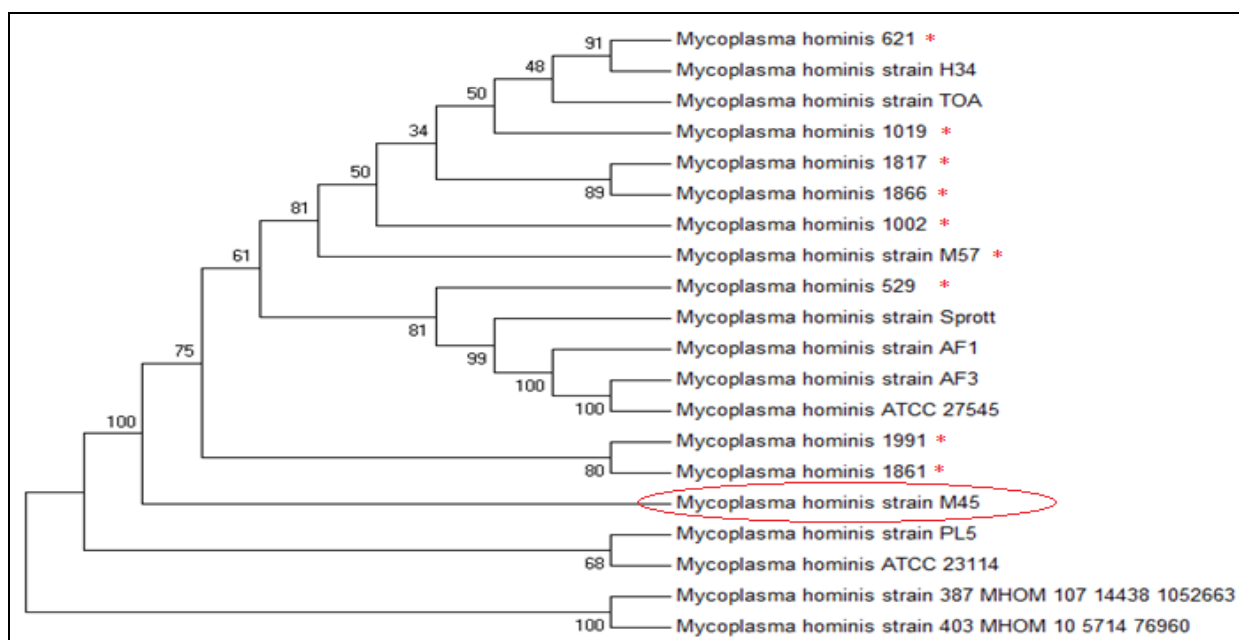


Рисунок 10. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей геномов изученных штаммов *M. hominis* и депонированных в базе данных GenBank/NCBI, построенная с использованием метода Neighbour joining.

Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap.

Филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей клинических изолятов уреоплазм позволил определить, что исследуемые изоляты *U. parvum* 445a и *U. parvum* 1051a занимают обособленное положение относительно штаммов основной филогенетической группы, геномы которых депонированы в GenBank/NCBI (Рисунок 11).

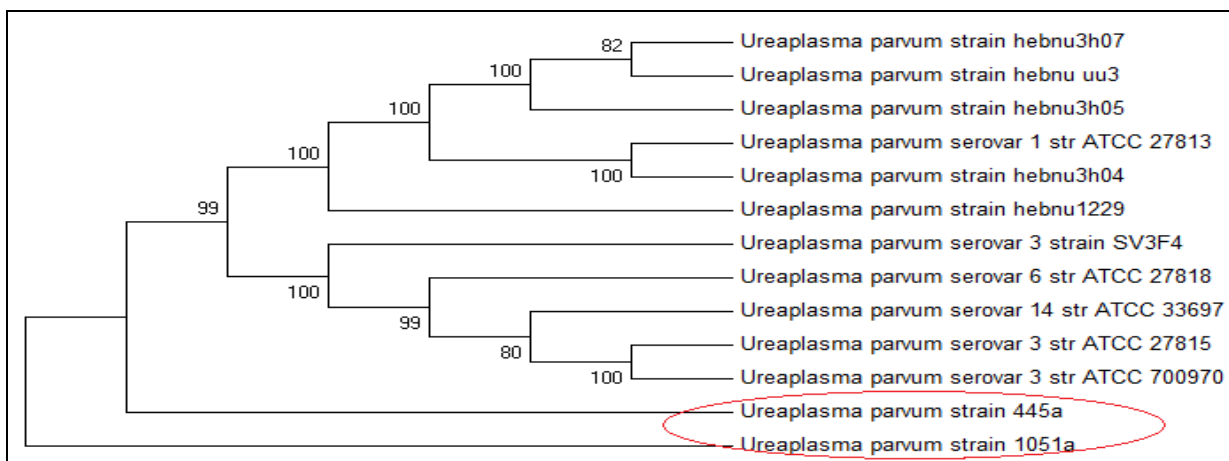


Рисунок 11. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей геномов изученных и депонированных в базе данных GenBank/NCBI штаммов *U. parvum*, построенная с использованием метода Neighbour joining. Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap.

Определено, что геномы штаммов *U. urealyticum* 445 и *U. urealyticum* 1051 являются наиболее удаленными от других геномов, депонированных в базе данных GenBank/NCBI, каждый из них занимает отдельную филогенетическую ветвь, изоляты *U. urealyticum* 1000 и *U. urealyticum* 1000a высокогомолочны и располагаются в одном кластере с референс - штаммом *U. urealyticum* serovar 10 str.ATCC 33699 (NC\_011374.1), выделенным в США (Shrivastava S. с соавт., в 2008г.) (Рисунок 12).

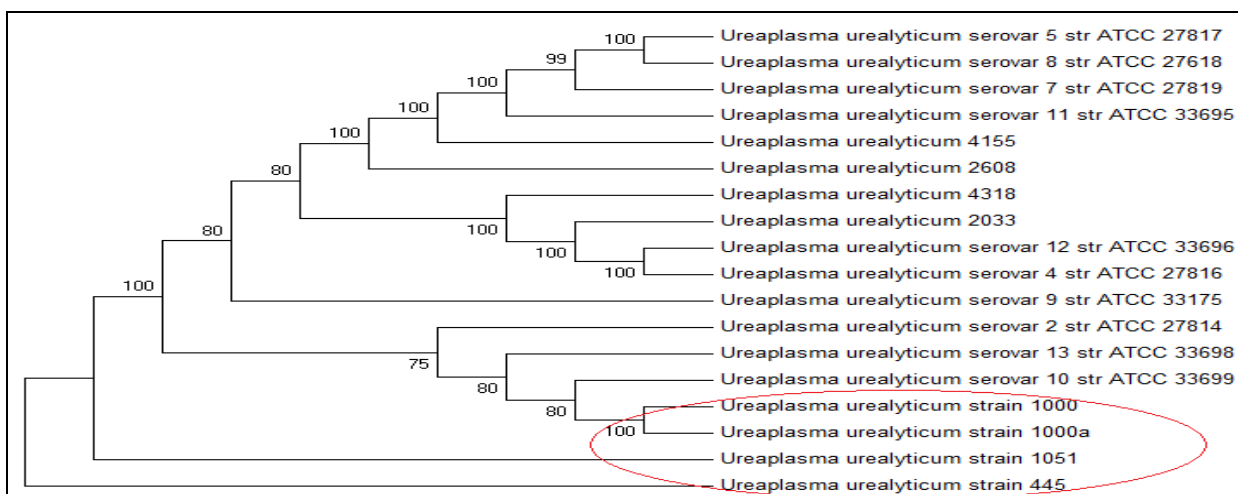


Рисунок 12. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей геномов изученных и депонированных в базе данных GenBank/NCBI штаммов *U. urealyticum*, построенная с использованием метода Neighbour joining. Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые в условиях промышленного мегаполиса проведено крупномасштабное динамическое исследование резистентности к антибиотикам клинических изолятов микоплазм и уреаплазм,

ассоциированных с широким спектром заболеваний органов урогенитального тракта. Определены спектры и уровни резистентности *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антибактериальным препаратам, наиболее часто применяемым в терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта. Показано широкое распространение tetM детерминанты резистентности, как у изолятов уреплазм, так и у микоплазм. Установлены основные молекулярные механизмы устойчивости к макролидам и фторхинолонам изолятов *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum*. На основании биоинформационного анализа последовательностей генома клинических изолятов *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum* выявлены не только известные, но и ранее не описанные мутационные изменения в генах, кодирующих топоизомеразы (ДНК-гираза и топоизомераза IV) и рибосомные белки (L4 и L22). С использованием NGS секвенирования, впервые у российских штаммов *M. hominis* описаны и охарактеризованы гены, кодирующие белки эффлюксной системы MATE, ответственные за формирование множественной лекарственной устойчивости.

Таким образом, полученные результаты исследования, имея прямое отношение к реализации «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации, позволили решить её основные задачи, а именно: оценить структуру популяции урогенитальных микоплазм, циркулирующих среди репродуктивного населения Нижегородского региона, установить распространенность полирезистентных штаммов и определить основные механизмы их антибиотикорезистентности.

## ВЫВОДЫ

1. На основании многолетнего мониторинга антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин репродуктивного возраста, показано, что 85,7% уреаплазм и 10,3% *M. hominis* характеризуются устойчивостью к действию одного и более классов антибактериальных препаратов. Установлено, что доля полирезистентных уреаплазм в течение всего периода наблюдения была невысокой и варьировала от 3% в 2012г. до 14,4% в 2017г., максимальные показатели зарегистрированы в 2006г. - 29,8%.
2. Подавляющее большинство *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* обладали устойчивостью к препаратам фторхинолонового ряда, наиболее часто применяемым в терапии воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы. Частота обнаружения ципрофлоксацин-устойчивых изолятов уреаплазм варьировала от 93,3% в 2006г. до 99,8% в 2012г.
3. Выявлено широкое распространение генетической детерминанты резистентности к тетрациклинам tetM у клинических изолятов *M. hominis* (28%) и *Ureaplasma spp.* (26%).
4. Установлено, что молекулярный механизм резистентности к фторхинолонам у ряда изолятов *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum* связан с мутационными изменениями в QRDR области генов -

*gyrA*, *parC* и *parE*, кодирующих субъединицы топоизомераз, у 50% микоплазм и уреаплазм - с активным выведением антибиотика из клетки посредством ABC транспортеров. Впервые у российских изолятов *M. hominis* охарактеризованы гены, кодирующие белки семейства эффлюксной системы MATE, ответственные за формирование и распространение множественной лекарственной резистентности.

5. Молекулярный механизм резистентности к макролидам у подавляющего большинства изолятов *M. hominis* обусловлен заменой цитозина на урацил в позиции 2610 гена 23S рРНК, а также с ранее не описанной аминокислотной заменой в рибосомном белке L22. Макролид-резистентность клинических изолятов *U. urealyticum* и *U. parvum* обусловлена впервые описанными мутационными изменениями в генах, кодирующих рибосомные белки L4 и L22, а также метилированием 23S рРНК посредством *erm* генов.

6. На основе филогенетического анализа определена генетическая гетерогенность клинических изолятов *M. hominis* M45, *U. urealyticum* (445, 1051), *U. parvum* (445a, 1051a), выделенных в отдельные филогенетические ветви относительно геномов бактерий, представленных в международной базе данных GenBank/NCBI.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Информация о спектре и уровне устойчивости урогенитальных микоплазм должна служить основой для выбора рациональной схемы этиотропной терапии урогенитальных инфекций, что позволит снизить риск развития осложнений и будет способствовать сохранению репродуктивного здоровья населения России.

2. Для обеспечения сбора данных о биологических свойствах урогенитальных микоплазм, доминирующих в этиологии инфекций мочевыводящих путей и органов репродукции, целесообразно проводить региональный мониторинг их антибиотикоустойчивости.

3. Мутационные изменения, выявленные в генах, кодирующих субъединицы топоизомераз (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), рибосомные белки L4 и L22, а также белки эффлюксной системы MATE, могут служить дополнительными эпидемиологическими маркерами урогенитальных микоплазм.

4. Рекомендуется осуществлять оценку и прогнозирование распространения антибиотикорезистентных штаммов *M. genitalium* с использованием онлайн - ресурса системы мониторинга антибиотикорезистентности Российской Федерации - «AMRmap» (<http://map.antibiotic.ru/>).

### ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным направлением дальнейших исследований является молекулярно-биологический мониторинг новых резистентных штаммов урогенитальных микоплазм и их генетических вариантов. Необходимо продолжить исследования по определению молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов *M. hominis*, *M. genitalium* и *Ureaplasma spp.* к макролидам, фторхинолонам и тетрациклинам. Актуальны исследования, направленные на изучение особенностей структуры генов патогенности урогенитальных микоплазм. В перспективе планируется

создание базы данных полных нуклеотидных последовательностей генома российских изолятов *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum*, выделенных у женщин и мужчин с различными воспалительными заболеваниями органов мочеполовой системы.

### **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

#### **Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК:**

- 1. Колесникова, Е.А.** Оценка распространенности антибиотикорезистентных штаммов генитальных микоплазм, выделенных у мужчин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение. – 2018. – №. 2 (I). – С. 4 – 7. (Список ВАК, РИНЦ – 0,547, авт. - 0,8 п.л.)
- 2. Колесникова, Е.А.** Полногеномное секвенирование штаммов *Mycoplasma hominis*, устойчивых к ципрофлоксацину / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, М.А. Махова, А.Е. Алексеева // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2018. - Т. 20, № 1. С. 68 - 72. (Список ВАК, РИНЦ – 1,329, авт. - 0,8 п.л.)
- 3. Колесникова, Е.А.** Лекарственная устойчивость генитальных микоплазм, ассоциированных с инфекциями мочеполовой системы / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Н.Н. Кленина // Инфекционные болезни. - 2017. - Т. 15, № S1. - С. 130. (Список ВАК, РИНЦ – 0,422, авт. - 0,6 п.л.)
- 4. Бруснигина, Н.Ф.** Мониторинг устойчивости к антибактериальным препаратам *M.hominis* и *U.urealyticum* - возбудителей инфекций уrogenитального тракта / Н.Ф. Бруснигина, **Е.А. Колесникова**, Е.И. Ефимов, М.А. Махова, О.М. Черневская, К.А. Орлова, Н.Н. Кленина // Инфекционные болезни. - 2016. - Т. 14, № S1. - С. 51 - 52. (Список ВАК, РИНЦ – 0,422, авт. - 0,3 п.л.)

#### **Публикации в других журналах и сборниках:**

- 1. Колесникова, Е.А.** Молекулярно-биологическая характеристика бактерий родов *Ureaplasma* и *Mycoplasma*, ассоциированных с заболеваниями уrogenитального тракта / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // Журнал МедиАль. - 2017. - № 2 (20). - С. 57 - 64.
- 2. Колесникова, Е.А.** Генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам и особенности факторов патогенности бактерий родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma*, ассоциированных с заболеваниями уrogenитального тракта / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // Аналитический обзор. Депонированная рукопись № 107-B2017 от 07.09.2017.
- 3. Колесникова, Е.А.** Результаты многолетнего мониторинга антибиотикорезистентности генитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // В сборнике: Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной

95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. - 2016. - С. 166 - 173.

**4. Колесникова, Е.А.** Мониторинг антибиотикорезистентности *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*, ассоциированных с заболеваниями урогенитального тракта у женщин Нижнего Новгорода / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина // В сборнике: Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. ФБУН "Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной". - 2014. - С. 208 - 213.

**5. Колесникова, Е.А.** Оценка антибактериальной устойчивости бактерий родов *Ureaplasma* и *Mycoplasma*, ассоциированных с заболеваниями мочеполовой системы, и молекулярно-генетическая характеристика детерминант резистентности / **Е.А. Колесникова** // В сборнике: Современные проблемы эпидемиологии и гигиены материалы VIII всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. - 2016. - С. 106 - 107.

**6.** Prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* from patients with non-gonococcal urethritis and cervicitis in Russia / I.A. Edelstein, A.V. Romanov, M.V. Edelstein, L.M. Zubareva, N.S. Rudneva, I.V. Borisov, **Е.А. Kolesnikova**, L.N. Sukhanova, A.M. Achmedova, R.S. Kozlov // 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 21 - 24 April 2018, Madrid, Spain. Poster # P1863.

**7. Колесникова, Е.А.** Механизмы резистентности к фторхинолонам клинических изолятов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* по результатам полногеномного секвенирования / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, М.А. Махова, А.Е. Алексеева, О.М. Черневская, Н.Н. Барышева, К.А. Орлова // Сб. трудов Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (г. Минск, Беларусь). - 2018. - С. 62 - 63.

**8. Колесникова, Е.А.** Мониторинг фенотипической резистентности урогенитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин г. Нижнего Новгорода / **Е.А. Колесникова** // В книге: Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы Материалы X Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием (г.Москва). - 2018. - С. 107 - 108.

**9. Колесникова, Е.А.** Молекулярно-генетическая характеристика клинических изолятов *Mycoplasma hominis*, устойчивых к ципрофлоксацину / **Е.А. Колесникова**, А.Е. Алексеева, М.А. Махова, Н.Ф. Бруснигина, Е.И. Ефимов // Сб. трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г.Москва). - 2017. - С. 285 - 286.

**10. Колесникова, Е.А.** Распространенность и антибиотикорезистентность генитальных микоплазм у беременных женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом / **Е.А. Колесникова**, Н.Ф. Бруснигина, Е.И.

Ефимов, О.М. Черневская, К.А. Орлова // Материалы XVI Всероссийского научного форума Мать и дитя (г.Москва). - 2015. - С. 115.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП - антибактериальные препараты  
 ABC –ATP-binding cassette superfamily, эффлюксная система  
 ВОЗ - всемирная организация здравоохранения  
 ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза  
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота  
 ГБУЗ НО – Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области  
 КОЕ - колониеобразующая единица  
 МПК - минимальная подавляющая концентрация  
 ПЦР – полимеразная цепная реакция  
 ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени  
 РНК - рибонуклеиновая кислота  
 23S рРНК – большая субъединица рибосомальной рибонуклеиновой кислоты  
 УГТ – урогенитальный тракт  
*ermB* – (erythromycin ribosome methylation) ген, кодирующий фермент метилазу  
 NGS - Next Generations Sequencing, секвенирование нового поколения  
 MATE - Multidrug and toxic compound extrusion family, семейство эффлюксных белков  
 QRDR –Quinolone Resistance-Determining Region - регион, детерминирующий резистентность к фторхинолонам  
 ДОС–доксциклин, GEN–гентамицин, CLM–клиндамицин, OFL–офлоксацин, MED–мидекамицин, JOZ–джозамицин, CIP-ципрофлоксацин

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, сотрудникам лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) Смоленского государственного медицинского университета и ее руководителю - к.б.н. Инне Александровне Эйдельштейн, а также сотрудникам медицинских организаций, принимавшим участие в проведении исследований и внедрении их результатов.

Особую благодарность автор выражает к.м.н., доценту, заведующей лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов Бруснигиной Нине Федоровне за всестороннюю поддержку и ценные советы при выполнении и написании работы.

E-mail автора: [shmelevael@yandex.ru](mailto:shmelevael@yandex.ru)

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул.Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.36 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. E-mail: [ziabramova@mail.ru](mailto:ziabramova@mail.ru).