

На правах рукописи

ЛЕВ АНАСТАСИЯ ИГОРЕВНА

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*:
ВИРУЛЕНТНОСТЬ И УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск - 2018

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Фурсова Надежда Константиновна, кандидат биологических наук, заведующая лабораторией антимикробных препаратов отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора

Официальные оппоненты:

Припутневич Татьяна Валерьевна, доктор медицинских наук, руководитель отдела микробиологии, клинической фармакологии и эпидемиологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава РФ, г. Москва

Николаева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярно-биологических исследований отдела фундаментальных исследований Научно-исследовательского медико-стоматологического института МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится «06» апреля 2018 г. в 11-00 часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «_____» _____ 2018 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук

Коломбет Любовь Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Klebsiella pneumoniae является широко распространенным в природе представителем семейства *Enterobacteriaceae*. Бактерии данного вида встречаются в поверхностных водах, на растениях, в почве, а также колонизируют слизистые оболочки тонкого кишечника, урогенитальный тракт и верхние отделы респираторного тракта млекопитающих, в том числе и человека (Podschun et al., 1998; Li et al., 2014). В Российской Федерации, как и во всем мире, *K. pneumoniae* являются актуальными госпитальными патогенами (Edelstein et al., 2003; Сидоренко и др., 2005; Решедько и др., 2008; Partina et al., 2016) и вызывают широкий спектр патологий у человека: бактериемии, поражения респираторного тракта, инфекции мочевыводящих путей, центральной нервной системы, поражения желудочно-кишечного тракта, глаз, кожные инфекции, первичные абсцессы печени (Pinto-Almeida et al., 2012; Kashani et al., 2013; Hennequin et al., 2016). *K. pneumoniae* входят в группу «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), включающую актуальные антибиотикоустойчивые патогены (Santajit, Indrawattana, 2016).

В настоящее время *K. pneumoniae* представлены двумя дискретными эволюционными ветвями: классическими и гипервирулентными клебсиеллами (Hennequin, Robin 2016). Классические *K. pneumoniae* вызывают заболевания у людей младенческого и пожилого возраста, а также у лиц с ослабленным иммунитетом, часто ассоциированы с внутрибольничными инфекциями и характеризуются широким спектром антибиотикорезистентности (Paczosa et al., 2016). Устойчивость к антибактериальным препаратам обусловлена наличием у бактерий генов β -лактамаз, интегронов и других генетических детерминант (Navon-Venezia et al., 2017). В Российской Федерации описаны множественно устойчивые клинические штаммы клебсиелл, в том числе резистентные к цефалоспорином и карбапенемам, что обусловлено наличием у них β -лактамаз СТХ-М-, ТЕМ-, ОХА-48-, NDM- и КРС-типов (Edelstein et al., 2003; Сидоренко и др., 2005; Фурсова Н.К. и др., 2010; Крыжановская, 2016; Егорова и др., 2016; Дубоделов и др., 2016; Ageevets et al., 2017).

Гипервирулентные *K. pneumoniae* способны, в зависимости от локализации очага инфекции, вызывать тяжелые, с частотой летального исхода 3-55 %, заболевания у людей с нормальным иммунитетом (Lin et al., 2010; Cheng et al., 2012; Shon 2013; Kong et al., 2017). Наиболее характерный синдром, вызываемый такими штаммами, - первичный гнойный абсцесс печени с последующим метастазированием возбудителя из очага инфекции в другие органы и ткани, впервые описанный в Азиатско-Тихоокеанском регионе, а позже – в Северной и Южной Америке, в Карибском бассейне, в Европе, на Ближнем Востоке, в Австралии и Африке (Wang et al., 1998; Fierer et al., 2011; Keynan et al., 2007; Vila et al., 2011; Doud et al., 2009; Sobirk et al., 2010; Epani et al., 2012; Decré et al., 2011). Гипервирулентные *K. pneumoniae* чаще, чем классические штаммы, несут генетические факторы, ассоциированные с гипермукоидным фенотипом (Shon et al., 2013; Kumabe et al., 2014), с молекулярными системами усвоения трехвалентного железа (Nassif et al., 1986; Ma et al., 2005), с системой утилизации аллантаина (Chou et al., 2004), с синтезом гладкого липополисахарида и полисахаридной капсулы (Regué et al., 2004, Izquierdo et al., 2003), а также с наличием фимбрий I типа (Schembri et al., 2005).

Исследователями отмечена корреляция классических и гипервирулентных *K. pneumoniae* с определенными сиквенс-типами и капсульными типами (К-типы). Описаны мультирезистентные классические *K. pneumoniae* сиквенс-типов ST11, ST14, ST15, ST35, ST36, ST147, ST258, ST309 и ST1107 и K1-K78 типов (Paczosa et al., 2016; Zhao et al., 2016) и гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* с сиквенс-типами ST23, ST29, ST65, ST86, ST268, ST375, ST412 и ST420 (Yan et al., 2016; Zhao et al., 2016; Paczosa et al., 2016), и K1, K2, реже - K5, K20, K54 и K57 типами (Shon et al., 2013; Paczosa et al., 2016, Zhao et al., 2016).

Большую роль в распространении генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности у клебсиелл, как и у других бактерий, играют мобильные генетические элементы. Многие детерминанты локализованы на плазмидах разных молекулярных масс и групп несовместимости (Chen et al., 2004). В последние годы появились сообщения о приобретении гипервирулентными *K. pneumoniae* плазмидных эпидемических генов β -лактамаз: в Южной Корее описаны штаммы ST23^{K1} с геном цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} (Su et al., 2008), в Аргентине – штаммы ST23^{K1} с геном карбапенемазы *bla*_{KPC-2} (Cejas et al., 2014), в Китае – штаммы нового ST1797^{K1} с геном *bla*_{KPC-2} (Zhang et al., 2015), во Франции – штаммы ST86^{K2} с геном *bla*_{CTX-M-3} (Surgers et al., 2016). В 2017 г. в Российской Федерации описан случай менингита в неонатальном отделении г. Казани, вызванного гипермукоидным, *tmpA*-положительным штаммом *K. pneumoniae*, продуцирующим неидентифицированную β -лактамазу расширенного спектра (Khaertynov et al., 2017). В 2017 г. в Китае зафиксировано, напротив, приобретение плазмид вирулентности pLVPK-типа мультирезистентными госпитальными штаммами *K. pneumoniae* ST11^{K47} (Gu et al., 2017). Описанные данные подтверждают опасения исследователей о возможном формировании в будущем нового «суперпатогена» – гипервирулентных и одновременно множественно резистентных *K. pneumoniae* (Paczosa et al., 2016).

Степень разработанности темы исследования

Актуальность изучения *K. pneumoniae* заключается в увеличении частоты и степени тяжести клебсиеллезных инфекций, регистрируемых во всем мире, что подчеркивается динамикой роста количества научных публикаций, представленных на web-ресурсе PubMed: в 2000-2010 гг. – по ~500 публикации в год; после 2010 г. - по ~1000 публикаций в год. В международной базе данных MLST института Пастера (г. Париж, Франция) на дату 01.06.2017 г. были размещены 2942 сиквенс-типа и 113 капсульных серотипов *K. pneumoniae* (<http://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Научные работы посвящены широкому кругу проблем: описанию клинических случаев клебсиеллезных инфекций, оценке антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*, распространенности эпидемически успешных клонов, изучению молекулярно-генетических механизмов их антибиотикорезистентности и вирулентности. Установлено, что увеличение уровней резистентности выделяемых по всему миру штаммов связано с появлением и распространением путем горизонтального переноса новых вариантов генетических детерминант резистентности (генов β -лактамаз, интегронов, IS-элементов, плазмид) (Rosenthal et al., 2016; Chen et al., 2014; Khan et al., 2017; Ageevets et al., 2017). Показано, что для проявления вирулентных свойств *K. pneumoniae* важны полисахаридная капсула, фимбрии, способность акцептировать ионы железа и утилизировать аллантин, устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови, ассоциированные с генами *tmpA*, *aer*, *kfu*, *wabG*, *uge*, *fimH* и *all* регулоном (Shon et al., 2013; Kumabe et al., 2014; Chou et al., 2004; Regué et al., 2004; Izquierdo et al., 2003; Schembri et al., 2005). Установлена принадлежность гипервирулентных штаммов

K. pneumoniae к определенным К-типам и сиквенс-типам (Chen et al, 2014; Yan et al., 2016; Zhao et al., 2016). Из разных регионов мира сообщается о появлении клебсиелл, проявляющих одновременно множественную лекарственную устойчивость и высокую вирулентность для людей и лабораторных животных (Cejas et al. 2014; Zhang et al. 2015; Surgers et al. 2016; Su et al. 2008; Khaertynov, 2017).

Не смотря на многостороннее изучение данного возбудителя в мире, в Российской Федерации мало представлена информация о распространении гипервирулентных клебсиелл, наличии у клинических штаммов генетических детерминант вирулентности, их принадлежности к сиквенс-типам и капсульным типам. Поэтому оценка потенциала вирулентности и устойчивости к антибактериальным препаратам у генетических линий клебсиелл, выделяемых в госпитальной и внегоспитальной среде Российской Федерации является актуальной задачей как с точки зрения фундаментальной микробиологии, так и с точки зрения практических задач здравоохранения.

Цель исследования:

Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012-2016 гг., изучение их фенотипических свойств, детекция генетических детерминант вирулентности и резистентности к антибактериальным препаратам; определение принадлежности штаммов к генетическим линиям (сиквенс-типам, клональным комплексам) и капсульным типам.

Задачи исследования:

1. Создание коллекции клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012-2016 гг., электронного каталога и базы данных.
2. Фенотипическая характеристика клебсиелл, представленных в коллекции: культурально-морфологические свойства, гипермукоидность, чувствительность к антибактериальным препаратам разных функциональных классов.
3. Детекция генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности клебсиелл, определение капсульных типов штаммов с помощью полимеразной цепной реакции. Создание набора референс-штаммов.
4. Генетическое типирование штаммов *K. pneumoniae* методами случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК (RAPD) и мультилокусного секвенирования-типирования (MLST), определение принадлежности штаммов к клональным комплексам.
5. Оценка вирулентности отобранных штаммов коллекции *K. pneumoniae* с разными фенотипическими и генетическими характеристиками на модели клебсиеллезной инфекции у белых аутбредных мышей.
6. Полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ геномов штаммов *K. pneumoniae*, принадлежащих к разным генетическим линиям.

Научная новизна исследования

Выявлена высокая гетерогенность штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012-2016 гг.: идентифицированы 14 сиквенс-типов, в том числе 3 новых, ранее не описанных (ST1544, ST2280 и ST2174).

K. pneumoniae в условиях одного из нейрореанимационных отделений г. Москвы в 2013-2015 гг., с большой вероятностью, являлись источником распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48} и *bla*_{OXA-244} среди других энтеробактерий - *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp. и *Serratia marcescens*.

Впервые в отделении нейрореанимации г. Москвы выделены штаммы *K. pneumoniae* сиквенс-типа 147, несущие ген эпидемически значимой металло- β -лактамазы NDM-1.

Впервые описаны события интеграции *IS1R*- и *IS10R*-элементов в позициях 86 п.н. и 41 п.н. последовательностей генов мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36*, приводящие к утрате продукции белка *OmpK36* и уменьшению чувствительности штаммов к имипенему.

Выявлен молекулярный механизм «дефектного» негипермукоидного фенотипа у *rmpA*-позитивного авирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* КРВ584, который заключается в наличии неописанной ранее точечной делеции в гене регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA*.

Впервые в штаммах *K. pneumoniae* гипервирулентного сиквенс-типа ST23 с капсульным типом K1 детектировано наличие одновременно двух генов эпидемических β -лактамаз: цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} и карбапенемазы *bla*_{OXA-48}.

Выявлен неидентифицированный профаг в хромосоме мультирезистентного NDM-1-продуцирующего штамма *K. pneumoniae* КРВ1470/16 сиквенс-типа 147.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Созданы коллекция современных клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012-2016 гг. (n=406), электронный каталог и база данных «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности» (ФИПС №2017621413), которые могут быть использованы для анализа фенотипических и генетических характеристик штаммов, выделяемых на территории Российской Федерации. – Федеральный уровень внедрения.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 45 референс-штаммов *K. pneumoniae* (Справки о депонировании 2013-2017 гг.). – Федеральный уровень внедрения.

В отделении нейрореанимации ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ используются сведения о молекулярно-генетических особенностях штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в данном отделении, для оценки существующей эпидемиологической ситуации, прогнозирования ее развития и выбора оптимальных мер по контролю клебсиеллезных инфекций (Акт внедрения ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ от 22.11.2017 г.). – Межведомственный уровень внедрения.

В базу данных GenBank размещены 497 нуклеотидных последовательности генов штаммов коллекции и полные геномы пяти штаммов *K. pneumoniae*. В базу данных MLST института Пастера, г. Париж (<http://bigsd.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) размещена информация о 45 изолятах *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации, принадлежащих к 14 сиквенс-типам. – Международный уровень внедрения.

Разработаны Методические рекомендации «Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) штаммов *Klebsiella pneumoniae*» (Одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 27.10.2015 г., протокол №10), и Методические рекомендации «Генотипирование штаммов *Klebsiella pneumoniae* на основе детекции генов антибиотикорезистентности и вирулентности» (Одобрены Ученым советом ФБУН ГНЦ ПМБ 29.11.2016 г., протокол №9). – Учрежденческий уровень внедрения.

Материалы диссертации использованы в учебной программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка № 73 от 26 октября 2017 г.).

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы заключалась в комплексном подходе к изучению современных клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации: их фенотипических и генетических особенностей, связанных с проявлением вирулентности и лекарственной устойчивости. В работе использованы микробиологические, биохимические, биофизические, молекулярно-генетические, биологические, биоинформационные и статистические методы исследований.

Штаммы бактерий. Рабочая коллекция включала в себя штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от пациентов НИИ нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко в 2012-2016 гг. (n=278), от пациентов Инфекционной больницы №1 г. Москвы в 2013-2015 гг. (n=56), штаммы из лабораторной коллекции отдела молекулярной микробиологии, выделенные в ожоговом центре г. Челябинска в 2007-2012 гг. (n=14), а также штаммы из других источников (n=10).

Микробиологические методы. Культивирование бактерий проводили на плотных и в жидких питательных средах, хранение – в 15 % глицерине при температуре минус 70 °С. Видовую идентификацию осуществляли с использованием приборов VITEK-2 Compact (BioMérieux, Франция) и MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

Чувствительность бактерий к АБП определяли с помощью прибора VITEK-2 Compact, методом микроразведений в бульоне и диско-диффузионным методом с использованием коммерческих дисков (Oxoid, Великобритания) согласно методическим указаниям МУК 4.2. 1890-04. Интерпретацию результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/). Гипермукоидность культур *K. pneumoniae* определяли с помощью стринг-теста (Shon et al., 2013).

Биологические методы. Вирулентность штаммов *K. pneumoniae* для животных оценивали на модели внутрибрюшинного заражения белых аутбредных мышей, показатель LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева.

Молекулярно-генетические методы. Наличие в геномах штаммов генетических детерминант устойчивости к АБП, генов, ассоциированных с вирулентностью и капсульными типами, а также детекцию репликонов плазмид основных групп несовместимости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* определяли методом ПЦР со специфичными праймерами. Изготовление олигонуклеотидов и секвенирование последовательностей ДНК по методу Сенгера осуществляли в ООО «Синтол» (Москва, Россия). Полногеномное секвенирование *K. pneumoniae* проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, США).

Генотипирование штаммов *K. pneumoniae* проводили методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК (RAPD) с праймерами OPA-11 и Wil 2 по методу Zimmer et al., а также с помощью мультилокусного секвенирования-типирования по схеме MLST PASTEUR (Diancourt et al., 2005). Клональные комплексы штаммов *K. pneumoniae* определяли с помощью сервиса eBURST V3 (<http://eburst.mlst.net/>).

Конъюгативный перенос плазмид осуществляли по ранее описанному методу (Фурсова и др., 2010). Селективный отбор трансконъюгантов проводили на плотной питательной среде с рифампицином (200 мг/л) и цефотаксимом (10 мг/л). Криотрансформацию штаммов *K. pneumoniae* KPM9 и *E. coli* DH5α проводили методом Merrick et al. с модификациями (Merrick et al., 1987).

Биохимические методы. Выделение липополисахаридов *K. pneumoniae* проводили по модифицированной методике Hitchcock et al. (Hitchcock et al., 1983), выделение пориновых белков – по методу Carlone et al. (Carlone et al., 1986).

Выделение ДНК для полногеномного секвенирования осуществляли ЦТАБ-методом (Thomas et al., 1997). Для выделения тотальной РНК бактерий и обратной транскрипции использовали коммерческие наборы «РНК-Экстран» и «ОТ-1» (Синтол, Россия). Плазмидную ДНК бактерий выделяли коммерческим набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Биоинформационные методы. Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программ Chromas 2.6.2. (Technelysium Pty Ltd, Австралия) и Vector NTI9 (Invitrogen, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и идентификацию изучаемых генов осуществляли с помощью веб-ресурса BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Единичные прочтения полногеномных секвенирований собирали в контиги с использованием программного обеспечения SPAdes 3.9.0. (Bankevich et al., 2012). Аннотацию геномов проводили с помощью сервера NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (Angiuoli et al., 2008). В работе использовали инструменты Центра геномной эпидемиологии (<http://www.genomicpidemiology.org/>) - ResFinder 2.1 (Zankari et al., 2012) и PlasmidFinder 1.3 (Carattoli et al., 2014). Филогенетический анализ штаммов *K. pneumoniae* проводили с использованием Wombac (<https://github.com/tseemann/wombac>). Для визуализации использовали SplitsTree 4 (Huson et al., 2006). Сравнение геномов проводили с помощью Mauve (Darling et al., 2010). Нуклеотидную последовательность профага аннотировали с помощью веб-сервиса Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) (Aziz et al., 2008).

Положения, выносимые на защиту

K. pneumoniae, выделенные в Российской Федерации в 2012-2016 гг., характеризовались множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам, наличием большого числа генетических детерминант антибиотикорезистентности и гетерогенностью генотипов. Впервые в обследуемых лечебных учреждениях зафиксировано появление *K. pneumoniae*, несущих ген *bla*_{NDM-1}.

K. pneumoniae являлись источником распространения генов карбапенемаз *bla*_{ОХА-48-like} среди энтеробактерий в отделении нейрореанимации г. Москвы.

Клинические штаммы *K. pneumoniae* проявляли разную степень вирулентности на модели клебсиеллезной инфекции у аутбредных мышей. С проявлением вирулентности для мышей наиболее ассоциированы генотипы ST23^{K1}, ST65^{K2}, ST86^{K2}, ST218^{K1/57}, ST2280^{K2}.

В Российской Федерации на основе *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 и капсульного K1 формируются варианты патогена, характеризующиеся одновременно множественной антибиотикорезистентностью и вирулентностью, в том числе - несущие гены двух эпидемических β -лактамаз *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{ОХА-48} одновременно.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках НИР 039 и НИР 049 Роспотребнадзора, а также проекта РФФ №15-15-00058.

Достоверность результатов обеспечивается проведением исследовательских работ современными методами в соответствии с международными рекомендациями.

Результаты диссертационной работы были представлены, доложены и обсуждены на 14 Всероссийских и международных конференциях: XVI Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 21-23 мая 2014 г.); III Санкт-петербургский международный экологический форум «Окружающая среда и

здоровье человека: фундаментальные, клинические и экологические аспекты современной микробиологии» (Санкт Петербург, 21-24 сентября 2014 г.); VI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 22-24 октября 2014 г.); VII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням (Москва, 30 марта - 1 апреля 2015 г.); 25-ый Европейский конгресс Клинической микробиологии и Инфекционных болезней (Дания, Копенгаген, 25-28 апреля 2015 г.); XVII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 20-22 мая 2015 г.); X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 27-30 октября 2015 г.); XVIII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии (Москва, 25-27 мая 2016 г.); ASM MICROBE (Бостон, США, 16-20 июня 2016 г.); VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 1-3 ноября 2016 г.); V съезд биохимиков России (Сочи, 4-8 октября 2016 г.); VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 1-3 ноября 2016 г.); Российско-Китайский Конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 14-16 июня 2017 г.); 1-ый Российский Микробиологический Конгресс (Пушино, 17-18 октября 2017 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании экспериментов, в выполнении микробиологических, молекулярно-генетических, биохимических, биологических экспериментов, анализе полученных результатов, в подготовке публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.б.н. Фурсовой Н.К., к.м.н. Асташкиным Е.И., к.б.н. Воложанцевым Н.В., м.н.с. Соловьевой Е.В., к.м.н. Борзиловым А.И., к.б.н. Кисличкиной А.А., к.б.н. Платоновым М.Е. и к.б.н. Шайхутдиновой Р.З.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 26 научных работ, в том числе 6 статей в международных реферируемых научных журналах и 20 тезисов в материалах международных и Всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

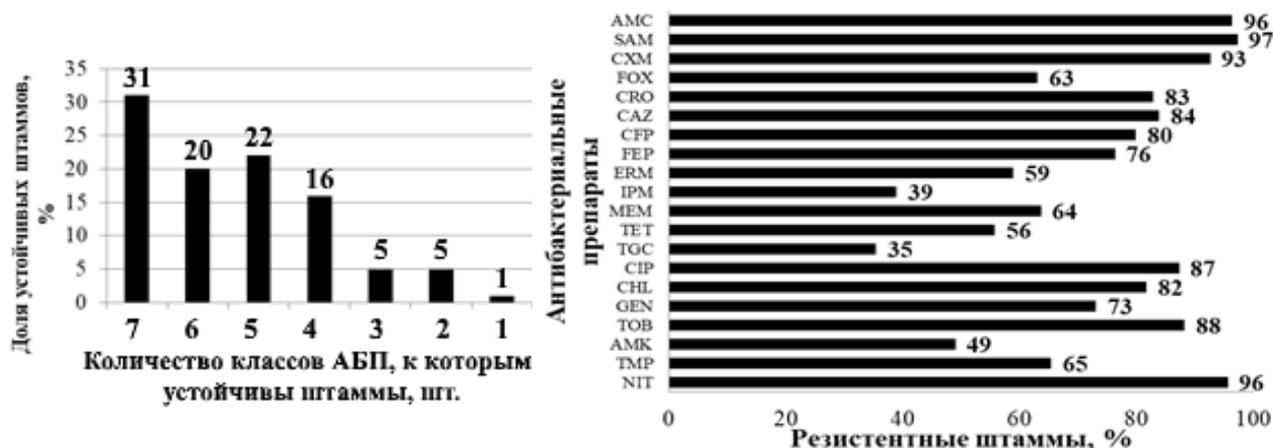
Диссертация изложена на 182 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Результаты и обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературных источников, включающего 33 работы отечественных и 168 работ зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 53 рисунками и 20 таблицами и включает 3 Приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Фенотипы и генотипы антибиотикорезистентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae*

В 2012-2016 гг. *K. pneumoniae* являлась доминирующим патогеном в этиологической структуре госпитальных инфекций среди грамотрицательных бактерий. Среди возбудителей инфекций кровотока *K. pneumoniae* составила ~27 %, мочевыделительной системы - ~26 %, инфекций центральной нервной системы - ~20 %, инфекций дыхательной системы - ~19 %. Штаммы коллекции (n=350) были выделены из дыхательной системы (50 %), мочи (32 %), ликвора (4 %), хирургических ран (4 %), крови

(2 %) и кишечника (1 %) 244 пациентов лечебных учреждений РФ, а также из других источников (7 %). При этом 94 % штаммов были резистентными к трем и более функциональным классам антибактериальных препаратов (АБП), а более 30 % – к семи классам АБП, т.е. были экстремально резистентными (рис. 1).



AMC, амоксициллин/клавулановая кислота; SAM, амоксициллин-сульбактам; CXM, цефуроксим; FOX, цефокситин; CRO, цефтриаксон; CAZ, цефтазидим; CFP, цефоперазон-сульбактам; FEP, цефепим; ERM, эртапенем; IPM, имипенем; MEM, меропенем; TGC, тигециклин; CIP, ципрофлоксацин; TET, тетрациклин; CHL, хлорамфеникол; GEN, гентамицин; TOB, тобрамицин; AMK, амикацин; TMP, триметоприм; NIT, нитрофурантоин

Рисунок 1 – Устойчивость штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам

Доля устойчивых штаммов к карбапенемам (64 %) в изучаемой коллекции существенно выше, чем описанная в Новосибирске в 2008 г., в Иркутске в 2010 г. и в Ростове-на-Дону в 2015 г. (от 0 % до 23 %) (Ильина, 2012; Коган, 2010; Покудина, 2016).

В геномах штаммов *K. pneumoniae* были выявлены гены β -лактамаз (БЛ) bla_{TEM} (53 %), bla_{SHV} (93 %), bla_{CTX-M} (77 %), $bla_{OXA-48-like}$ (41 %) и bla_{NDM} (3 %). Ни в одном из тестируемых штаммов не были обнаружены гены bla_{KPC} , bla_{VIM} и bla_{IMP} . Идентифицировали следующие аллели генов БЛ: bla_{TEM-1} , bla_{SHV-11} , bla_{SHV-83} , $bla_{SHV-110}$, $bla_{SHV-190}$, $bla_{CTX-M-3}$, $bla_{CTX-M-15}$, $bla_{CTX-M-55}$, bla_{OXA-48} , $bla_{OXA-244}$ и bla_{NDM-1} . Преобладали аллели bla_{SHV-11} (64 %), $bla_{CTX-M-15}$ (91 %) и bla_{OXA-48} (79 %). У 33 % штаммов были обнаружены интегроны класса 1. В 56 % интегронов были идентифицированы вставки шести типов: (*dfrA1-orfC*), (*dfrA15-aadA1*), (*dfrA17-aadA5*), (*aadB-aadA1*), (*dfrA12-orfF-aadA2*) и (*dfrA12-orfF-ant3*), в состав которых входят генные кассеты резистентности к аминогликозидам (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadB* и *ant3*), сульфаниламидам (*dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA15* и *dfrA17*) и кассеты с неидентифицированными функциями (*orfC* и *orfF*). Интегроны класса 2 обнаружены не были. Кроме того, у 97 % штаммов *K. pneumoniae* был детектирован ген поринового белка *ompK36*.

У штаммов коллекции *K. pneumoniae* идентифицирован 31 вариант сочетания генов устойчивости к АБП (R-генотип), наиболее распространенными из которых были варианты с комбинациями трех (41 %) и четырех генов БЛ (21 %) (таб. 1). Определение R-генотипов может служить инструментом внутривидового типирования клинических изолятов и эпидемически значимых штаммов *K. pneumoniae*.

В Японии, Китае и Южной Африке, согласно литературным данным, распространены клинические клебсиеллы, с генотипами R3a, R2a, R2b, R2d, R1a и R1b по нашей номенклатуре, а также описаны варианты, не представленные в нашей коллекции – несущие два гена БЛ ($bla_{OXA-48}+bla_{NDM}$) и один ген БЛ (bla_{TEM}) (Vasaikar et al., 2017; Xiao et al., 2017; Harada et al., 2013; Xie et al., 2017).

Таблица 1 – Генотипы резистентности штаммов *K. pneumoniae*

*R- генотип	Гены бета-лактамаз	Интегроны класса 1	Ген OmpK36	Кол-во штаммов (n=350)
R5-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}+bla_{NDM}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	1
R4a-00	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	-	-	1
R4a-01	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	-	<i>ompK36</i>	34
R4a-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	32
R4b-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{NDM}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	7
R4b-01	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}+bla_{NDM}</i>	-	<i>ompK36</i>	1
R3a-01	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}</i>	-	<i>ompK36</i>	41
R3a-10	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}</i>	<i>int1</i>	-	1
R3a-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	50
R3b-01	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{OXA-48}</i>	-	<i>ompK36</i>	5
R3b-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{OXA-48}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	1
R3c-01	<i>bla_{SHV}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	-	<i>ompK36</i>	33
R3c-11	<i>bla_{SHV}+bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	11
R2a-01	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}</i>	-	<i>ompK36</i>	6
R2a-11	<i>bla_{SHV}+bla_{TEM}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	2
R2b-01	<i>bla_{SHV}+bla_{CTX-M}</i>	-	<i>ompK36</i>	27
R2b-11	<i>bla_{SHV}+bla_{CTX-M}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	15
R2c-01	<i>bla_{SHV}+bla_{OXA-48}</i>	-	<i>ompK36</i>	19
R2c-11	<i>bla_{SHV}+bla_{OXA-48}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	1
R2d-00	<i>bla_{TEM}+bla_{CTX-M}</i>	-	-	1
R2d-01	<i>bla_{TEM}+bla_{CTX-M}</i>	-	<i>ompK36</i>	2
R2e-01	<i>bla_{CTX-M}+bla_{OXA-48}</i>	-	<i>ompK36</i>	1
R1a-00	<i>bla_{SHV}</i>	-	-	1
R1a-01	<i>bla_{SHV}</i>	-	<i>ompK36</i>	32
R1a-11	<i>bla_{SHV}</i>	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	2
R1b-00	<i>bla_{CTX-M}</i>	-	-	2
R1b-01	<i>bla_{CTX-M}</i>	-	<i>ompK36</i>	6
R0-00	-	-	-	7
R0-01	-	-	<i>ompK36</i>	5
R0-10	-	<i>int1</i>	-	1
R0-11	-	<i>int1</i>	<i>ompK36</i>	2

Примечание: *цифра – количество генов БЛ, строчная латинская буква - варианты их сочетания; единица – наличие интегрона класса 1 и гена поринового белка OmpK36, нуль - их отсутствие

Влияние встраивания *IS*-элементов в ген порина *ompK36* на чувствительность к антибактериальным препаратам у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*

У пяти штаммов клебсиелл, выделенных от разных пациентов нейрореанимационного отделения, было выявлено встраивание *IS*-элементов в ген мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36*: *IS1* - в четырех штаммах, а *IS10* - в одном штамме.

У штамма КРВ367К/15, выделенного в марте 2015 г., была детектирована вставка *IS1R*-элемента (семейство *IS1*) (GenBank KX347524) в ранее не описанное положение - после 86 нуклеотида (рис. 2). Его структура идентична ранее описанному *IS1R*-элементу (GenBank J01730). Встраивание *IS1*-элемента в штаммах *K. pneumoniae* КРВ114/16, КРВ1237/16 и КРВ2088/16 произошло близко к месту посадки праймера OmpK36-F, из-за чего точное определение сайта встраивания *IS*-элемента данным методом секвенирования оказалось невозможным.

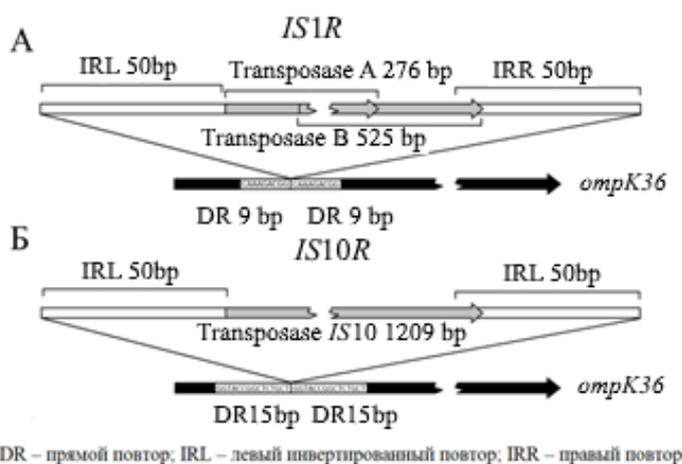
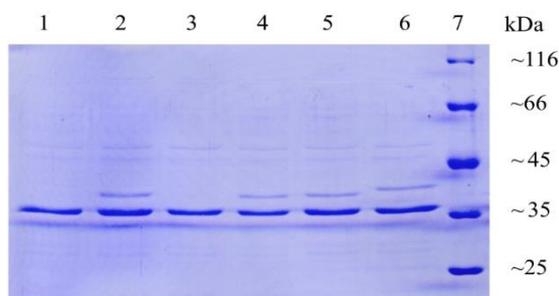


Рисунок 2 – Схема гена поринового белка *ompK36* со вставкой *IS1R*-элемента штамма *K. pneumoniae* КРВ367К/15 (А) и *ompK36* со вставкой *IS10R*-элемента штамма *K. pneumoniae* КРВ2304К/15



Штаммы *K. pneumoniae*: 1 - КРВ367К/15; 2 - КРВ542/15; 3 - КРВ367К/15pACYC-gfp; 4-6 - КРВ367К/15pACYCg-ompK36 (клоны 1, 2 и 3); 7 - маркер молекулярной массы белков 14,4-116 кДа (Fermentas, Литва)

Рисунок 3 - Электрофореграмма белков наружных мембран штаммов *K. pneumoniae* в 11 %-ном полиакриламидном геле

штаммами, у которых продукция данного белка отсутствовала (КРВ2304/15 и КРВ367К/15). В изогенных вариантах штамма КРВ367К/15, отличающихся наличием или отсутствием продукции белка OmpK36, МПК имипенема составляли <1 мг/л и 2 мг/л, соответственно.

С помощью ОТ-ПЦР выявлены различия в уровне экспрессии генов БЛ у изучаемых штаммов: OmpK36-продуцирующий штамм *K. pneumoniae* КРВ542/15 экспресировал гены двух представленных в геноме БЛ (*bla_{SHV}* и *bla_{CTX-M}*), в то время как OmpK36-негативные штаммы *K. pneumoniae* КРВ367К/15 (*bla_{SHV}* и *bla_{CTX-M}*) и КРВ2304К/15 (*bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* и *bla_{TEM}*) проявляли слабый уровень экспрессии генов всех БЛ. У штамма-трансформанта КРВ367К/15 с «восстановленной» продукцией OmpK36 был значительно повышен уровень экспрессии гена *bla_{CTX-M}*, по сравнению с исходным штаммом. Эти данные подтверждают роль белка клебсиелл OmpK36 в проявлении фенотипа антибиотикорезистентности и регуляторную роль IS-элементов.

Оценка роли *K. pneumoniae* как источника распространения генов карбапенемаз *bla_{OXA-48-like}* среди штаммов энтеробактерий в госпитальной среде

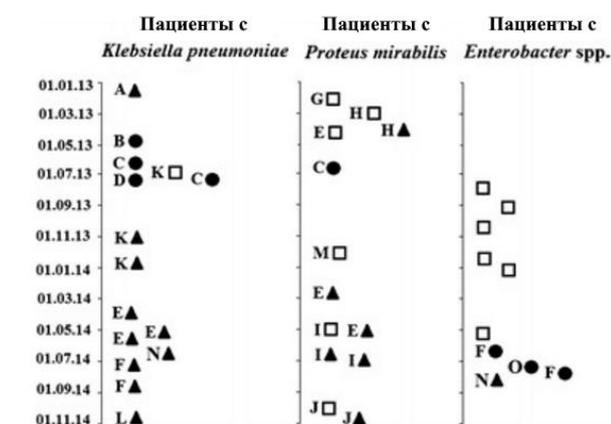
Анализ распространения генов карбапенемаз *bla_{OXA-48-like}* среди энтеробактерий в нейрореанимационном отделении позволил высказать гипотезу о том, что источни-

У штамма КРВ2304К/15, выделенного в декабре 2015 г., была детектирована вставка *IS10R*-элемента (*IS10*-группа семейства *IS4*), в положении 41 п.н. (GenBank KX232456) (рис. 2), идентичного ранее описанному у *Salmonella typhimurium* элементу (GenBank J01829). Это первый случай обнаружения *IS4* семейства и *IS10* группы в гене *ompK36* *K. pneumoniae*. Все штаммы клебсиелл, имеющие вставку IS-элементов в ген *ompK36*, не продуцировали белок OmpK36, что было выявлено с помощью электрофоретического анализа мембранных белков.

Для исследования вклада белков OmpK36 на чувствительность к АБП *K. pneumoniae* и их влияние на экспрессию генов БЛ провели трансформацию штамма КРВ367К/15 сконструированным вектором pACYCg-ompK36 с нативным геном *ompK36*. Несущие данную плазмиду клетки штамма КРВ367К/15 приобретали возможность продуцировать белок OmpK36 (рис. 3).

Показано, что штаммы, продуцирующие белок OmpK36 (штамм-донор нативного гена КРВ542/15 и трансформанты КРВ367К/15) более чувствительны к имипенему по сравнению со

ком данных генов являются *K. pneumoniae*. С января 2013 г. по октябрь 2014 г. от пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, было выделено 146 изолятов энтеробактерий: *K. pneumoniae* (n=95), *P. mirabilis* (n=32), *Enterobacter aerogenes* (n=6), *Enterobacter cloacae* (n=4), *Serratia marcescens* (n=3) *Morganella morganii* (n=2). Гены карбапенемаз $bla_{OXA-48-like}$ были обнаружены у 55 % изолятов *K. pneumoniae*, 23 % изолятов *P. mirabilis* и у 20 % изолятов *Enterobacter* spp.



Квадрат – отсутствие генов $bla_{OXA-48-like}$, закрашенный треугольник – наличие гена $bla_{OXA-48-like}$, закрашенный круг – наличие гена $bla_{OXA-244}$; пациенты: А, В, С, D, Е, F, G, H, I, J, K, L, M, N и O

Рисунок 4 - Случаи выделения клинических изолятов *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* и *Enterobacter* spp., несущих гены $bla_{OXA-48-like}$ в период с 01.01.2013 по 01.11.2014 гг.

Первый случай обнаружения гена $bla_{OXA-244}$ в изоляте *E. aerogenes* B2012/14 (GenBank KP205557) был отмечен у пациента F через 18 месяцев после начала исследования. Первый случай детекции гена bla_{OXA-48} в изоляте *E. cloacae* (GenBank KP056311) – у пациента O после 20 месяцев с начала исследования (рис. 4).

Первый случай обнаружения гена $bla_{OXA-244}$ в изоляте *E. aerogenes* B2012/14 (GenBank KP205557) был отмечен у пациента F через 18 месяцев после начала исследования. Первый случай детекции гена bla_{OXA-48} в изоляте *E. cloacae* (GenBank KP056311) – у пациента O после 20 месяцев с начала исследования (рис. 4).

Дополнительным доказательством гипотезы о том, что клебсиеллы являются источником распространения генов $bla_{OXA-48-like}$, является одновременное выделение $bla_{OXA-244}$ -позитивных *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* из мочи пациента С, а также bla_{OXA-48} -позитивных *K. pneumoniae* и *E. cloacae* – из эндотрахеального аспирата и мочи пациента N. Распространение генов $bla_{OXA-48-like}$ среди энтеробактерий продолжилось в 2015 г.: в сентябре из ликвора и эндотрахеального аспирата от двух пациентов были выделены две культуры *Serratia marcescens*, несущие ген bla_{OXA-48} (GenBank KU821689, KU821690).

Широкое распространение генов $bla_{OXA-48-like}$ связано с их локализацией на конъюгативных плазидах группы несовместимости IncL/M, что было показано с помощью внутри- и межвидового конъюгативного переноса этих генов в штаммы *K. pneumoniae* KPM9 Rif^R и *E. coli* HB101 Rif^R.

Первый случай приобретения гена bla_{OXA-48} бактериями *K. pneumoniae* был отмечен у пациента K: выделенный 21.05.13 г. изолят *K. pneumoniae* RAPD-генотипа K29 не содержал ген bla_{OXA-48} , но выделенные от этого же пациента 31.10.13 г. и 12.12.13 г. следующие два изолята K29-генотипа уже несли ген bla_{OXA-48} (GenBank KP739836, KP739837) (рис. 4).

Первый случай приобретения гена bla_{OXA-48} изолятом *P. mirabilis* был отмечен через 4 месяца после начала исследования, в то время как изоляты *K. pneumoniae*, несущие гены $bla_{OXA-48-like}$ детектировались в течение всего двухлетнего периода исследования.

У пациента H 27.02.13 г. был выделен изолят *P. mirabilis* RAPD-генотипа P1₁, не содержащий ген bla_{OXA-48} , а 08.04.2013 г. от этого же пациента выделен изолят с тем же

Выявление штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген карбапенемазы bla_{NDM-1}

С 2012 г. до 2016 г. в исследуемых нами лечебных учреждениях г. Москвы грамотрицательные бактерии, несущие ген bla_{NDM-1} , выявлены не были, но с марта по декабрь 2016 г. из эндотрахеального аспирата и мочи шести пациентов отделения нейрореанимации были выделены девять bla_{NDM-1} -позитивных *K. pneumoniae*.

Анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов первых двух NDM-1-продуцирующих штаммов КРВ417/16 (GenBank NPJW00000000.1) и КРВ1470/16 (GenBank NPII00000000.1), выделенных в марте и сентябре 2016 г., соответственно, показал их сходство на 99,99 %, а также выявил наличие дополнительных, помимо детектированных методом ПЦР, генов антибиотикорезистентности и репликоны плазмид (табл. 2).

Таблица 2 – Гены антибиотикорезистентности и группы несовместимости плазмид в геномах штаммов *K. pneumoniae* КРВ417/16 и КРВ1470/16

Штамм, (дата выделения)	Функциональные классы АБП и гены антибиотикорезистентности								
	BLA		АМК	QNL	PHO	SUL	THR	MCL	PHL
КРВ417/16 (28.03.16)	bla_{SHV-11} bla_{TEM-1} bla_{OXA-1} bla_{OXA-48}	$bla_{CTX-M-15}$ bla_{NDM-1} bla_{OXA-9}	$aadA1$ $aadA2$ $armA$ $aph(3')-VIa$ $aac(6')Ib-cr$	$oqxAB$	$fosA$	$sul1$	$dfrA12$	$msrE$ $mphE$	$catB4$
КРВ1470/16 (05.09.16)	bla_{SHV-11} bla_{TEM-1} bla_{OXA-1}	$bla_{CTX-M-15}$ bla_{NDM-1} bla_{OXA-9}	$aadA1$ $aadA2$ $armA$ $strAB$ $aph(3')-VIa$ $aac(6')Ib-cr$ $aac(3)-IIa$	$oqxAB$ $qnrS1$	$fosA$	$sul1$ $sul2$	$dfrA12$	$msrE$ $mphE$	$catA2$ $catB4$
Группы несовместимости плазмид, представленные в геномах штаммов <i>K. pneumoniae</i>									
КРВ417/16	IncHI1B, FIA, IncFIB, IncFII, IncL/M								
КРВ1470/16	IncHI1B, FIA, IncFIB, IncFII								

Примечание: BLA – β -лактамы, АМК – аминогликозиды, QNL – хинолоны, PHO – фосфомицины, SUL – сульфаниламиды, THR – триметоприм, MCL – макролиды, PHL – фениколы; полужирным начертанием выделены генетические детерминанты, присутствующие в геноме только одного из сравниваемых штаммов

Оба штамма характеризовались ST147 и капсульным типом K64. Помимо различий в наборах плазмидных детерминант антибиотикорезистентности, в хромосоме штамма КРВ1470/16 выявили профаг размером ~45 т.п.н., отсутствующий в геноме штамма КРВ417/16. Профаг характеризовался GC составом 53,0 %, в отличие от 57,0 % генома штамма КРВ1470/16, включал в себя 73 кодирующих последовательности и, помимо фаговых белков, содержал три гена бактериальных мембранных белков: двух генов трансмембранного метил-акцепторного белка хемотаксиса и мембранного пенициллин-связывающего белка карбоксипептидазы.

Ретроспективный эпидемиологический анализ не позволил определить, имели ли данные штаммы общее происхождение или были «занесены» в отделение нейрореанимации независимо в марте и в сентябре 2016 г.

Сиквенс-типы и клональные комплексы *K. pneumoniae*

Для 45 штаммов *K. pneumoniae* изучаемой коллекции определены 14 сиквенс-типов (ST): ST5 (n=1), ST11 (n=1), ST20 (n=1), ST23 (n=12), ST48 (n=3), ST65 (n=1), ST86 (n=4), ST147 (n=8), ST218 (n=7), ST395 (n=3), ST833 (n=1), в том числе три ранее не описанных: ST1544 (n=1), ST2174 (n=1) и ST2280 (n=1), при этом у ST2174 описан

новый вариант гена *gapA125*. У штамма КРВ54/14 сиквенс-тип не определен (NI) в связи с отсутствием наработки ампликона гена «домашнего хозяйства» *groB* стандартными праймерами (таб. 3). Среди описанных сиквенс-типов *K. pneumoniae* выявлены три клональных комплекса (CC): CC11 (ST11 и ST833), CC23 (ST23 и ST218) и CC65 (ST65 и ST2280), характерные для классических МЛЮ (CC11) и гипервирулентных (CC23 и CC65) *K. pneumoniae* (Paczosa et al., 2016; Zhao et al., 2016). Остальные 8 сиквенс-типов отнесены к клональным комплексам, представленным в базе данных MLST PASTEUR: CC14 (ST2174), CC15 (NI), CC20 (ST20), CC48 (ST48), CC86 (ST86), CC147 (ST147), CC395 (ST395). Для ST1544 не обнаружено родственных сиквенс-типов на основании совпадения 6 аллелей генов «домашнего хозяйства».

Вирулентность *K. pneumoniae*

Пациенты, от которых выделены изоляты *K. pneumoniae*, имели диагнозы, включающие разные типы инфекций: вентилятор-ассоциированная пневмония, в том числе с абсцессами в легких; фолликулярная ангина с абсцессом; острый бронхит; перитонит; инфекции мочевыводящих путей с умеренной и выраженной лейкоцитурией; менингит; менингоэнцефалит с абсцессами головного мозга; пансинусит и сепсис.

По степени вирулентности для белых аутбредных мышей были выделены три группы штаммов: высоковирулентные с $LD_{50} < 500$ КОЕ (n=12), средневирулентные с $LD_{50} = 10^3 - 10^4$ КОЕ (n=7) и авирулентные штаммы с $LD_{50} > 10^4$ КОЕ (n=19) (табл. 3).

Гипермукоидными (ГМ) (рис. 5) были все высоковирулентные и средневирулентные для мышей *K. pneumoniae*. Они характеризовались следующими сиквенс-типами и капсульными типами: ST23^{K1}, ST65^{K2}, ST86^{K2}, ST218^{K57}, ST1544^{K20}, ST2174^{K2} и ST2280^{K2}; а авирулентные – ST20^{K28}, ST23^{K57}, ST48^{K62}, ST147^{wzi420}, ST147^{K14/64}, ST833^{K27} и неидентифицированным сиквенс-типом и K60 капсульным типом (табл. 3).

В коллекции *K. pneumoniae* были выявлены 33 (9,4 %) ГМ штамма. Они были выделены в 2013 г. (n=12), 2014 г. (n=13), 2015 г. (n=3) и 2016 г. (n=5) из органов дыхательной системы (n=18) и мочи пациентов (n=8), а также из крови (n=2), хирургических ран (n=2), ликвора (n=1) и других источников (n=2). У трех пациентов были отмечены фолликулярная ангина с абсцессом, пневмония и инфекция мочевыводящей системы с умеренной лейкоцитурией, четыре пациента умерли.

Гены и генотипы вирулентности штаммов *K. pneumoniae*

Отмечено различие в наборах генов вирулентности между (i) высоковирулентными, средневирулентными и (ii) авирулентными для мышей штаммами (рис. 6). Так, у вирулентных для животных штаммов чаще присутствовали гены аэробактеринов (*aer*), ген регулятора гипермукоидного фенотипа (*rmpA*), ген системы утилизации трехвалентного железа (*kfu*) и ген уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпиразы (*uge*). Все высоковирулентные для мышей штаммы несли гены *rmpA*, *aer*, *uge*, а также ген глюкозилтрансферазы *wabG* и ген белка фимбрий I типа *fimH*. Ген внутреннего региона аллантаинового регулона *allR* был детектирован только у вирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* генотипа ST23^{K1} (рис. 6).

У штаммов коллекции (n=151) выявлены 14 вариантов сочетаний генов вирулентности (Vir-генотипов) (табл.4). Все вирулентные для мышей штаммы несли 5-7 генов вирулентности, а авирулентные – до 4 генов. Исключением были два авирулентных штамма *K. pneumoniae* с 5 генами вирулентности - КР1112 и КРВ584 (таб.3).

Таблица 3 - Характеристика высоковирулентных, средневирулентных и авирулентных для мышей штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Штамм	Дата выделения	Источник выделения	Стринг-тест	К-серотип	ST	Кол-во классов АБП (наименование классов АБП), к которым отмечена устойчивость	R-генотип	Vir-генотип	LD ₅₀ , КОЕ
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
КРМ9	Январь 2011	Вода	+	К20	1544	1 (BLA)	R1a-01	Vir6a	10
КPS73	Сентябрь 2016	Легкие	+	К1	23	1 (BLA)	R1a-01	Vir7a	44
КРВ1802К	Ноябрь 2013	Трахея	+	К1	23	1 (BLA)	R1a-01	Vir7	86
КРП1683	Август 2014	Трахея	+	К1	23	2 (BLA NIT)	R1a-01	Vir7	26
КРП261	Январь 2014	Трахея	+	К1	23	3 (BLA AMI NIT)	R2b-01	Vir7	16
КРВ2580/14	Июль 2014	Моча	+	К1	23	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R4a-11	Vir7	17
КРВ1493-1	Август 2013	Трахея	+	К1	23	6 (BLA TET QNL AMI SUL NIT)	R3a-11	Vir7	4×10 ²
КРВ463К/13	Апрель 2013	Дых.сист.	+	К1	23	6 (BLA QNL AMI SUL NIT PHO)	R4a-11	Vir7	1×10 ⁴
КРВ1103/14	Июнь 2014	Моча	+	К1	23	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R4a-11	Vir7	3×10 ²
КРВ475/14	Июль 2014	Моча	+	К1	23	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R4a-11	Vir7	1×10 ³
КРВ594/14	Февраль 2014	Рана	+	К1	23	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R4a-11	Vir7	3×10 ³
КРП3014	Январь 2014	Дых.сист.	+	К2	2174	6 (BLA TET QNL CHL AMI NIT)	R2a-01	Vir5d	1×10 ⁴
КРП1748	Август 2014	Дых.сист.	+	К2	65	5 (BLA QNL CHL AMI SUL)	R1a-01	Vir6a	83
КРВ4010	Октябрь 2013	Ликвор	+	К2	2280	3 (BLA TET NIT)	R1a-01	Vir5a	25
КРП1627	Январь 2014	Дых.сист.	+	К2	86	2 (BLA NIT)	R1a-01	Vir5a	14
КРП6208	Март 2014	Дых.сист.	+	К2	86	3 (BLA TET NIT)	R1a-01	Vir5a	40
КРВ492/16	Апрель 2016	Рана	+	К2	86	1 (BLA)	R1a-01	Vir5a	1×10 ³
КРВ463/16	Апрель 2016	Дых.сист.	+	К2	86	1 (BLA)	R1a-01	Vir5a	1×10 ³
КРВ550	Май 2013	Моча	+	К57	218	5 (BLA QNL PHO NIT SUL)	R4a-11	Vir5b	2×10 ³
КРВ584	Май 2013	Моча	-	К57	218	4 (BLA SUL NIT PHO)	R4a-11	Vir5b	>10 ⁶
КРВ500	Апрель 2013	Дых.сист.	+	К57	218	5 (BLA QNL SUL NIT PHO)	R4a-11	Vir4b	>10 ⁶
КРВ811К	Июнь 2013	Ликвор	+	К57	218	5 (BLA QNL SUL NIT PHO)	R4a-11	Vir4b	>10 ⁶
КРВ757К	Июнь 2013	Моча	+	К57	218	8 (BLA TET QNL CHL AMK SUL NIT PHO)	R4a-11	Vir4b	>10 ⁶
КРВ612-1	Май 2013	Дых.сист.	+	К57	218	7 (BLA QNL AMI SUL PHO NIT CST)	R4a-11	Vir4b	>10 ⁶
КРВ690/14К	Май 2014	Моча	-	К57	218	5 (BLA QNL CHL AMI NIT)	R3c-11	Vir2b	>10 ⁶
КРВ542/15	Март 2015	Моча	-	К57	23	7 (BLA QNL CHL AMI SUL NIT PHO)	R2b-01	Vir3b	>10 ⁶
КРП112	Декабрь 2014	Дых.сист.	-	К57	23	4(BLA QNL AMI SUL)	R3a-11	Vir5c	>10 ⁶
КРВ1493-2	Август 2013	Дых.сист.	-	К62	48	4 (BLA CHL AMI NIT)	R2b-11	Vir3a	>10 ⁶
КРВ420/14	Май 2014	Моча	-	К62	48	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R2b-01	Vir2a	>10 ⁶
КРВ1224	Ноябрь 2012	Дых.сист.	-	К47	395	6 (BLA TET QNL CHL AMI SUL)	R4a-11	Vir4a	>10 ⁶
КРВ1667	Ноябрь 2013	Моча	-	К47	395	6 (BLA QNL CHL AMI SUL NIT)	R4a-01	Vir4a	>10 ⁶
КРВ958/14	Июнь 2014	Моча	-	К14/64	147	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R3c-11	Vir4a	>10 ⁶

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
КРВ417/16	Март 2016	Дых.сист.	-	K14/64	147	4(BLA QNL AMI NIT)	R5-11	Vir3a	>10 ⁶
КРВ941/14	Июнь 2014	Дых.сист.	-	K27	833	7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT)	R3b-11	Vir2b	>10 ⁶
КРВ591/15	Февраль 2015	Ликвор	-	K28	20	2 (BLA NIT)	R2c-01	Vir3a	>10 ⁶
КРВ54/14	Январь 2014	Моча	-	K60	NI	7 (BLA TET QNL CHL AMK SUL NIT)	R3a-10	Vir4a	>10 ⁶
КРВ944/14	Июнь 2014	Моча	-	wzi420*	147	6 (BLA TET QNL CHL AMI NIT)	R3c-01	Vir3a	>10 ⁶
КРВ-711/14	Май 2014	Рана	-	wzi420*	147	6 (BLA TET QNL CHL AMI NIT)	R3c-01	Vir0	>10 ⁶

Примечание: NI – не идентифицирован; * - отсутствует ассоциация с К-серотипом; АБП – антимикробные препараты; BLA – β-лактамы; TET – тетрациклины; QNL – хинолоны; CHL – хлорамфениколы; АМК – аминогликозиды; SUL – сульфаниламиды; NIT – нитрофураны; PHO – фосфомицины.

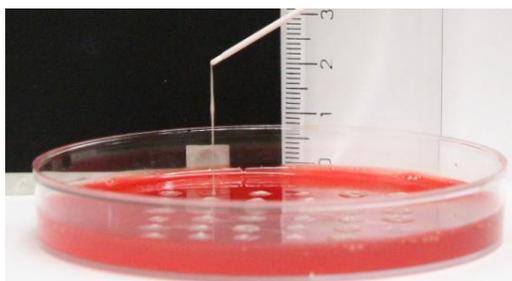


Рисунок 5 – Положительный стринг-тест гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* КРВ4010

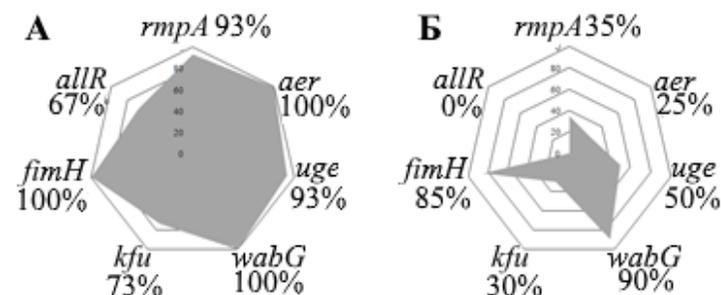


Рисунок 6 - Распределение генов вирулентности у вирулентных (А) и авирулентных (Б) для мышей штаммов *K. pneumoniae*

Таблица 4 – Представленность генотипов вирулентности (Vir-генотипов) в коллекции штаммов *K. pneumoniae*

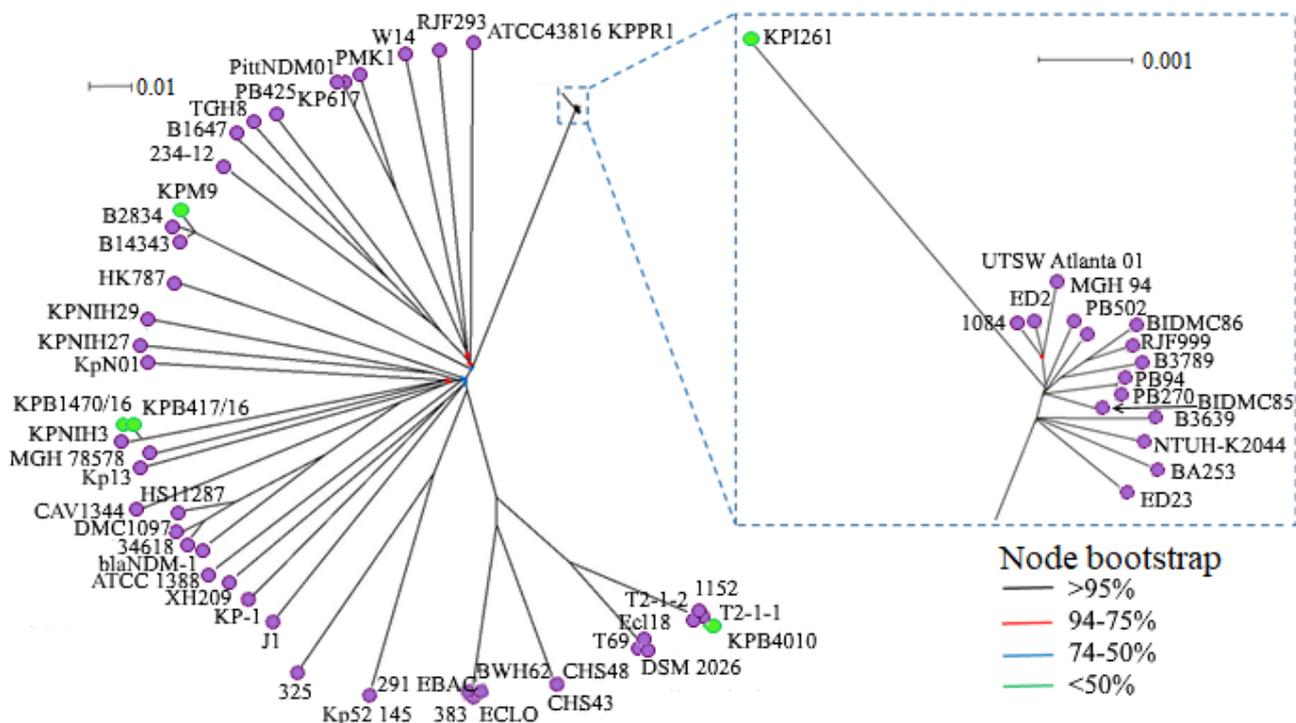
Vir-генотип	Количество генов вирулентности	Набор генов вирулентности	Количество штаммов, шт.
Vir7	7	<i>rmpA+aer+uge_2+wabG+kfu+fimH+allR</i>	12
Vir6a	6	<i>rmpA+aer+uge_2+wabG+kfu+fimH</i>	3
Vir5a	5	<i>rmpA+aer+uge_2+wabG+fimH</i>	7
Vir5b	5	<i>rmpA+aer+wabG+kfu+fimH</i>	3
Vir5c	5	<i>rmpA+uge_2+wabG+kfu+fimH</i>	1
Vir5d	5	<i>aer+uge_2+wabG+kfu+fimH</i>	1
Vir4a	4	<i>uge_2+wabG+kfu+fimH</i>	28
Vir4b	4	<i>rmpA+aer+wabG+fimH</i>	6
Vir3a	3	<i>uge_2+wabG+fimH</i>	66
Vir3b	3	<i>rmpA+wabG+fimH</i>	4
Vir2a	2	<i>wabG+fimH</i>	6
Vir2b	2	<i>uge_2+wabG</i>	4
Vir1a	1	<i>fimH</i>	1
Vir0	0	-	9

Штамм KPI112 ST23 и Vir5c-генотипа является авирулентным для животных, вероятно, из-за отсутствия гена аэробактина *aer*. Штамм KPB584, аналогичный вирулентному ГМ штамму KPB550 по генетическим характеристикам, является не-ГМ в связи с наличием в гене *rpmA* точечной делеции G в положении 286 п.н., приводящей к формированию стоп-кодона в положении 340 п.н. и отсутствию экспрессии гена, важного для проявления вирулентных свойств *K. pneumoniae*.

Анализ последовательностей полных геномов трех гипермукоидных высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*

Исследовали полные геномы трех высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*: KPM9 (GenBank MCNM00000000.1) сиквенс-типа 1544, выделенный из пресной воды в Краснодарском крае при мышинной эпизоотии в 2011 г.; KPB4010 (GenBank MCNN00000000.1) и KPI261 (GenBank MCNO00000000.1) сиквенс-типов 2280 и 23, выделенные из ликвора пациента нейрореанимации г. Москвы и из мокроты пациента инфекционной клинической больницы г. Москвы в 2013 и 2014 гг. Определено филогенетическое родство геномов изучаемых штаммов с 56 *K. pneumoniae* из разных географических регионов, представленных в базе данных GenBank (рис. 7).

На дендрограмме изучаемые гипермукоидные штаммы расположены на разных филогенетических ветвях с клиническими штаммами *K. pneumoniae*, выделенными в Азиатско-Тихоокеанском регионе, где впервые были описаны гипервирулентные штаммы клебсиелл. Так, штамм KPB4010 расположен совместно со штаммами с генотипом ST65^{K2}, выделенными в Тайване и Малайзии; штамм KPM9 – со штаммами K20-типов с неидентифицированными сиквенс-типам, выделенными в Индии; штамм KPI261 отнесен к группе выделенных в Китае гипервирулентных *K. pneumoniae* клонального комплекса CC23^{K1} вызвавшими первичные абсцессы печени у пациентов (Lin et al., 2012; Brisse et al., 2009; Lin et al., 2016) (рис. 10).



Зеленым цветом отмечены положения изучаемых штаммов *K. pneumoniae*, фиолетовым – штаммов, полные геномы которых представлены в базе данных GenBank

Рисунок 7 - Филогенетическое дерево, отражающее генетическое родство геномов изучаемых штаммов *K. pneumoniae* со штаммами, представленными в базе данных GenBank

Хромосомные гены резистентности (*bla_{SHV}*, *oqxAB* и *fosA*) представлены в геномах всех изучаемых штаммов, при этом, штамм КРВ4010 нес аллель *bla_{SHV-11}*, штамм КРМ9 – *bla_{SHV-75}*, и штамм КР1261 – *bla_{SHV-36}*. *K. pneumoniae* КР1261 дополнительно нес плазмидные детерминанты антибиотикорезистентности: *bla_{CTX-M-15}* и интегрон класса 1, несущий гены устойчивости к аминогликозидам *aadA1* и *aadB*, ген устойчивости к триметоприму *dfrA1* и ген устойчивости к сульфаниламидам *sul1*.

В геномах трех штаммов были также выявлены репликоны плазмид группы несовместимости IncHI1B. Только у штамма КР1261 выявлена плазида группы несовместимости IncA/C2, по-видимому, несущая ген эпидемической цефалоспориноазы *bla_{CTX-M-15}*.

Для плазмид группы несовместимости IncHI1B штаммов *K. pneumoniae* КР1261, КРВ4010 и КРМ9 выявлены гомологи в базе данных GenBank: высокомолекулярные плазмиды pLVPK, pK2044, pRJF293, pRJF999, pKCTC2242 и pED23, содержащие генетические детерминанты вирулентности *K. pneumoniae* (Chen et al. 2004). Данные плазмиды несли гены аэробактин-продуцирующей системы *iucABCDiutA* и двух систем транспорта железа: *iroBCDN*, кластера генов утилизации железа через катехол-содержащий сидерофор, и *fecIRA*, Fur-зависимой регуляторной системы утилизации железа. Последовательности генов, кодирующих систему *iucABCDiutA*, были на 100 % гомологичны для плазмид изучаемых штаммов КР1261, КРВ4010 и референс-плазмид pLVPK и pK2044. В то же время, последовательность гена *iutA* в штамме КРМ9 содержала один SNP, отличающий ее от последовательностей этого гена в других штаммах. Нуклеотидные последовательности генов кластеров *iroBCDN* и *fecIRA* штаммов КР1261, КРВ4010 и КРМ9 были идентичны более чем на 99 % таковым последовательностям на плаزمидах pLVPK и pK2044. Гены регуляторов гипермукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2* штаммов *K. pneumoniae* КР1261, КРВ4010 и КРМ9 были гомологичны на 100 и 99 % таковым генам плазмид pLVPK и pK2044.

Хромосомный фактор вирулентности - 22-kb регион аллантаинового регулона (*all* регион) выявлен в штамме КР1261, а оперон *kfu*, кодирующий систему утилизации железа - в штаммах КР1261 и КРМ9. В литературе отмечено наличие данных структур у штаммов клонального комплекса CC23 и их отсутствие почти во всех штаммах других генетических линий (Luo et al. 2014; Struve et al. 2015). Данные генетические детерминанты вирулентности не были обнаружены в штамме КРВ4010.

Сочетание признаков мультирезистентности к антибактериальным препаратам и вирулентности у клинических штаммов *K. pneumoniae*

В нашем исследовании большинство клинических штаммов *K. pneumoniae* (84 штамма из 151) по комплексу характеристик относились к ветви классических МЛУ клебсиелл. Большинство штаммов были одновременно устойчивы к 4-7 функциональным классам АБП, несли по 3-4 гена β -лактамаз (R-генотипы R3a, R3c и R4a). МЛУ штаммы несли преимущественно до четырех генов вирулентности (Vir-генотипы Vir0, Vir1a, Vir2a, Vir2b, Vir3a, Vir3b, Vir4a и Vir4b). Кроме того, к группе классических клебсиелл относились также штаммы, не обладающие МЛУ фенотипом (n=68). Выборочное изучение вирулентности данной группы штаммов на биологической модели аутбредных мышей показало, что они были авирулентными для животных (табл. 5). Меньшая часть изучаемой коллекции *K. pneumoniae* (27 штаммов из 151) относились к Vir-генотипам Vir5a, Vir5b, Vir5d, Vir6a и Vir7, проявляли вирулентность для аутбредных мышей (протестированы 22 штамма). Часть этих штаммов (n=17) были чувствительны к большинству функциональных классов АБП, что харак-

терно для эволюционной ветви гипервирулентных клебсиелл. Другая часть (n=10) характеризовалась не только высокой степенью вирулентности для мышей, но и МЛУ-фенотипом, штаммы были устойчивы к: β -лактамам, тетрациклинам, фторхинолонам, аминогликозидам, хинолонам, сульфаниламидам и нитрофуранам.

Таблица 5 – Представленность сочетаний Vir-генотипов и R-генотипов клинических штаммов *K. pneumoniae* коллекции (n=151)

Vir-генотип/ R-генотип	Vir7	Vir6a	Vir5a	Vir5b	Vir5c	Vir5d	Vir4a	Vir4b	Vir3a	Vir3b	Vir2a	Vir2b	Vir1a	Vir0	Всего
R5	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
R4a	6	-	-	3	-	-	5	6	11	-	1	1	-	1	34
R4b	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
R3a	1	-	-	-	1	-	13	-	23	-	2	-	-	-	40
R3b	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	2
R3c	-	-	-	-	-	-	5	-	7	-	-	1	-	2	15
R2a	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	1	-	-	-	3
R2b	1	-	-	-	-	-	-	-	10	4	1	-	-	-	16
R2c	-	-	-	-	-	-	2	-	4	-	-	-	-	-	6
R1a	4	3	7	-	-	-	1	-	5	-	1	-	-	-	18
R1b	-	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	1	3	8
R0	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	3	5
Всего	12	3	7	3	1	1	28	6	66	4	6	4	1	9	151

Примечание: зеленым цветом отмечены генотипы классических неМЛУ штаммов *K. pneumoniae*, голубым – классических МЛУ штаммов; оранжевым – гипервирулентных неМЛУ штаммов; розовым – гипервирулентных МЛУ штаммов

Особое внимание обращают на себя три штамма *K. pneumoniae* КРВ1493-1, КРВ2580/14 и КРВ1103/14 (таб. 3), выделенные от пациентов с очень тяжелыми инфекциями дыхательной и нервной систем, впоследствии умерших. Данные штаммы высоковирулентны для мышей и устойчивы к шести и семи классам АБП и принадлежат к генетической линии ST23^{K1}, характерной для гипервирулентных клебсиелл (Struve et al., 2015).

На основании литературных данных, гипервирулентные *K. pneumoniae* с МЛУ фенотипом начали описывать относительно недавно. В 2014 г. в Аргентине детектированы штаммы *K. pneumoniae* ST23^{K1}, несущие ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2} (Sejas et al., 2014), в 2015 г. в Китае – гипервирулентный штамм *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST1797^{K1}, несущий ген *bla*_{KPC-2} (Zhang et al., 2015), в 2016 г. во Франции – гипервирулентные штаммы ST23^{K1} с геном цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-3} (Surgers et al., 2016), в 2017 г. в Южной Корее – штаммы *K. pneumoniae* с генотипом ST23^{K1}, несущие ген *bla*_{CTX-M-15} (Cheong et al., 2017). Иной путь формирования гипервирулентных МЛУ штаммов был описан в 2017 г. в Китае: МЛУ госпитальные клебсиеллы с генотипом ST11^{K47}, характерным для классических *K. pneumoniae*, приобрели плазмиды вирулентности pLVPK-типа (Gu et al., 2017).

С помощью экспериментального переноса генов эпидемических БЛ *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-244} и *bla*_{NDM-1} в высоковирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРМ9 генотипа ST1544^{K20} с LD₅₀=10 КОЕ была показана принципиальная возможность приобретения гипервирулентными штаммами клебсиелл генов БЛ и их экспрессии, выраженной в расширении спектра устойчивости к АБП, что не приводило к значительному снижению степени вирулентности трансконъюгантов и трансформантов.

Так, у исходного штамма $LD_{50}=10$ КОЕ; у трансконъюганта с переданным ему геном $bla_{OXA-244}$ – $LD_{50}=18$ КОЕ; у трансконъюганта с генами $bla_{OXA-244}+bla_{CTX-M-15}+bla_{TEM-1}$ – $LD_{50}=24$ КОЕ, а у трансформанта с геном bla_{NDM-1} – $LD_{50}=101$ КОЕ (рис. 8).

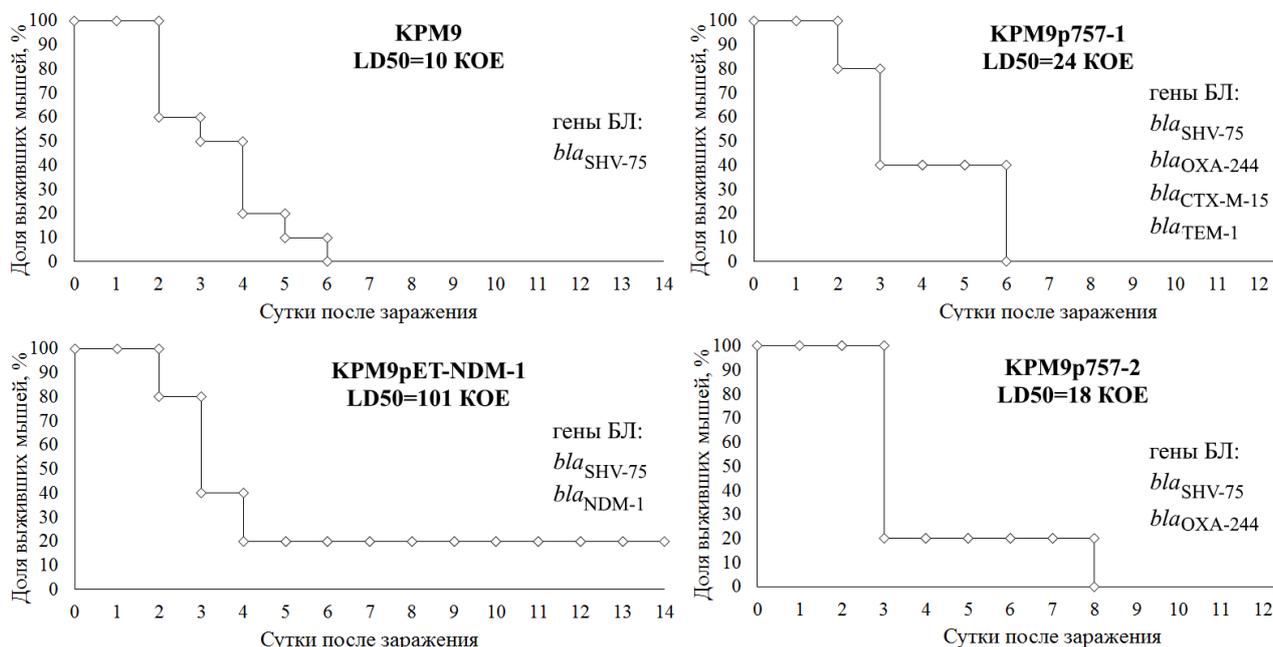


Рисунок 8 - Выживаемость белых аутбредных мышей при внутрибрюшинном заражении клетками штаммов *K. pneumoniae* KPM9, KPM9p757-1, KPM9p757-2 и KPM9pET-NDM-1 в дозе 1×10^4 КОЕ/животное

Новизной нашего исследования является выявление штаммов *K. pneumoniae* генетической линии ST23^{K1}, несущих гены одновременно двух эпидемически значимых бета-лактамаз: гена цефалоспорииназы $bla_{CTX-M-15}$ и гена карбапенемазы bla_{OXA-48} .

Полученные нами в ходе исследования данные позволили зафиксировать появление в Центральном регионе Российской Федерации клинических штаммов *K. pneumoniae* гипервирулентного сиквенс-типа ST23 с нехарактерной для этой генетической линии мультирезистентностью к антибактериальным препаратам, обусловленной приобретением эпидемических генов цефалоспорииназы CTX-M-15 и карбапенемазы OXA-48, а также интегронов класса 1. Это, по-видимому, указывает на продолжающийся глобальный эволюционный процесс формирования нового «суперпатогена» на основе сиквенс-типа ST23 клебсиелл.

ВЫВОДЫ

1. Создана коллекция клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в 2012-2016 гг. ($n=350$), электронный каталог и база данных «Клинические штаммы грамотрицательных бактерий для изучения молекулярных механизмов антибиотикорезистентности». Показана высокая гетерогенность штаммов *K. pneumoniae*: идентифицированы 14 сиквенс-типов, в том числе 3 новых, ранее не описанных: ST1544, ST2174 и ST2280.

2. Большинство штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2012-2016 гг. (94 %), являлись мультирезистентными, несли гены β -лактамаз bla_{SHV} (93 % штаммов), bla_{TEM} (53 %), bla_{CTX-M} (77 %), $bla_{OXA-48-like}$ (41 %) типов, интегроны 1 класса (33 %) и гены мажорного порина клебсиелл *ompK36* (97 %). В 2016 г. было зафиксировано появление *K. pneumoniae* сиквенс-типа 147, несущих ген bla_{NDM-1} .

3. *K. pneumoniae* в 2013-2015 гг. в нейрореанимационном отделении г. Москвы явились источником распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48} и *bla*_{OXA-244} среди энтеробактерий.
4. Встраивание IS-элементов в ген мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36*: IS1R-элемента в позиции 86 п.н. в штамме *K. pneumoniae* КРВ367К/15, и IS10R-элемента в позиции 41 п.н. в штамме *K. pneumoniae* КРВ2304К/15, привело к инактивации данного гена, утрате продукции белка OmpK36 и уменьшению чувствительности штаммов к имипенему.
5. Выявлены три группы клинических штаммов *K. pneumoniae*, различающиеся по вирулентности для аутбредных мышей: высоковирулентные с LD₅₀<500 КОЕ, средневирулентные с LD₅₀=10³-10⁴ КОЕ и авирулентные с LD₅₀>10⁶ КОЕ. С проявлением вирулентности для мышей ассоциированы генотипы ST23^{K1}, ST65^{K2}, ST86^{K2}, ST218^{K57}, ST2280^{K2}.
6. Молекулярным механизмом «дефектного» негипермукоидного фенотипа у *trpA*-позитивного авирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* КРВ584 является наличие неописанной ранее точечной делеции G в положении 286 в гене регулятора гипермукоидного фенотипа *trpA*.
7. Впервые в высоковирулентных штаммах *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 с капсульным типом K1 детектированы одновременно два гена эпидемических β-лактамаз *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-48}.
8. Полные геномы трех гипермукоидных высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* КРВ261, КРВ4010 и КРМ9 генотипов ST23^{K1}, ST2280^{K2} и ST1544^{K20}, соответственно содержали последовательности гомологов плазмиды вирулентности клебсиелл pLVPK. Полные геномы двух мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST147 различались наличием плазмиды группы несовместимости IncL/M, несущей ген *bla*_{OXA-48}, в штамме КРВ417/16 и присутствием неидентифицированного профага в хромосоме штамма КРВ1470/16.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

А. Статьи в реферируемых научных журналах

- 1 Fursova, N.K. The spread of *bla*_{OXA-48} and *bla*_{OXA-244} carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, **A.I. Knyazeva**, N.N. Kartsev, E.S. Leonova, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.V. Kurdyumova, S.Y. Sazikina, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2015. – Vol. 14. – No. 1. – P. 46. Impact Factor 2.760. Цит. Scopus=11.
- 2 Volozhantsev, N.V. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB_KpnP_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* / N.V. Volozhantsev, V.P. Myakinina, A.V. Popova, A.A. Kislichkina, E.V. Komisarova, **A.I. Knyazeva**, V.M. Krasilnikova, N.K. Fursova, E.A. Svetoch // Arch Virol. - 2016. - Vol. 161. - P. 499-501. Impact Factor 2.058. Цит. Scopus=4.
- 3 Kislichkina, A.A. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia / A.A. Kislichkina, **A.I. Lev**, E.V. Komisarova, N.K. Fursova, V.P. Myakinina, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, N.V. Volozhantsev // Pathog. Dis. – 2017. – Vol. 75. – No. 4. – P. ftx024. Impact Factor 2.335
- 4 **Lev, A.I.** Identification of IS1R and IS10R elements inserted into *ompk36* porin gene of two multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* hospital strains / **A.I. Lev**, E.I. Astashkin, R.Z. Shaikhutdinova, M.E. Platonov, N.N. Kartsev, N.V. Volozhantsev, O.N. Ershova, E.A. Svetoch, N.K. Fursova // FEMS Microbiol. Lett. – 2017. – Vol. 364. – No. 10. – P. fnx072. Impact Factor 1.765
- 5 Solovieva, E.V. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types / E.V. Solovieva, V.P. Myakinina, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin, V.V. Mochalov, **A.I. Lev**, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // Virus Res. – 2017. – Vol. 243. – P. 10-18. Impact Factor: 2.628

- 6 Volozhantsev, N.V. Genome Sequences of Two NDM-1 Metallo- β -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant Strains of *Klebsiella pneumoniae* with a High Degree of Similarity, One of Which Contains Prophage / N.V. Volozhantsev, A.A. Kislichkina, **A.I. Lev**, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, N.K. Fursova // Genome Announc. – 2017. – Vol. 5. – No. 42. – P. pii: e01173-17. 2015.

В. Тезисы всероссийских и международных научных конференций

- 1 Фурсова, Н.К. Первый случай обнаружения бета-лактамаз ОХА-48-типа в госпитальных изолятах *Proteus mirabilis*. / Н.К. Фурсова, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, **А.И. Князева**, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, Э.А.Светоч // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2014. – Т. 16.- № 2. -С. 39.
- 2 Fursova, N. Experimental Mobilization of Non-Conjugative CTX-M-Carrying Plasmids from *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. / N. Fursova, N. Kartsev, D. Pachkunov, E. Astashkin, **A. Knyazeva**, S. Sidorenko, A. Kruglov, E. Svetoch, I. Dyatlov // 54th Annual ICAAC, Washington DC, USA, September 5 -9, 2014. Poster #C-151.
- 3 Воложанцев, Н.В. Бактериофаги, активные против гипервирулентных (гипермукоидных) штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Н.В. Воложанцев, В.П. Мякина, Э.А. Светоч, В.М. Красильникова, А.В. Попова, В.В. Веревкин, В.А. Баннов, А.И. Борзилов, О.В. Коробова, **А.И. Князева**, Е.И. Асташкин, Н.К. Фурсова, В.Е. Маликов, О.Н. Ершова, И.А. Дятлов, Е.П. Селькова, Т.А. Гренкова // Материалы III Санкт-петербургского международного экологического форума «Окружающая среда и здоровье человека: фундаментальные, клинические и экологические аспекты современной микробиологии» Инф. Иммуно. - 2014. – спец. вып. – С.73.
- 4 **Князева, А.И.** Характеристика нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, внутри- и межвидовой конъюгативный перенос плазмид, несущих генетические детерминанты антибиотикорезистентности. / А.И. Князева, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // VI Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины», Ставрополь, 22-24 октября 2014 г. – С. 84-86.
- 5 Леонова, Е.С. Детекция мобильных генетических элементов интегронов классов 1 и 2 в полирезистентных клинических изолятах *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Proteus mirabilis* / Е.С. Леонова, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, **А.И. Князева**, Э.А. Светоч, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.К.Фурсова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. Москва, 30 марта - 1 апреля 2015 г. – С. 193.
- 6 Fursova, N.K. First Detection of the OXA-244 Carbapenemase Gene in Nosocomial *Enterobacter aerogenes* Isolates. / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, N.N. Kartsev, **A.I. Knyazeva**, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, E.A. Svetoch, I.A. Dyatlov // 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 25 - 28 April 2015, Copenhagen, Denmark. Poster # P1308
- 7 Асташкин, Е.И. Детекция генов антибиотикорезистентности в бактериальных культурах, выделенных из кишечника и трахеи при одномоментном обследовании пациентов нейрохирургического ОРИТ. / Е.И. Асташкин, **А.И. Князева**, О.И. Тазина, Е.С. Леонова, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17.- № 2. –Приложение 1. - С. 14.
- 8 Асташкин, Е.И. Обнаружение гена карбапенемазы ОХА-48 в изоляте *Enterobacter cloacae*, выделенном в нейрохирургическом ОРИТ в Москве. / Е.И. Асташкин, **А.И. Князева**, Е.С. Леонова, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Н.В. Курдюмова, С.Ю. Сазыкина, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Тезисы XVII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. Москва, 20-22 мая 2015 г. // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2015. – Т. 17.- № 2. –Приложение 1. - С. 14-15.
- 9 **Князева, А. И.** *Klebsiella pneumoniae*: характеристика вирулентности и антибиотикорезистентности госпитальных штаммов, выделенных в Москве в 2013-2014 годах. / А.И. Князева, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, Т.И. Комбарова, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Сборник тезисов X Молодежной школы–конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 27-30 октября 2015 года
- 10 Комисарова, Е. В. Выделение и характеристика бактериофагов, активных против гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae*. / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, **А.И. Князева**, Е.А.Денисенко, Н.В. Воложанцев // Сборник тезисов X Молодежной школы–конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии», Москва, 27-30 октября

2015 г.

- 11 Асташкин, Е.И. Обнаружение гена цефалоспорины СТХ-М-15 и атипичного интегрона класса 1 в клиническом изоляте *Pseudomonas aeruginosa*. / Е.И. Асташкин, **А.И. Лев**, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова / Тезисы XVIII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. Москва, 25-27 мая 2016 г. // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2016. – Т. 18.- № 2. –Приложение 1. - С. 13-14.
- 12 Асташкин, Е.И. Новый интегрон класса 1, несущий неизвестную генную кассету, выявленный в клиническом штамме *Pseudomonas aeruginosa*. / Е.И. Асташкин, **А.И. Лев**, Н.Н. Карцев, О.Н. Ершова, И.А. Александрова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова / Тезисы XVIII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. Москва, 25-27 мая 2016 г. // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2016. – Т. 18.- № 2. –Приложение 1. - С. 14.
- 13 **Лев, А.И.** Характеристика грамотрицательных антибиотикорезистентных клинических изолятов, выделенных в отделении нейрореанимации. / А.И. Лев, Е.И. Асташкин, О.И. Тазина, О.Н. Ершова, Н.В. Курдюмова, Н.Н. Карцев, Е.С. Леонова, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова / Тезисы XVIII Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии. Москва, 25-27 мая 2016 г. // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2016. – Т. 18.- № 2. –Приложение 1. - С. 29.
- 14 Fursov, M. Antibiotic and Bacteriophage Susceptibility of Uropathogenic *Klebsiella pneumoniae*. / M. Fursov, **A. Lev**, E. Astashkin, V. Myakinina, N. Kartsev, N. Volozhantsev, N. Fursova // ASM MICROBE2016. June 16–20, 2016, Boston, MA, USA. Poster #274.
- 15 **Лев, А.И.** Генотипы вирулентности и сиквенс-типы клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в 2012-2016 гг. / А.И. Лев, Е.И. Асташкин, О.В. Коробова, Т.И. Комбарова, Н.К. Фурсова // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 1–3 ноября 2016 г.); под ред. д-ра мед. наук, проф. А.Ю. Поповой. – М.: Грифон, 2016. – С. 120-122.
- 16 Слукин, П.В. Активность препаратов антисептиков против госпитальных *Klebsiella pneumoniae*, несущих ген *bla_{NDM-1}* / П.В. Слукин, Н.К. Фурсова, **А.И. Лев**, Е.И. Асташкин, О.Н. Ершова, И.А. Савин, Н.В. Курдюмова, И.А. Александрова // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2017. – Т. 19.- № 2. –Приложение 1. - С. 29.
- 17 **Лев, А.И.** Госпитальные изоляты *Klebsiella pneumoniae*, несущие ген металло-бета-лактамазы NDM-1 / **А.И. Лев**, Н.К. Фурсова, Е.И. Асташкин, О.Н. Ершова, И.А. Александрова // Пробл. Мед. Микол. – 2017. – Т. 19. - № 2. – С. 96.
- 18 **Лев, А.И.** Анализ геномов штаммов *Klebsiella pneumoniae*, несущих гены карбапенемазы NDM-1/ **А.И. Лев**, А.А. Кисличкина, Н.В. Воложанцев, Н.К. Фурсова // 1-ый микробиологический конгресс: сборник тезисов/под ред. д.б.н. Решетиловой Т.А. - М. - ООО «Вода: химия и экология». – 2017. – С. 112.
- 19 Новикова Т.С. Одномоментные исследования носительства генов антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации в 2015 и 2017 гг. / Т.С. Новикова, **А.И. Лев**, Е.И. Асташкин, О.Н. Ершова, Н.К. Фурсова // 1-ый микробиологический конгресс: сборник тезисов/под ред. д.б.н. Решетиловой Т.А. - М. - ООО «Вода: химия и экология». – 2017. – С. 117-118.
- 20 Фурсова, Н.К. Филогенетическое родство генов, ответственных за синтез липополисахарида и капсулы, в штаммах *Klebsiella pneumoniae* разных сиквенс-типов / Н.К. Фурсова, **А.И. Лев**, Р.З. Шайхутдинова, Н.В. Воложанцев // 1-ый микробиологический конгресс: сборник тезисов/под ред. д.б.н. Решетиловой Т.А. - М. - ООО «Вода: химия и экология». – 2017. – С. 131-132.

Выражаю искреннюю благодарность:

моему научному руководителю к.б.н. Фурсовой Н.К.

за оказанную помощь при выполнении диссертационной работы;

сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ к.м.н. Асташкину Е.И., к.б.н. Воложанцеву Н.В.,

к.б.н. Шайхутдиновой Р.З., к.м.н. Борзилову А.И., к.б.н. Кисличкиной А.А.,

Тазиной О.И., к.б.н. Платонову М.Е., к.б.н. Комбаровою Т.И., к.б.н. Коробовой О.В.

за содействие в проведении экспериментальных исследований;

Государственному научному центру прикладной микробиологии и биотехнологии в лице

академика РАН, д.м.н., профессора Дятлова И.А. за предоставленную возможность

провести необходимые эксперименты и выполнить представленную работу.