

Министерство здравоохранения и социального развития Российской Федерации
Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия
человека

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

На правах рукописи

ЛЕВ

Анастасия Игоревна

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

Специальность:

03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук Н.К. Фурсова

Оболенск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 7 |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 15 |
| 1.1 Морфологические и культуральные свойства <i>K. pneumoniae</i> | 15 |
| 1.2. Клиническая значимость <i>K. pneumoniae</i> | 15 |
| 1.3 Молекулярно-генетические механизмы множественной лекарственной устойчивости <i>K. pneumoniae</i> | 19 |
| 1.3.1 Механизмы формирования устойчивости <i>K. pneumoniae</i> к бета-лактамам..... | 20 |
| 1.3.2 Устойчивость к аминогликозидам..... | 21 |
| 1.3.3 Устойчивость к хинолонам..... | 22 |
| 1.3.4 Устойчивость к полимиксинам..... | 22 |
| 1.3.5 Устойчивость к тигециклинам..... | 23 |
| 1.3.6 Роль мажорных пориновых белков клебсиелл в формировании антибиотикорезистентности..... | 24 |
| 1.3.7 Вклад IS элементов в формирование антибиотикорезистентности <i>K. pneumoniae</i> | 24 |
| 1.3.8 Вклад плазмид <i>K. pneumoniae</i> в формирование антибиотикорезистентности и вирулентности..... | 25 |
| 1.4 Факторы вирулентности <i>K. pneumoniae</i> | 26 |
| 1.4.1 Капсула <i>K. pneumoniae</i> | 27 |
| 1.4.2 Липополисахарид <i>K. pneumoniae</i> | 28 |
| 1.4.3 Роль фимбрий 1 и 3 типов в формировании вирулентности <i>K. pneumoniae</i> | 30 |
| 1.4.4 Системы утилизации ионов железа..... | 32 |
| 1.4.5 Метаболизм аллантиина..... | 33 |
| 1.5 Эволюция <i>K. pneumoniae</i> : классические и гипервирулентные эволюционные ветви..... | 34 |
| 1.5.1 Генетические линии <i>K. pneumoniae</i> : сиквенс-типы и клональные комплексы..... | 36 |
| 1.5.2 Опасность объединения потенциалов гипервирулентных и классических <i>K. pneumoniae</i> | 37 |
| 1.6 Заключение по Главе 1..... | 38 |
| ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 40 |
| 2.1 Микробиологические методы..... | 40 |
| 2.1.1 Штаммы микроорганизмов..... | 40 |
| 2.1.2 Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий..... | 41 |
| 2.1.3 Выделение бактерий из клинического материала..... | 41 |

| | |
|--|----|
| 2.1.4 Видовая идентификация бактерий..... | 42 |
| 2.1.5 Стринг-тест..... | 42 |
| 2.1.6 Определение чувствительности к антимикробным препаратам..... | 42 |
| 2.1.7 Селекция устойчивого к рифампицину варианта штамма <i>K. pneumoniae</i> КРМ9..... | 43 |
| 2.2. Биологические методы..... | 43 |
| 2.2.1 Лабораторные животные..... | 43 |
| 2.2.2 Подготовка бактериальных суспензий для заражения..... | 44 |
| 2.2.3 Определение вирулентности штаммов <i>K. pneumoniae</i> для мышей..... | 44 |
| 2.2.4 Определение среднелетальной дозы штаммов <i>K. pneumoniae</i> для мышей..... | 44 |
| 2.3 Биохимические методы..... | 45 |
| 2.3.1 Выделение липополисахаридов <i>K. pneumoniae</i> | 45 |
| 2.3.2 Выделение пориновых белков <i>K. pneumoniae</i> | 45 |
| 2.3.3 Электрофорез в полиакриламидном геле и окрашивание препаратов..... | 46 |
| 2.3.4 Электрофорез в агарозном геле..... | 46 |
| 2.4 Молекулярно-генетические методы..... | 46 |
| 2.4.1 Плазмидные векторы, использованные в работе..... | 46 |
| 2.4.2 Конъюгативный перенос плазмид..... | 47 |
| 2.4.3 Криотрансформация штаммов бактерий..... | 47 |
| 2.4.4 Подготовка ДНК матрицы для полимеразной цепной реакции..... | 48 |
| 2.4.5 Выделение ДНК <i>K. pneumoniae</i> для полногеномного секвенирования..... | 48 |
| 2.4.6 Выделение плазмидной ДНК бактерий..... | 49 |
| 2.4.7 Выделение тотальной РНК..... | 49 |
| 2.4.8 Обратная транскрипция..... | 50 |
| 2.4.9 Детекция генов антибиотикорезистентности, вирулентности и генов капсулообразования с помощью ПЦР.... | 50 |
| 2.4.10 Определение групп несовместимости плазмид..... | 51 |
| 2.4.11 Генотипирование штаммов <i>K. pneumoniae</i> методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК.... | 51 |
| 2.4.12 Мультилокусное секвенирование-типирование штаммов штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 52 |
| 2.4.13 Секвенирование нуклеотидных последовательностей изучаемых генов..... | 52 |
| 2.4.14 Полногеномное секвенирование штаммов | 52 |

| | |
|--|----|
| <i>K. pneumoniae</i> | |
| 2.6. Биоинформационный анализ..... | 53 |
| 2.6.1 Дизайн и синтез олигонуклеотидных праймеров..... | 53 |
| 2.6.2 Анализ нуклеотидных последовательностей генов бактерий..... | 53 |
| 2.6.3 Определение клональных комплексов <i>K. pneumoniae</i> | 53 |
| 2.6.4 Филогенетический анализ генов <i>wabG</i> и <i>ige</i> штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 54 |
| 2.6.5 Анализ полных геномов штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 54 |
| 2.6.6 Филогенетический анализ полных геномов штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 54 |
| РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ..... | 55 |
| ГЛАВА 3 ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> | 55 |
| 3.1. Оценка эпидемиологической значимости <i>Klebsiella pneumoniae</i> среди грамотрицательных возбудителей госпитальных инфекций..... | 55 |
| 3.2 Фенотипическая характеристика коллекции госпитальных штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> , выделенных в РФ в 2012-2016 гг..... | 56 |
| 3.3 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности в штаммах <i>K. pneumoniae</i> | 58 |
| 3.4 Генотипы резистентности (R-генотипы) госпитальных штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> и их распространенность..... | 60 |
| 3.5 Вариабельность генов пориновых белков <i>K. pneumoniae</i> | 61 |
| 3.6 Влияние встраивания IS-элементов в ген порина <i>ompK36</i> на чувствительность к антибактериальным препаратам у госпитальных штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 63 |
| 3.6.1 Характеристика штаммов <i>K. pneumoniae</i> с инактивированным геном <i>ompK36</i> | 63 |
| 3.6.2 Клонирование гена <i>ompK36</i> и восстановление продукции порина OmpK36 в штамме <i>K. pneumoniae</i> KPB367K/15..... | 67 |
| 3.6.3 Влияние продукции белка OmpK36 на фенотип антибиотикорезистентности штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 69 |
| 3.6.4 Экспрессия генов бета-лактамаз в штаммах, отличающихся по наличию продукции поринового белка OmpK36..... | 70 |
| 3.7 Оценка роли <i>K. pneumoniae</i> как источника распространения генов эпидемических карбапенемаз <i>bla_{OXA-48-like}</i> типа среди штаммов энтеробактерий в госпитальной среде..... | 72 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.1 Антибиотикорезистентность изолятов энтеробактерий, выделенные в 2013-2014 гг..... | 72 |
| 3.7.2 Гены антибиотикорезистентности изолятов энтеробактерий, выделенных в 2013-2014 г..... | 74 |
| 3.7.3 Разнообразие RAPD-генотипов клинических изолятов, выделенных в 2013-2014 гг..... | 76 |
| 3.7.4 Распространение генов карбапенемаз <i>bla</i> _{OXA-48-like} в госпитальной среде..... | 77 |
| 3.7.5 Плазмидная локализация генов <i>bla</i> _{OXA-48-like} | 81 |
| 3.8 Клинические штаммы <i>K. pneumoniae</i> , несущие ген эпидемической карбапенемазы <i>bla</i> _{NDM-1} , выделенные в г. Москве в 2016 г..... | 84 |
| 3.8.1 Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических штаммов <i>K. pneumoniae</i> , несущих ген карбапенемазы <i>bla</i> _{NDM-1} | 86 |
| 3.8.2 Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов <i>K. pneumoniae</i> , несущих ген карбапенемазы <i>bla</i> _{NDM-1} | 87 |
| 3.9 Изучение носительства грамотрицательных бактерий и генов антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации г. Москвы в рамках трех одномоментных исследований в 2015 г..... | 88 |
| 3.9.1 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности бактериальных культур, выделенных в рамках одномоментных исследований..... | 90 |
| 3.10 Разработка методических рекомендаций для детекции генов антибиотикорезистентности в штаммах <i>K. pneumoniae</i> | 93 |
| 3.11 Заключение по Главе 3..... | 95 |
| ГЛАВА 4 ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>..... | 97 |
| 4.1 Клиническая значимость изучаемых штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 97 |
| 4.2 Оценка вирулентности штаммов <i>K. pneumoniae</i> на мышинной модели..... | 98 |
| 4.3 Гипермукоидный фенотип клинических штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 99 |
| 4.4 Сиквенс-типы и клональные комплексы <i>K. pneumoniae</i> | 101 |
| 4.5 Капсула, капсульные серотипы и липополисахариды <i>K. pneumoniae</i> | 105 |
| 4.6 Гены и генотипы вирулентности клинических штаммов | 108 |

| | |
|---|-----|
| <i>K. pneumoniae</i> | |
| 4.7 Разработка методических рекомендаций для детекции генов вирулентности в штаммах <i>K. pneumoniae</i> | 111 |
| 4.8 Значимость гена регулятора гипермукоидного фенотипа <i>trpA</i> для проявления вирулентности <i>K. pneumoniae</i> для мышей.. | 112 |
| 4.9 Вариабельность генов, участвующих в синтезе липополисахаридов <i>K. pneumoniae</i> | 114 |
| 4.10 Сочетание признаков мультирезистентности к антибактериальным препаратам и вирулентности у клинических штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 116 |
| 4.11 Оценка вирулентности штамма <i>K. pneumoniae</i> КРМ9 после экспериментальной передачи плазмид резистентности..... | 119 |
| 4.12 Заключение по Главе 4..... | 123 |
| ГЛАВА 5 АНАЛИЗ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ГИПЕРВИРУЛЕНТНЫХ И АВИРУЛЕНТНЫХ ДЛЯ МЫШЕЙ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> | 125 |
| 5.1 Характеристика полных геномов трех высоковирулентных и двух авирулентных для мышей штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 125 |
| 5.2 Сиквенс-типы и капсульные типы..... | 125 |
| 5.3 Филогенетический анализ полных геномов изучаемых штаммов..... | 127 |
| 5.4 Сравнительный анализ резистомов и факторов вирулентности высоковирулентных и мультирезистентных штаммов <i>K. pneumoniae</i> | 129 |
| 5.5 Выявление последовательности профага в мультирезистентном штамме <i>K. pneumoniae</i> КРВ1470/16 сиквенс-типа ST147..... | 133 |
| 5.7 Заключение по Главе 5..... | 135 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ..... | 136 |
| ВЫВОДЫ..... | 139 |
| ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ | 141 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ..... | 143 |
| СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ..... | 167 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ А..... | 172 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Б..... | 175 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ В..... | 177 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ Г..... | 178 |

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 [115, 146]. В Российской Федерации, как и во всем мире, *K. pneumoniae* являются актуальными госпитальными патогенами [17, 22, 78, 141] 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 [94, 104, 144]. *K. pneumoniae* входят в группу «ESKAPE» (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), включающую актуальные антибиотико-устойчивые патогены [163].

В настоящее время *K. pneumoniae* представлены двумя дискретными эволюционными ветвями: классическими и гипервирулентными клебсиеллами [94]. 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 [139]. Устойчивость к антибактериальным препаратам обусловлена наличием у бактерий генов бета-лактамаз, интегронов и других генетических детерминант [132]. В Российской Федерации описаны множественно устойчивые клинические штаммы клебсиелл, в том числе резистентные к цефалоспорином и карбапенемам, что обусловлено наличием у них бета-лактамаз СТХ-М-, ТЕМ-, ОХА-48-, NDM- и КРС-типов [3, 5, 10, 22, 24, 30, 78].

Гипервирулентные *K. pneumoniae* способны, в зависимости от локализации очага инфекции, вызывать тяжелые, с частотой летального исхода 3-55 %, заболевания у людей с нормальным иммунитетом [64, 109, 117, 167]. 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

Америках, в Карибском бассейне, в Европе, на Ближнем Востоке, в Австралии и Африке [73, 77, 80, 88, 105, 170, 184, 185]. Гипервирулентные *K. pneumoniae* чаще, чем классические штаммы, несут генетические факторы, ассоциированные с гипермукоидным фенотипом [111, 167], с молекулярными системами усвоения трехвалентного железа [121, 131], с системой утилизации аллантиина [67], с синтезом гладкого липополисахарида и полисахаридной капсулы [101, 153], а также с наличием фимбрий I типа [165].

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 [139, 200] и гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* с сиквенс-типами ST23, ST29, ST65, ST86, ST268, ST375, ST412 и ST420 [139, 191, 200], и K1, K2, реже - K5, K20, K54 и K57 типами [139, 167, 200].

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 [63]. В последние годы появились сообщения о приобретении гипервирулентными *K. pneumoniae* плазмидных эпидемических генов бета-лактамаз: в Южной Корее описаны штаммы ST23^{K1} с геном цефалоспориназы *bla*_{СТХ-М-15} [175], в Аргентине – штаммы ST23^{K1} с геном карбапенемазы *bla*_{КРС-2} [58], в Китае – штаммы нового ST1797^{K1} с геном *bla*_{КРС-2} [199], во Франции – штаммы ST86^{K2} с геном *bla*_{СТХ-М-3} [176]. В 2017 г. в Российской Федерации описан случай менингита в неонатальном отделении г. Казани, вызванного гипермукоидным, *rmpA*-позитивным штаммом *K. pneumoniae*, продуцирующим неидентифицированную бета-лактамазу расширенного спектра [106]. В 2017 г. в Китае зафиксировано, напротив, приобретение плазмид вирулентности рLVPK-типа мультирезистентными госпитальными штаммами *K. pneumoniae* ST11^{K47} [91]. Описанные данные подтверждают опасения исследователей о возможном формировании в будущем нового «суперпатогена» – гипервирулентных и одновременно множественно резистентных *K. pneumoniae* [139].

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.b.pasteur.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 бета-лактамаз, интегронов, IS-элементов, плазмид) [30, 62, 107, 160]. Показано, что для проявления вирулентных свойств *K. pneumoniae* важны полисахардная капсула, фимбрии, способность акцептировать ионы железа и утилизировать аллантаин, устойчивость к бактерицидному действию сыворотки крови, ассоциированные с генами *rmpA*, *aer*, *kfu*, *wabG*, *uge*, *fimH* и *all* регулоном [67, 101, 111, 153, 165, 167]. Установлена принадлежность гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* к определенным К-типам и сиквенс-типам [62, 191, 200]. Из разных регионов мира сообщается о появлении клебсиелл, проявляющих одновременно множественную лекарственную устойчивость и высокую вирулентность для людей и лабораторных животных [58, 106, 175, 176, 199].

Не смотря на многостороннее изучение данного возбудителя в мире, в Российской Федерации мало представлена информация о распространении гипервирулентных клебсиелл, представленности 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 нейрореанимационном отделении г. Москвы выделены штаммы *K. pneumoniae* сиквенс-типа 147, несущие ген эпидемически значимой металло- бета-лактамазы NDM-1.

Впервые описаны события интеграции *IS1R*- и *IS10R*-элементов в позиции 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 *rtmA*-позитивного авирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* КРВ584, который заключается в наличии неописанной ранее точечной делеции в гене регулятора гипермукоидного фенотипа *rtmA*.

Впервые в штаммах *K. pneumoniae* гипервирулентного сиквенс-типа ST23 с капсульным типом K1 детектировано наличие одновременно двух генов эпидемических бета-лактамаз: цефалоспориназы *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). – 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.b.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 патогенность» 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 множественной лекарственной устойчивости. Анализ научной литературы, посвященной тематике исследования, проведен формально-логическими методами. Исследования, направленные на решение поставленных задач, осуществляли общенаучными и специфическими методами. В работе использованы микробиологические, биохимические, биофизические, молекулярно-генетические, биологические, биоинформационные и статистические методы исследований.

Положения, выносимые на защиту

K. pneumoniae, выделенные в Российской Федерации в 2012-2016 гг., характеризуются 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*_{OXA-48-like} среди энтеробактерий в нейрореанимационном отделении 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}, ST218⁵⁷, ST2280^{K2}.

В Российской Федерации на основе *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23^{K1} формируются варианты патогена, характеризующиеся одновременно множественной антибиотикорезистентностью и вирулентностью, в том числе - несущие гены двух эпидемических бета-лактамаз *bla*_{CTX-M-15} и *bla*_{OXA-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 Роспотребнадзора «Совершенствование генодиагностики и генотипирования возбудителей бактериальных инфекций» 2013-2015 гг.; НИР 049 «Мониторинг и изучение свойств возбудителей пищевых и госпитальных инфекций, разработка средств их диагностики» 2016-2017 гг. и проекта №15-15-00058 Российского научного фонда «Бактериофаги, перспективные для разработки лечебно-профилактических препаратов против госпитальных *Klebsiella pneumoniae*-инфекций: изучение литической активности, организации геномов, особенностей взаимодействия с бактериальной клеткой и биологической безопасности» 2015-2017 гг.

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, а анализе полученных результатов, в подготовке материалов для публикаций, в представлении устных и постерных докладов на конференциях. Отдельные разделы работы выполнены совместно с к.б.н. Фурсовой Н.К., к.б.н. Воложанцевым Н.В., 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Морфологические и культуральные свойства *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae – грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, имеющие вид коротких толстых палочек размером 0,3-1,0×0,6-6,0 мкм. Клетки клебсиелл хорошо воспринимают анилиновые красители, в мазках располагаются одиночно, парами или цепочками, неподвижные. Чистая культура *K. pneumoniae* впервые была выделена Карлом Фридендером в конце XIX века из легких умершего от пневмонии пациента и носила название «бактерия Фридендера» [90, 139], позднее родовое название бактерий изменили на «*Klebsiella*» в честь немецкого бактериолога Эдвина Клебса [167].

Температурный оптимум роста клебсиелл составляет 35-37 °С, оптимум pH=7,2. *K. pneumoniae* хорошо растут на простых питательных средах в температурных пределах 12-43 °С. Различают S- и R-формы колоний на плотных питательных средах. В жидких питательных средах S-формы дают диффузный рост, могут образовывать осадок на стенках сосуда, кольцо или плену, R-формы клебсиелл вызывают небольшое помутнение культуральной жидкости и образуют зернистый осадок. Подавляющее большинство штаммов *K. pneumoniae* ферментируют D-глюкозу с образованием кислоты и газа (известны не образующие газ штаммы), сбраживают лактозу, сахарозу, L-арабинозу, мальтозу, D-маннозу, мелибиозу, L-раффинозу, салицин, трегалозу, целлобиозу, утилизируют калия цианид (KCN) и восстанавливают нитраты без образования сероводорода (H₂S); не способны синтезировать фенилаланиндезаминазу и не гидролизуют желатин [13].

1.2 Клиническая значимость *K. pneumoniae*

Бактерии *K. pneumoniae* широко распространены в окружающей среде: часто встречаются в пресных водах, почве и на поверхности растений - описаны случаи выделения изолятов *K. pneumoniae* из речной воды, а также с поверхности свежих овощей и фруктов [177, 180], во внутрибольничной среде *K. pneumoniae* встречаются в

смывах с медицинского оборудования [115, 158]. *K. pneumoniae* устойчивы к неблагоприятным климатическим условиям: клебсиеллы были обнаружены в составе цианобактериальных матов Антарктики [12].

K. pneumoniae может входить в состав микрофлоры кожи, носоглотки и желудочно-кишечного тракта здоровых млекопитающих, в том числе человека, а также - вызывать широкий спектр инфекций (таблица 1.1) [115, 132, 146]. В настоящее время *K. pneumoniae* является одним из наиболее распространенных оппортунистических внутрибольничных патогенов, они вызывают около одной трети всех граммотрицательных инфекций [132]. Наиболее распространены вызванные *K. pneumoniae* бактериемии, поражения респираторного тракта, инфекции мочевыводящих путей и инфекции хирургических ран, ассоциированные с оказанием медицинской помощи [57, 61, 98, 178].

Таблица 1.1 – Характеристика внутрибольничных и внебольничных инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, по данным Paczosa and Mecsas (2016)

| Параметры | Внутрибольничные инфекции | Внебольничные инфекции |
|--|--|---|
| Основные типы инфекций | Пневмония, инфекции мочевыводящей системы, бактериемия | Первичный абсцесс печени, бактериемия, абсцессы мягких тканей и органов, пневмония, менингиты и эндофтальмиты |
| Частота пневмоний, вызванных <i>K. pneumoniae</i> | 11,8 % | 3,0 % – 5,0 % в Северной Америке, Европе и Австралии; 15,0 % - в Азии и Африке |
| Частота инфекций мочевыводящей системы, вызванных <i>K. pneumoniae</i> | 2,0-6,0 % | 4,3-7,0 % |
| Факторы риска | Наличие опухолей и диабета | Наличие опухолей, диабета, хронических обструктивных заболеваний легких, хронический алкоголизм |

Уровень смертности от клебсиеллезов варьирует от 3 % до 55 % в зависимости от локализации инфекции [167]. По данным Центра по контролю и профилактике заболеваний США, смертность от внутрибольничных клебсиеллезных инфекций, вызванных штаммами-продуцентами карбапенемаз и бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС), составляет 6,5 % [57]. Высокий уровень смертности характерен для тяжелых внебольничных форм заболеваний – смертность от некротических фасциитов

составляет 47 % [64], от пневмоний, сопряженных с бактериемией – 55 % [117]. Клебсиеллезные инфекции часто приводят к осложнениям в виде потери конечностей, зрения или к неврологическим нарушениям [167].

В настоящее время *K. pneumoniae* является доминирующим в странах Азии патогеном, вызывающим первичные гнойные абсцессы печени – в Китае 76 % инфекций печени вызваны клебсиеллами [109]. Способность некоторых генетических линий *K. pneumoniae* к метастазированию из очага инфекции в другие органы и ткани приводит к осложнениям, таким как эндофтальмиты, описанные в Азии, Европе, Австралии, Африке, Северной Америке [60, 86, 108, 135, 142], абсцессы щитовидной железы, описанные в Южной Корее [108]. Довольно часто *K. pneumoniae* вызывают бессимптомные бактериоурии, а также циститы, пиелонефриты и абсцессы почек; отмечено, что клебсиеллы входит в пятерку основных возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП) [13, 61, 167]. Наиболее частым осложнением при клебсиеллезных ИМП является бактериемия, так на долю первичной клебсиеллезной бактериемии приходится до 23 % [167].

K. pneumoniae вызывают инфекции центральной нервной системы (ЦНС). Менингиты, вызванные клебсиеллами, подразделяют на три категории – метастатические менингиты (осложнение первичного гнойного абсцесса печени) [116], менингиты в виде осложнений после нейрохирургических операций на головном мозге и первичные менингиты (как правило, у лиц с ослабленным иммунитетом) [110]. Отмечено, что менингиты могут быть сопряжены с абсцессами мозга, субдуральными эмпиемами и эпидуральными абсцессами [167]. У лиц с ослабленным иммунитетом могут развиваться клебсиеллезные инфекции опорно-двигательного аппарата – описаны абсцессы подвздошно-поясничной мышцы, остеомиелиты, септические артриты и некротические фасцииты в Азии, Северной Америке и Европе [167, 108, 64, 122, 133, 129]. Наиболее редкими формами клебсиеллезных инфекций являются орбитальные целлюлиты, медиастиниты и абсцессы бартолиновой железы [82, 143, 167, 193].

Превалирование клебсиелл в госпитальной среде отмечают по всему миру. Так бактерии *K. pneumoniae* составили 26,0 % от всех патогенов педиатрического отделения в Индии в 2000-2015 гг., 57,6 % - от энтеробактериальных гемокультур, выделенных от пациентов в Эфиопии и 66,3 % - от энтеробактерий, выделенных в неонатальных отделениях Марокко [36, 75, 114]. В ходе исследования нозокомиальных патогенов

«МАРАФОН» 2011-2012 гг. было показано, что в Российской Федерации клебсиеллы вызывали около 50 % от всех энтеробактериальных инфекций, при этом бактерии семейства *Enterobacteriaceae* были наиболее частыми возбудителями внутрибольничных инфекций – от 30,1 % до 34, % в разные годы [23]. Высокая частота выделения клебсиелл (41 %) в педиатрическом отделении г. Москвы описана в исследовании Крыжановской [10].

Помимо заболеваний человека привлекают внимание исследователей клебсиеллезные инфекции животных: отмечены случаи септицемий, эндометритов, маститов и инфекций мочевыводящих путей, вызванных *K. pneumoniae*, у крупного рогатого скота, свиней, собак, лошадей и обезьян [13, 84, 127]. Описаны случаи выделения *K. pneumoniae* из коммерческих куриных яиц, а также гибели птенцов канареек от клебсиеллезной инфекции желточного мешка [79, 152]. Изоляты *K. pneumoniae*, несущие генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП), были выделены от диких птиц в Пакистане, Бразилии и на Аляске в США. Авторы исследований обращают внимание на риск распространения антибиотикорезистентных *K. pneumoniae* птицами [45, 72, 151].

Госпитальные *K. pneumoniae* обладают высоким уровнем антибиотикорезистентности. Например, в Китае 61,4 % клебсиелл характеризуются множественной лекарственной устойчивостью, 22,0 % - экстремальным уровнем лекарственной устойчивости и 1,8 % - устойчивы ко всем применяемым АБП [94]. Клебсиеллы включены в группу ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), вызывающих большинство внутрибольничных инфекций в мире [155].

Клинически значимой является проблема устойчивости современных клинических штаммов к широко применяемым бета-лактамам. Группа исследователей в Китае показала, что смертность пациентов от карбапенем-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* (42,1 %) в два раза выше смертности от инфекций, вызванных карбапенем-чувствительными штаммами (21,1 %) [190]. В разных регионах мира отмечены разные уровни чувствительности *K. pneumoniae* к АБП, например, к цефалоспорином устойчивы около 50 % клебсиелл в Европе [132], 64 % - в Южной Африке [183], 84 % - в Азии [106], в то время как для США характерно распространение

карбапенем-продуцирующих *K. pneumoniae* (устойчивы к карбапенемам 90-99 % штаммов), а доля устойчивых к цефалоспорином клебсиелл составляет около 10 % [120]. В России в 2004 г. было отмечено, что более 50 % нозокомиальных штаммов энтеробактерий устойчивы к цефалоспорином, в связи с широким распространением изолятов, продуцирующих БЛРС. В ходе исследования «МАРАФОН» в 2011-2012 гг. было показано, что более 90 % клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенные в 18 городах России, устойчивы к цефалоспорином III-IV поколений, 14,0 % - к карбапенемам, 14,1 % - к колистину, 15,9 % - к тигециклину и 17,8 % - к фосфомицину [23]. В исследованиях, проведенных в 2008 г. в Новосибирске, в 2010 г. в Иркутске, и в 2015 г. в Ростове-на-Дону, доля устойчивых к карбапенемам штаммов *K. pneumoniae* варьировала от 0 до 23 % [6, 9, 15], то есть в Российской Федерации отмечается рост устойчивости клебсиелл к карбапенемам [23].

В связи с увеличением числа заболеваний во всем мире и ростом смертности пациентов от инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми *K. pneumoniae*, данный возбудитель включен в список патогенов критического уровня (Priority 1: CRITICAL) «Всемирного перечня значимых антибиотикорезистентных бактерий» (Global priority list of antibiotic-resistant bacteria), разработанного Всемирной организацией здравоохранения (<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>) [57, 187].

1.3 Молекулярно-генетические механизмы множественной лекарственной устойчивости

K. pneumoniae

Выявленные на сегодняшний день механизмы устойчивости бактерий к АБП подразделяют на 5 основных групп: инактивация молекулы АБП (β -лактамазы, аминоглюкозид-модифицирующие белки, хлорамфениколацетилтрансферазы и др.); модификация мишени АБП (мутации в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* и др.); активное выведение АБП из микробной клетки (эффлюксные насосы *oqxA*, *oqxB* и др.); изменение проницаемости микробной клетки (модификация поринов OmpK35, OmpK36 и др.); активация метаболического шунта (приобретение генов *dhfR*) [21, 25, 163].

Существует два генетических механизма формирования антибиотикоустойчивости бактерий – *модификация* собственного генома бактериальной клетки с

помощью мутаций в генах, кодирующих мишени антибиотика, систем эффлюкса или генов пориновых белков, а также *приобретение* новых для бактерии детерминант устойчивости к АБП с мобильными генетическими элементами [21]. Резистом (совокупность генов, обеспечивающих устойчивость к АБП) *K. pneumoniae* может обеспечивать устойчивость бактериальных клеток к АБП основных функциональных классов, используемых при антибиотикотерапии [132].

1.3.1 Механизмы формирования устойчивости *K. pneumoniae* к бета-лактамам

Устойчивость *K. pneumoniae* к бета-лактамам формируется, главным образом, за счет продукции ферментов, расщепляющих бета-лактамно кольцо пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов и карбапенемов [102]. Существует две классификации бета-лактамаз: структурная и функциональная. По структуре бета-лактамазы подразделяют на сериновые (молекулярные классы А, С и D) и металло-бета-лактамазы (молекулярный класс В). По функциям среди бета-лактамаз выделяют: *функциональную группу 1* – хромосомные цефалоспорины со слабой ингибирующей активностью (например, кодируемые генами *ampC*-типа – MIR-1, BIL-1, MOX-1, FOX-1); *функциональную группу 2a* – пенициллиназы грамположительных бактерий (I, II, MJ-2, PC1 и др.); *функциональную группу 2b* – пенициллиназы широкого спектра (TEM-1, SHV-1 и др.); *функциональную группу 2be* – БЛРС (SHV-2, SHV-6, TEM-26, TEM-72, CTX-M-3, CTX-M-15 и др.); *функциональную группу 2br* – устойчивые к ингибиторам производные бета-лактамаз TEM- и SHV-типов (TEM-30, TEM-36 и др.); *функциональную группу 2c* – карбенициллиназы, гидролизующие в большей степени карбенициллин, чем бензилпенициллин (PSE-1, PSE-3 и др.); *функциональную группу 2e* – индуцибельные хромосомные цефуроксимазы (CepA, FUR, FPM-1 и др.); *функциональную группу 2f* – редкие карбапенемазы, чувствительные к клавуланату (Sme-1, NMC-A и др.); *функциональную группу 2d* – оксациллиназы, слабо подавляющиеся ингибиторами (OXA-1, OXA-9, OXA-10 и др) [50].

Согласно опубликованным данным, для разных стран характерны разные типы БЛ, преобладающие у клебсиелл. Так, гены *bla_{SHV}*-типа были выявлены у 75-100 % штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Китае и Южной Африке [188, 183], у 15 % – в США [161], у 2 % – в Болгарии [123]. Высокая частота встречаемости генов

*bla*_{СТХ-М}-типов характерна для Болгарии и Малайзии: у 87 % и 91 % штаммов клебсиелл, соответственно [123, 33], в то время как в США гены *bla*_{СТХ-М} выявлены у 28 % штаммов *K. pneumoniae* [161]. В США у *K. pneumoniae* с высокой частотой выявляют карбапенемазы КРС-типа - более 55 % устойчивых к карбапенемам клебсиелл несли гены *bla*_{КРС-2}, *bla*_{КРС-3} и *bla*_{КРС-4} [59]. В Италии при анализе полных геномов антибиотикорезистентных клинических штаммов исследователи с наибольшей частотой выявляли гены *bla*_{КРС}- и *bla*_{SHV}-типов (98 %), а также *bla*_{ТЕМ} (81 %) и значительно реже - *bla*_{СТХ-М} (4 %) и *bla*_{ОХА}-типов (3 %) [157]. В Турции в 2017 г. у устойчивых к карбапенемам штаммов *K. pneumoniae* были выявлены гены карбапенемаз преимущественно *bla*_{ОХА-48} (у 73 % штаммов), а также *bla*_{NDM} (у 24 %) и *bla*_{VIM} (у 3 %) [69].

Особый вклад в устойчивость грамотрицательных бактерий к АБП вносит фермент NDM (New Delhi Metallo- β -lactamase), гидролизующий практически все применяемые бета-лактаманые антибиотики, кроме монобактамов. Более 58 % NDM-1 продуцирующих штаммов описаны в Китае и Индии, 17 % - в Европе, с максимальными показателями в отдельных странах (Болгария, Польша, Италия, Франция, Турция, Германия, Греция и др.), 11 % - в странах Северной и Южной Америки, 11 % - в Африке и 2 % - в Новой Зеландии [107].

В России при исследовании антибиотикорезистентных клинических штаммов в рамках многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН отмечено, что более 90 % *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС, в том числе ОХА-48 и NDM-1 [23]. Примечательно, что для Московского региона среди нечувствительных к карбапенемам клинических *K. pneumoniae* отмечено преобладание ОХА-48-like продуцирующих штаммов (68 %) [10], а для Санкт-Петербурга - региональное распространение NDM-1-продуцирующих изолятов *K. pneumoniae* при меньшей представленности ОХА-48- и КРС- продуцирующих штаммов [30, 43].

1.3.2 Устойчивость к аминогликозидам

Аминогликозиды широко применялись в практике здравоохранения до 1980-х гг., пока их не заменили цефалоспорины III поколения. В результате селективного давления аминогликозидов госпитальные штаммы *K. pneumoniae* приобрели устойчивость к

данному классу АБП, механизмами которой является (1) наличие аминогликозид-модифицирующих ферментов путем ацетилирования (Aac), аденилирования (Aad) или фосфорилирования (Aph) молекул антибиотиков; (2) модификация мишени действия аминогликозидов, 16S рРНК, ферментом 16S рРНК-метиلاзой, кодируемой плазмидным геном *armA*; (3) активация эффлюксных насосов AcrAB-TolC и KpnEF и утрата порина KpnO, кодируемых хромосомными генами [132].

1.3.3 Устойчивость к хинолонам

Широкое применение хинолонов при лечении бактериальных инфекций, начавшееся с 1960-х гг., привело к формированию резистентности бактерий к данному классу препаратов в 1980-х гг. Резистом *K. pneumoniae* включает в себя весь перечень известных механизмов устойчивости к хинолонам у грамотрицательных бактерий: (1) мутации в хромосомных генах (*gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*), кодирующих мишени хинолонов ДНК-гиразу и топоизомеразу IV; (2) активация эффлюксных насосов, кодируемых хромосомными генами (*acrAB* и *OqxAB*); (3) модификация молекул лекарства ферментом, обеспечивающим резистентность как к аминогликозидам (тобрамицин, амикацин и канамицин), так и к фторхинолонам (ципрофлоксацин, норфлоксацин), кодируемым плазмидным геном *aac(6')-Ib-cr*, который в некоторых штаммах стабилизировался в хромосоме; (4) экспрессия генов *qnr*, кодирующих белки QnrA, QnrB, QnrS экранирующие комплекс ДНК с ДНК-гиразой и топоизомеразой IV [132]. Часто гены устойчивости к хинолонам локализованы на плазидах, несущих гены БЛРС. Например, описанный в 2013 г. в Мексике ген *qnrB* располагался на плазмиде с цефалоспоринозой *bla_{CTX-M-15}* [169], а также распространены плазмиды, несущие *aac(6')-Ib-cr* и *bla_{CTX-M-15}*, чаще всего представленные у изолятов сиквенс-типов ST11, ST15, ST147 [41].

1.3.4 Устойчивость к полимиксинам

В настоящее время полимиксины – полимиксин В, колистин – (наряду с тигециклином) рассматриваются в качестве препаратов резерва при лечении инфекций, вызванных МЛУ патогенами. Резистентные к колистину штаммы *K. pneumoniae* были

описаны в разных регионах мира, включая Европу, Северную и Южную Америки, Азию и Южную Африку. Наибольшее распространение резистентных штаммов отмечено в Греции (10,5-20,0 % штаммов), Южной Корее (6,8 % штаммов), Сингапуре (6,3 %) и Канаде (2,9 %) [32]. Основным механизмом резистентности к полимиксинам является модификация мишени (внутренней мембраны бактериальной клетки), которая препятствует связыванию с ней молекул полимиксинов путем модификации липида А за счет мутаций в генах *lpxM*, *ramA*, *pbgP*, *pmrE*, *pmrC* и *pagP*, а также в регуляторном гене *mgrB* сигнальной системы PhoP/PhoQ, и за счет активации оперона *pmrHFIJKLM*, контролируемого PmrA, что приводит к модификации ЛПС [32]. Другой вариант формирования резистентности – продукция капсулы, которая может скрывать сайты связывания антибиотика на внешней мембране, а также – активация эффлюксных насосов AcrAB-TolC и KpnEF.

Недавно был описан новый механизм устойчивости к полимиксинам у энтеробактерий, связанный с наличием плазмидного гена *mcr-1*, кодирующего фермент фосфоэтаноламинтрансферазу, модифицирующую липид А [119]. Этот молекулярный механизм обеспечивает высокий уровень устойчивости к колистину (3-32 мг/л) и оценивается как эпидемически опасный, поскольку быстро распространился по всему миру, что объясняется локализацией гена *mcr-1* на транспозонах в составе плазмид разных групп несовместимости, среди штаммов разных генетических линий, выделенных как от человека, так и от сельскохозяйственных животных [97].

1.3.5 Устойчивость к тетрациклинам

Устойчивость к тетрациклинам у *K. pneumoniae* обеспечивается гиперэкспрессией эффлюксных насосов AcrAB-TolC, OqxAB и KpgABC, утратой поринов OmpK35, а также экспрессией генов оперона *tet* [132]. Тигециклин – препарат нового поколения тетрациклинов, первый применяемый на практике глицилциклин, используемый для лечения клебсиеллезных инфекций с 2005 г., который (наряду с полимиксинами) зачастую является последним рубежом антибиотикотерапии инфекций, вызванных экстремально резистентными штаммами. В 2016 г. появились сообщения о клинических изолятах *K. pneumoniae*, обладающих высоким уровнем резистентности к данному препарату. Молекулярные механизмы, формирующие такую устойчивость, включают в

себя не только экспрессию эффлюксных насосов, уменьшение проницаемости клетки, но также модификацию 30S и 16S субъединиц рибосомы [137].

1.3.6 Роль мажорных пориновых белков клебсиелл в формировании антибиотикорезистентности

Экспрессия мажорных пориновых белков *K. pneumoniae* OmpK35 и OmpK36 у МЛУ штаммов, включая БЛРС- и карбапенем-продуцирующие, часто снижена или отсутствует [166]. Вероятно, утрата поринов приводит к уменьшению каналов, по которым молекулы антибиотика попадает внутрь клетки. Показано, что с восстановлением пориновых структур у карбапенем-продуцирующих клебсиелл происходило увеличение чувствительности к антибиотикам, а делеция гена порина *ompK36* у гипервирулентного штамма *K. pneumoniae* приводила к снижению его чувствительности к АБП. Одновременные делеции в генах двух поринов *ompK35* и *ompK36* приводили к большей резистентности бактерий, чем делеция только в одном гене *ompK36* [184]. В литературе описаны случаи инактивации генов пориновых белков за счет встраивания в них IS-элементов: IS26, IS5, IS903 и IS1 [95].

1.3.7 Вклад IS элементов в формирование антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*

Инсерционные последовательности (IS-элементы) – небольшие мобильные генетические элементы размером около 2 т.п.н., несущие ген транспозазы. IS-элементы при встраивании могут нарушать структуру гена или изменять его экспрессию [29], а также обеспечивают мобилизацию генов резистентности, например, ген карбапенемазы *bla_{KPC}* расположен между IS *Kpn7* и IS *Kpn6* на транспозоне Tn 4401a [130].

Adams et al. анализировали более 800 полных геномов *K. pneumoniae*, представленных в международной базе данных GenBank, и показали наличие хотя бы одного IS-элемента в геномах у 94 % изолятов. Тринадцать типов IS-элементов были детектированы в геномах более 100 изолятов. Интересно, что некоторые IS-элементы ассоциированы с определенными генетическими линиями, например, IS *Kpn18* - в геномах штаммов сиквенс-типа ST258, а другие - наоборот, во многих генетических линиях, например, IS *Kpn1* представлен более чем в 583 геномах, принадлежащих к

разным сиквенс-типам. Также Adams et al. выявили три группы IS-элементов по типу сайтов встраивания: (1) шесть IS-элементов (IS 1294, IS 26, IS *Ecp1B*, IS *Kpn1*, IS *Kpn18* и IS *Kpn19*) встраивались внутри генов в более 70 % случаев; (2) девять IS-элементов (IS 1F, IS 6100, IS *Kpn1*, IS *Kpn6*, IS *Kpn7*, IS *Kpn8*, IS *Kpn24*, IS *Kpn25*, IS *Kpn28*) в более 70 % случаев локализовались в межгенных последовательностях; (3) три IS-элемента (IS5, *SKpn14* и *ISKpn21*) в 46-50 % выявлялись как внутри гена, так и вне генной последовательности [29].

1.3.8 Вклад плазмид *K. pneumoniae* в формирование антибиотикорезистентности и вирулентности

Плазмиды, вместе с другими мобильными генетическими элементами, участвуют в распространении генов антибиотикорезистентности и вирулентности. Штаммы *K. pneumoniae* часто содержат более одной плазмиды в геноме, включая низкомолекулярные многокопийные и высокомолекулярные малокопийные. Так, МЛУ штамм *K. pneumoniae* HS11286, выделенный из человеческой мокроты, имел 6 плазмид разных размеров: 1,3; 3,4; 3,8; 106,0; 111,2 и 122,8 т.п.н. [117].

Большая группа плазмид, детектируемая у *K. pneumoniae*, характеризовалась небольшим размером (от 2 до 25 т.п.н.) и гомологией в области репликативного региона (принадлежали к одной группе несовместимости), их репликация проходила по механизму ColE1-типа. Низкомолекулярные плазмиды содержали генетические детерминанты устойчивости к АБП, гены бактериоцинов и гены системы рестрикции-модификации. Например, плазида рJНСМW1 размером 11,354 т.п.н. содержала гены: *aac(6')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *bla_{OXA-9}* и *bla_{TEM-1}*; другая плазида размером 7,6 т.п.н. несла ген карбапенемазы *bla_{OXA-181}* [147, 156, 164, 197]. Такие плазмиды способны реплицироваться и стабильно поддерживаться у разных видов грамнегативных бактерий [149]. Тем не менее, низкомолекулярные плазмиды вносят меньший вклад, чем высокомолекулярные, в распространение генов антибиотикорезистентности по ряду причин: гены могут располагаться за пределами генетических кассет или мобильных генетических элементов, что снижает частоту их распространения на молекулярном уровне; и, главное, низкомолекулярные плазмиды зачастую являются неконъюгативными. Неконъюгативные низкомолекулярные плазмиды могут быть

мобилизованы за счет формирования коинтеграта с крупной конъюгативной плазмидой. Так, была описана плазида рЕ66Ап [113], состоящая из ~73 т.п.н. крупной конъюгативной плазмиды и небольшой неконъюгативной плазмиды *K. pneumoniae* рР843, которая несла ген БЛРС *bla*_{СТХ-М-17} [52]. Формирование коинтеграта привело к активному распространению гена *bla*_{СТХ-М-17} [113].

Высокомолекулярные плазмиды принадлежат к различным группам несовместимости, несут генетические детерминанты устойчивости к АБП: например, 50 т.п.н.-плазида несла гена *bla*_{NDM-1} [107]; 120,9 т.п.н.-плазида, принадлежащая к гибридной группе несовместимости IncFII/IncR, несла ген *bla*_{КРС-2} [31]; 60-79 т.п.н.-плазмиды группы несовместимости IncL/M несли ген *bla*_{ОХА-48} [124, 147;]; 209,7 т.п.н.-плазида несла ген *bla*_{VIM} [124]; 66,0 т.п.н.-плазида группы несовместимости IncFIB несла гены *bla*_{ТЕМ-1В}, и *bla*_{СТХ-М-15} [124].

На высокомолекулярных плазмидах *K. pneumoniae* локализованы также генетические детерминанты вирулентности. Впервые вирулентный фенотип *K. pneumoniae* был ассоциирован с наличием крупной плазмиды рКР100 размером 180,0 т.п.н., которая несла кластер генов аэробаكتинов (*aer*) и гены гипермукоидного фенотипа (*rmpA* и *rmpA2*). Также с вирулентностью *K. pneumoniae* ассоциирована плазида рLVPK размером 219,0 т.п.н., несущая гены гипермукоидного фенотипа (*rmpA* и *rmpA2*) и гены нескольких систем утилизации железа (кластеры генов сидерофоров *iucABCDiutA* и *iroBCDN* и кластер генов транспортной системы ионов железа ABC-типа) [63].

Многие плазмиды резистентности энтеробактерий способны реплицироваться и стабильно существовать в бактериях разных видов, благодаря чему происходит горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности [149]. Описаны факты широкого межвидового распространения генов карбапенемаз *bla*_{КРС}-типа в бактериях семейства *Enterobacteriaceae*, включая виды *Salmonella* sp., *Enterobacter* sp., *E. coli* и *Proteus mirabilis* [132].

1.4 Факторы вирулентности *K. pneumoniae*

Клебсиеллы используют различные стратегии по выживанию и защиты от иммунного ответа хозяина. На сегодняшний день наиболее изучены четыре основные

группы факторов вирулентности *K. pneumoniae*: капсула, липополисахарид (ЛПС), системы утилизации ионов трехвалентного железа и фимбрии [139, 167]. Менее изученными факторами, ассоциированными с вирулентностью *K. pneumoniae*, являются белки наружной мембраны (порины), эффлюксные насосы и система утилизации аллантаина [67, 139].

1.4.1 Капсула *K. pneumoniae*

Капсула – полисахаридный матрикс, покрывающий бактериальную клетку. Наличие толстого слизистого слоя капсулы защищает бактерию от систем защиты макроорганизма - опсонизации, фагоцитоза, связывания и интернализации макрофагами, нейтрофилами, клетками эпителия и дендритными клетками [68, 70, 83, 158, 162]. В настоящий момент в научной литературе описано более 78 капсульных серотипов у *K. pneumoniae*, а в международной базе данных MLST PASTEUR представлено 113 серотипов клебсиелл (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) [115].

Важность капсулы для проявления вирулентности клебсиеллами подтверждается тем, что бескапсульные штаммы *K. pneumoniae* обладают сниженной степенью вирулентности по сравнению с изогенными капсульными вариантами, а также тем, что доказана ассоциация между наличием гипермукоидного фенотипа изолята и тяжестью вызываемых им инфекций (бактериемии, первичные гнойные печеночные абсцессы, эндофтальмиты, менингиты, абсцессы головного мозга и др.) [64, 115, 118, 139]. Однако, стоит отметить, что наличие гипермукоидного фенотипа штамма не всегда обеспечивает его высокую степень вирулентности: описаны редкие случаи тяжелой формы клебсиеллезной инфекции, вызванные негипермукоидными штаммами [56, 110].

Гипермукоидный фенотип у *K. pneumoniae* зачастую ассоциирован с принадлежностью штаммов к определенным серотипам: K1, K2, K5, K20, K54 и K57. При этом, в разных исследованиях 47-81 % гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* имели серотипы K1 или K2 [167].

Генетическими факторами, определяющими проявление гипермукоидности, являются гены регуляторов гипермукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2*. В 1989 г. Nassif et al. было показано, что гены, регулирующие проявление гипермукоидного фенотипа, располагаются на высокомолекулярной плазмиде [131], но в поздних исследованиях

было показано, что в штаммах могут быть представлены как плазмидный ген *tmpA*, так и хромосомные гены *tmpA* и *tmpA2*. Чаще всего у штаммов присутствовали только плазмидные гены *tmpA* и *tmpA2*, реже – все три гена, а также только плазмидный ген *tmpA* или только хромосомный *tmpA* [97].

Гены, участвующие в синтезе капсулы как КЛ, так и ГПВ клебсиелл, локализованы в хромосомной опероне *cps* [168]. По данным Follador et al. размер нуклеотидной последовательности всего кластера *cps* у разных штаммов *K. pneumoniae* может варьировать от 20,5 до 21,6 т.п.н. [89]. Показано, что у всех штаммов *K. pneumoniae* кластер *cps* начинался с гена фосфорилазы УДФ-глюкозы (*galF*) и гена предполагаемой глюкозофосфотазы (*cpsACP*), далее располагались гены транслокации и поверхностной сборки (*wzi*, *wza*, *wzb* и *wzc*). Гены, вовлеченные в транспорт веществ в периплазму и полимеризацию (*wzu* и *wzx*), сборку ундекапренил пирофосфата (*wbaP* или *wcaJ*), и ген б-фосфоглюконатдегидрогеназы (*gnd*) локализовались у разных штаммов в разных положениях. Кластер *cps* *K. pneumoniae* заканчивался геном УДФ-глюкозо-б-дегидрогеназы (*ugd*) [89]. Различия в капсульных типах определяются различиями в наборах и активности генов гликозилтрансферазы (*wbaP*, *wbaZ*, *wcaN*, *wcaJ* и *wcaO*) [139].

Разработаны способы К-типирования штаммов *K. pneumoniae* с использованием ПЦР, основанные на гетерогенности локусов *wzu* и *wzx*, специфичных для К-типов К1, К2, К5, К20, К54 и К57 [85]. Также распространено К-типирование клебсиелл с использованием секвенирования нуклеотидных последовательностей гена *wzi*, аллели которого строго ассоциированы с капсульными типами штаммов [49]. Ген *wzi* кодирует белок лектин, ответственный за прикрепление капсулы к внешней мембране клетки, потеря лектина приводит к «потере» капсулы клетками бактерий и снижению вирулентности штамма [51].

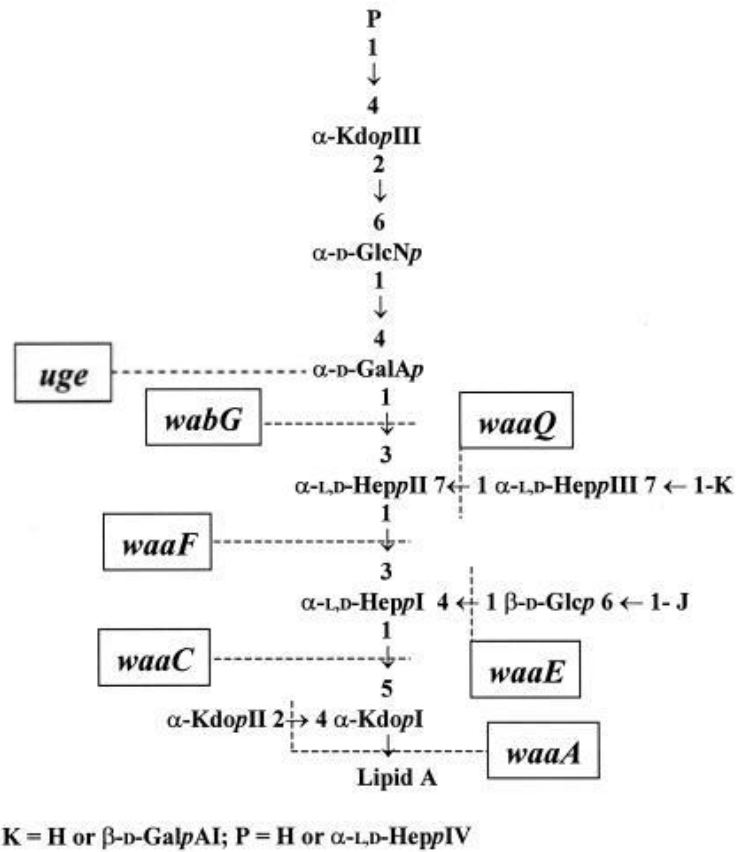
1.4.2 Липополисахарид *K. pneumoniae*

Липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин - необходимый компонент внешнего слоя клеточной мембраны грамотрицательных бактерий. ЛПС *K. pneumoniae* состоит из гидрофобной части – липида А, к которому через олигосахарид (кор) присоединяется полисахаридная цепь – О-антиген. Такая структура ЛПС («гладкий ЛПС» или S-форма)

соответствует S-форме колоний. Шероховатые колонии (R-форма) характерны для бактериальных клеток, продуцирующих ЛПС без полисахаридной цепи или с укороченными полисахаридными цепями [7, 8, 139]. Для *K. pneumoniae* описаны 9 типов О-антигенов, из которых наиболее часто встречается О1 [139]. ЛПС – основная защита от системы комплемента: штаммы с «гладким ЛПС» устойчивы к действию комплемента, в то время как штаммы с «шероховатым ЛПС» подвержены его действию даже при наличии капсулы [126].

Липид А *K. pneumoniae* является мощным активатором воспалительной реакции макроорганизма, образует лиганд с толл-подобным рецептором TLR4, что приводит к образованию цитокинов и хемокинов, стимулирующих клеточный иммунный ответ [46]. Отмечено, что клетки *K. pneumoniae* способны частично экранировать ЛПС капсулой от толл-подобных рецепторов. Предполагается, что штаммы с капсульными серотипами K1, K10 и K16 способны «маскировать» ЛПС, в то время как штаммы серотипа K2 – нет [126]. Аналогичная «маскировка» ЛПС может осуществляться с помощью гипермукоидного фенотипа. Кроме того, «ускользание» клеток *K. pneumoniae* от иммунитета макроорганизма может быть достигнуто за счет изменения структуры липида А [139].

Вклад ЛПС в формирование вирулентных свойств *K. pneumoniae* показан при изучении генов *wabG* (кодирует фермент глюкозилтрансферазу) и *ige* (кодирующим уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпипазу) (рисунок 1.1). Мутанты, лишенные гена *wabG*, продуцирующие капсульный полисахарид, но не прикрепляющие его к поверхности клетки, были авирулентными для лабораторных животных в разных инфекционных моделях [101]. Штаммы *K. pneumoniae* с инактивированным геном *ige* не продуцировали капсулу, не содержали олигосахарид внешнего кора и О-антиген, были авирулентными для лабораторных животных; восстановление гена *ige* приводило к восстановлению вирулентности штамма [153].



Kdop, 3-deoxy-d-manno-octulopyranosonic acid; Glcp, d-glucopyranose; GlcNp, glucosamine; GalAp, galacturonic acid. Depending on the *K. pneumoniae* strain, residues J and K could be H or GalA, and residue P could be H or Hep

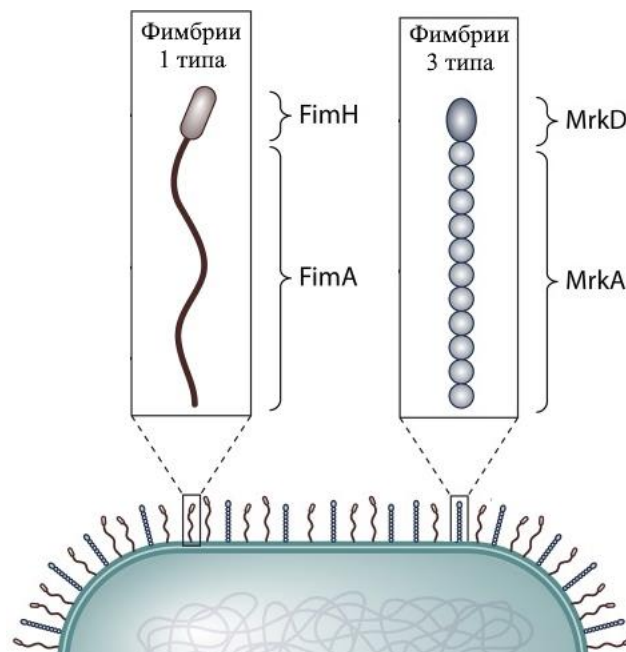
Рисунок 1.1 – Консервативный регион кора ЛПС *K. pneumoniae* и гены, вовлеченные в процессы его биосинтеза (по Izquierdo et al., 2003 и Regué et al., 2004, с модификацией)

1.4.3 Роль фимбрий 1 и 3 типов в формировании вирулентности *K. pneumoniae*

Фимбрии 1 и 3 типов *K. pneumoniae* – адгезивные структуры, значимые для проявления патогенности. Фимбрии 1 типа – филаменты, связанные с мембраной клетки (рисунок 1.2). Они представлены у 90 % штаммов *K. pneumoniae*, как у КЛ, так и у ГПВ вариантов. Фимбрии 1 типа связывают 1 d-маннозилированный гликопротеин, в связи с чем является «маннозо-чувствительными». Фимбрии 1 играют ключевую роль в адгезии *K. pneumoniae* на клетках мочевого пузыря, а также в формировании биопленок в мочевом пузыре и на абиотических поверхностях [173].

Показано, что кластер генов *fim* гомологичен таковому у *E. coli* [172]. Ген *fimA* кодирует субъединицу FimA, представляющую большую часть фимбрии, ген

fimH - адгезивную субъединицу FimH. Дополнительно в кластере находятся гены *fimF* и *fimG*, кодирующие минорные структурные субъединицы, ген *fimC*, кодирующий шаперон фимбрий, ген *fimD*, кодирующий трансмембранный транспортный белок, и ген *fimI*, кодирующий белок, необходимый для укладки белков фимбрий 1 типа. Кластер генов фимбрий 1 типа *K. pneumoniae* отличается от такового у *E. coli* наличием гена *fimK*, функции которого не изучены, но при утере *fimK* у штамма *K. pneumoniae* отсутствуют фимбрии [159].



FimH, FimA – субъединицы фимбрий 1 типа, MrkD, MrkA - субъединицы фимбрий 3 типа

Рисунок 1.2 – Строение фимбрий 1 и 3 типов *K. pneumoniae*
(по данным Raczosa et al., 2016, с модификацией)

Фимбрии 3 типа, присутствующие практически у всех штаммов *K. pneumoniae*, – спиралевидные адгезивные структуры на поверхности бактериальной клетки, которые необходимы для формирования бактериальных биопленок [139]. Фимбрии 3 типа кодирует кластер генов *mrkABCD*, они состоят из структурных субъединиц MrkA и субъединицы адгезии MrkD на вершине (рисунок 1.2). Белки MrkB, MrkC, и MrkE участвуют в сборке и регуляции экспрессии фимбрий 3 типа, MrkF отвечает за стабильность фимбрий на поверхности клетки. В отличие от фимбрий 1 типа, пили 3 типа не связывают маннозу и являются «маннозо-нечувствительными», но способны связывать белки внеклеточного матрикса, такие как коллагены типа IV и V [139].

1.4.4 Системы утилизации ионов железа

Железо является ограниченным ресурсом, который требуется для клеток *K. pneumoniae* во время инфекционного процесса. Как правило, в теле организма-хозяина ионы железа связаны с транспортными белками, такими как трансферрин или лактоферрин, в связи с чем клеткам *K. pneumoniae* необходимы механизмы получения ионов железа из макроорганизма для успешного выживания и распространения. Для приобретения ионов железа клетки *K. pneumoniae* секретируют сидерофоры, молекулы, обладающие большей аффинностью к железу, чем белки хозяина [14]. Штаммы *K. pneumoniae* продуцируют несколько типов сидерофоров, различных по вкладу в формирование вирулентности: энтеробактин, йерсиниобактин, сальмохелин и аэробактин.

Экспрессия энтеробактина широко представлена как у КЛ, так и у ГПВ штаммов *K. pneumoniae* и способствует колонизации легких и диссеминации патогена в другие органы. Несмотря на активную экспрессию энтеробактина клетками *K. pneumoniae* во время инфекционного процесса, он ингибируется мультифункциональным белком организма-хозяина липокалином-2. Если клетки клебсиелл не продуцируют других сидерофоров, то они элиминируются из макроорганизма. Гены синтеза энтеробактина локализованы на хромосоме в кластере *entABCDEF* [139].

Сальмохелин – это с-глюкозилированная форма энтеробактина. Модификация энтеробактина происходит под действием активности продукта гена *iroA* кластера *iroBCDE*, расположенного в хромосоме или на плазмиде. Транспортировка железа в бактериальную клетку обеспечивается белком IroN. Показана связь между экспрессией сальмохелина клетками *K. pneumoniae* и их способностью колонизировать слизистую носоглотки [39]. Гены сальмохелина редко (2-4 % штаммов) присутствовали в геномах внутрибольничных штаммов *K. pneumoniae*, но более часто (90 % штаммов) – в геномах гипервирулентных клебсиелл, ассоциированных с первичными гнойными абсцессами печени [40, 139].

Йерсиниобактин первоначально был описан как значимый фактор вирулентности у бактерий рода *Yersinia*, но позже был выявлен у других бактерий, в том числе и у *K. pneumoniae* [38]. Данный вид сидерофоров в меньшей степени представлен у КЛ клебсиелл (18 % штаммов), чем у ГПВ (90 % штаммов) [139]. Йерсиниобактин

гиперпродуцируется штаммами во время инфекционного процесса в дыхательной системе, и его активность не подавляется липокалином-2, кроме ранних этапов инфекции [40].

Аэробактрин экспрессируется у КЛ штаммов достаточно редко (6 % штаммов), значительно чаще (93-100 % штаммов) – у ГПВ [195]. Наличие аэробактина часто связано с гипермукоидным фенотипом, в связи с тем, что ген транспортера аэробактина *iutA* находится на одной плазмиде с геном регулятора гипермукоидного фенотипа *rtxA*.

Система поглощения железа *Kfu* представляет собой ABC-систему утилизации железа, гены которой расположены на хромосоме и кодируют периплазматический белок, связывающий Fe^{3+} (*kfuA*); пермеазу системы транспорта Fe^{3+} (*kfuB*) и АТФ-зависимый транспортный белок (*kfuC*) [121]. Показана высокая степень ассоциации экспрессии ABC-транспортной системы ионов железа с проявлением высокой вирулентности *K. pneumoniae* – делеция *kfu*-региона приводила к полной потере вирулентности штамма для мышей. Наиболее часто штаммы *K. pneumoniae* с ABC-системой утилизации железа выделяли от пациентов с инвазивными инфекциями [121, 139]. На мышинной модели показано, что наличие *kfu*-региона ассоциировано с формированием в инфицированном организме животных абсцессов печени и головного мозга [85, 121].

1.4.5 Метаболизм аллантаина

Усвоение аллантаина бактериями обеспечивает их углеродом и азотом в анаэробных условиях, характерных для инфицированных тканей. Аллантаин-утилизирующая способность клебсиелл обеспечивает им конкурентное преимущество при получении источника азота [67].

Оперон, содержащий гены утилизации аллантаина, расположен на 22 т.п.н. участке хромосомы *K. pneumoniae* (рисунок 1.3).

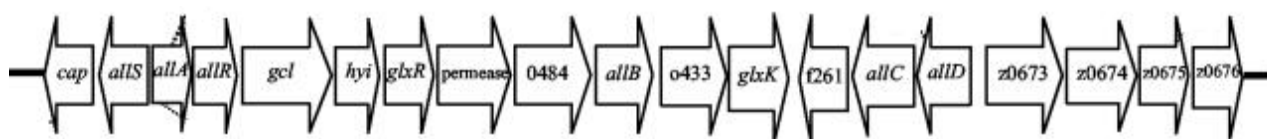


Рисунок 1.3 – Схема структуры 22 т.п.н. региона утилизации аллантаина

(по Chou et al., 2004)

Делеция гена регулятора аллантаинового регулона *allS* приводила к значительному снижению показателя LD₅₀ на мышинной модели [67]. Исследование Yu et al. показало наличие гена *allS* в 100 % гипервирулентных штаммов в Тайване и 0 % в штаммах с капсульными не K1, выделенных из крови и печени пациентов [195].

1.5 Эволюция *K. pneumoniae*: классические и гипервирулентные эволюционные ветви

K. pneumoniae ассоциированы с высоким уровнем заболеваемости и смертности в связи с резким увеличением числа тяжелых форм инфекций и нехватки эффективных методов лечения [145]. Это связано с приобретением клебсиеллами дополнительных генетических детерминант вирулентности или устойчивости к АБП. Исследователи выделяют две эволюционные ветви клебсиелл: гипервирулентные (ГПВ) и антибиотикорезистентные, классические (КЛ) (таблица 1.2) [139].

Таблица 1.2 – Сравнительная характеристика классических и гипервирулентных *K. pneumoniae* по Paczosa et al., 2016, Shon et al., 2013, Zhao et al., 2016

| Характеристика | Классические клебсиеллы | Гипервирулентные клебсиеллы |
|--|---|---|
| Основной тип инфекции | Пневмония, инфекции урогенитального тракта, бактериемии | Первичный гнойный абсцесс печени, бактериемии, абсцессы в легких и почках, пневмония, некротические фасцииты, миозиты, менингиты, эндофтальмиты |
| Группы риска | Лица с ослабленным иммунитетом | Лица с ослабленным иммунитетом и здоровые люди |
| Гипермукоидный фенотип штамма | нет | да |
| Способность к метастазированию | нет | до 80 % случаев (легкие, плевра, почки, простата, кости, суставы, мышцы/фасции, селезенка, мягкие ткани, кожа, глаза, ЦНС) |
| Капсульные типы | K1-K78 | преимущественно K1 и K2, реже - K5, K20, K54 K57 |
| География распространения | Во всем мире | с 1980-х гг. – Азиатско-тихоокеанский регион; с 2000-х гг. Северная и Южная Америки, Европа, Ближний Восток, Южная Африка, Австралия. |
| Распространенные генетические линии (клональные комплексы) | СС11 (или СС258), СС15 и СС14 | СС23, СС65 и СС86 |
| Тип инфекций | Внутрибольничные инфекции | Внутри- и внебольничные инфекции |
| Устойчивость к АБП | ЛУ, МЛУ, ЭЛУ, ПЛУ | ЛУ |

Примечание: СС – клональный комплекс; ЛУ – лекарственная устойчивость, МЛУ – множественная лекарственная устойчивость, ЭЛУ – экстремальная лекарственная устойчивость; ПЛУ – полная лекарственная устойчивость

До эры антибиотиков *K. pneumoniae* была основной причиной пневмоний, особенно у алкоголиков и пациентов с диабетом. Большая часть клебсиеллезных инфекций была внутрибольничной и часто ассоциировалась с больничным уходом. Особое внимание исследователей и клиницистов КЛ *K. pneumoniae* стали привлекать из-за их способности активно приобретать генетические детерминанты устойчивости к АБП, что значительно осложняло лечение [139, 167]. Появление ГПВ *K. pneumoniae* было зафиксировано в середине 1980-х гг. в Азиатско-Тихоокеанском регионе. Такие штаммы вызывали инфекции не только у иммуносупрессированных лиц, но и у здоровых молодых людей. Часто с ГПВ клебсиеллами ассоциирован уникальный клинический синдром – первичный гнойный абсцесс печени, а также метастатическое распространение инфекции в удаленные от первичного очага ткани и органы, приводящее к разнообразным осложнениям – эндофтальмитам, менингитам, фасциитам и др. [108, 116, 129, 185]. Появление ГПВ *K. pneumoniae* за пределами Азиатско-Тихоокеанского региона начали отмечать после 2000 г. [73, 77, 80, 88, 105, 170, 184].

Исследователи выявили ряд признаков, ассоциированных с вирулентностью клебсиелл; отмечено, что их представленность у КЛ и ГПВ штаммов различна. Например, КЛ *K. pneumoniae* могут характеризоваться любым капсульным серотипом, а ГПВ штаммы, чаще всего, – капсульными типами К1, К2, К5, К20, К54 и К57. Как КЛ, так и ГПВ *K. pneumoniae*, способны продуцировать адгезивные структуры – фимбрии 1 и 3 типов, а также сидерофоры. Практически у всех штаммов был выявлен энтеробактин, в половине КЛ и почти у всех ГПВ клебсиелл – йерсиниебактин (таблица 1.2, рисунок 1.4).

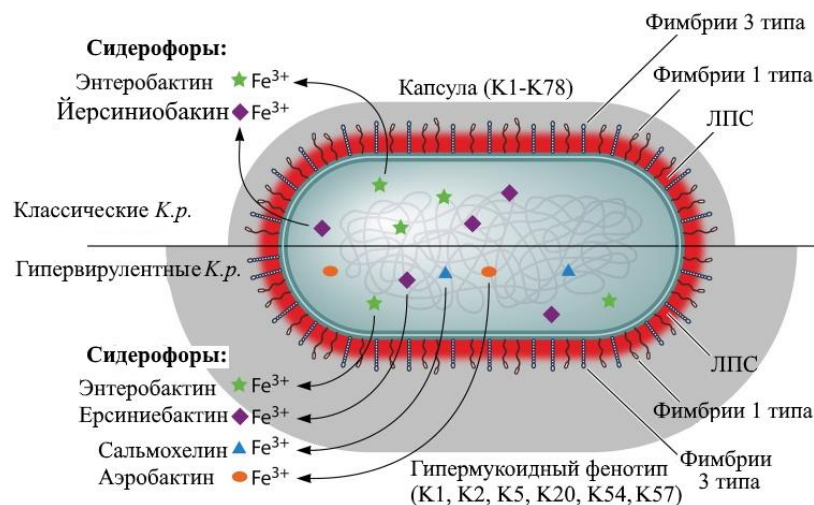


Рисунок 1.4 – Сравнение факторов вирулентности классических и гипервирулентных

K. pneumoniae, по Paczosa et al., 2016

1.5.1 Генетические линии *K. pneumoniae*: сиквенс-типы и клональные комплексы

Мультилокусное секвенирование-типирование (Multilocus sequencing typing, MLST), основанное на секвенировании нуклеотидных последовательностей 7 генов (локусов) *K. pneumoniae*: *rpoB*, гена бета-субъединицы РНК-полимеразы В; *gapA*, гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы; *mdh*, гена малатдегидрогеназы; *pgi*, гена фосфоглюкозоизомеразы; *phoE*, гена фосфопорина Е; *infB*, гена фактора инициации трансляции 2; *tonB*, гена энергетического периплазматического трансдучера, позволяет по аллельному профилю изолята определить номер его сиквенс-типа (ST). С помощью алгоритма eBURST идентифицируют клональные комплексы (CC), объединяющие близкородственные ST [76, 87].

MLST *K. pneumoniae* позволяет выявить эпидемические генетические линии патогена, их распространенность в мире и оценить вклад разных генетических линий в распространение генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности. Например, с ГПВ эволюционной ветвью ассоциированы изоляты *K. pneumoniae* широко распространенного в мире клонального комплекса CC23 (сиквенс-типы ST23 и ST218). Высокая степень вирулентности для человека и лабораторных животных отмечена для клебсиелл сиквенс-типов ST86 и ST65 [167, 172, 186, 191, 200]. Широким спектром устойчивости к АБП обладают *K. pneumoniae* других генетических линий: CC258, CC11, CC15 и CC14 [98]. В исследовании 2013 г. в Китае среди изолятов, выделенных в 306 госпиталях, преобладали *K. pneumoniae* ST15, к которым относились пан-резистентные штаммы, вызвавшие у пациентов легочные инфекции, дисфункции почек и сердечную недостаточность. Отмечено, что *K. pneumoniae* ST15 широко распространены в Дании, Венгрии, Корее, Малайзии, Сингапуре и Тайване [186]. Изоляты ST11 также распространены в Китае, в то время как клебсиеллы «гибридного» ST258, сформированного из ST11 и ST442, широко представлены на территории Северной и Латинской Америк, а также в некоторых странах Европы. Для *K. pneumoniae* ST11 и ST258 часто свойственна продукция карбапенемаз KPC- и NDM-типов [59, 91]. В связи с активным изучением *K. pneumoniae*, ежегодно выявляют новые сиквенс-типы изолятов: в широкомасштабном исследовании Wang et al., в 2013 г. были описаны 7 новых аллелей генов «домашнего хозяйства» клебсиелл и 24 новых сиквенс-типа, в Венесуэле в 2017 г. – выявлены 3 новых сиквенс-

типа, в Германии описан новый высоковирулентный ST2398 [142, 154, 186].

Определение сиквенс-типа изолятов *K. pneumoniae* является важным методом в изучении эпидемиологии патогена и предсказании рисков клебсиеллезных инфекций.

1.5.2 Опасность объединения потенциалов гипервирулентных и классических

K. pneumoniae

«Классические» и «гипервирулентные» группы *K. pneumoniae* многими исследователями расценивались как независимые и непересекающиеся эволюционные ветви [44]. В обзоре Hennequin and Robin 2016 г. было отмечено, что введение в клетки вирулентных штаммов клебсиелл генетических детерминант антибиотико-резистентности, приводящее к продукции этими штаммами бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз, снижало их вирулентность: на модели клебсиеллезной инфекции у личинок *Galleria mellonella* КРС-продуцирующие штаммы *K. pneumoniae* приводили к смерти на 25 % меньше особей, чем штаммы, не продуцирующие карбапенемазы КРС-типа [94, 125]. Тем не менее, некоторыми исследователями высказывались опасения общего порядка о возможности формирования нового «суперпатогена» в случае объединения потенциалов КЛ мультирезистентных и ГПВ клебсиелл [94].

За последние десять лет появились сообщения о формировании «гибридных» - одновременно высоковирулентных и антибиотикорезистентных - штаммов клебсиелл в разных регионах мира на основе генетических линий ГПВ *K. pneumoniae*. Так, в 2008 г. в Южной Корее был выделен штамм *K. pneumoniae* генотипа ST23^{K1}, несущий ген цефалоспориназы *bla*_{СТХ-М-15} [175], в 2014 г. в Аргентине описаны штаммы генотипа ST23^{K1}, имеющие ген карбапенемазы *bla*_{КРС-2} [58], в 2015 г. в Китае описаны вирулентные штаммы *K. pneumoniae* генотипов ST^{K2} и нового ST1797^{K1}, продуцирующие карбапенемазу КРС-2 [194, 199], в 2016 г. во Франции – штаммы генотипа ST86^{K2} с геном цефалоспориназы *bla*_{СТХ-М-3} [176]. В 2017 г. появилось сообщение о формировании в лечебном учреждении Китая «гибридного» варианта клебсиелл на основе мультирезистентной генетической линии *K. pneumoniae* ST11^{K47}, в результате приобретения ею плазмиды вирулентности pLVPK-like, несущей гены кластера аэробактинов и ген регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA*. На модели

клебсиеллезной инфекции у личинок *Galleria mellonella* было показано, что вирулентность «гибридных» изолятов была сравнима с вирулентностью ГПВ *K. pneumoniae* ST23^{K1} [91]. В Российской Федерации в 2017 г. также был описан случай распространения в неонатальном отделении г. Казани гипермукоидных *K. pneumoniae*, имеющих фенотип БЛРС [106].

1.6 Заключение по Главе 1

K. pneumoniae – эпидемически значимый госпитальный и внегоспитальный патоген, способный вызывать разнообразные по степени тяжести инфекции во многих сайтах организма человека и животных: инфекции кровотока, дыхательной и нервной систем, урогенитального тракта и опорно-двигательного аппарата, часто приводящие к тяжелым осложнениям. Опасность *K. pneumoniae* как патогена в последнее десятилетие возрастает, с одной стороны, благодаря росту уровней и спектра устойчивости классических клебсиелл к антибактериальным препаратам разных функциональных классов и, с другой стороны, из-за распространения по всему миру гипервирулентных клебсиелл, впервые описанных в Азиатско-Тихоокеанском регионе, которые способны вызывать тяжелые инфекции как у людей с ослабленным иммунитетом, так и лиц без нарушений иммунитета.

Молекулярно-генетические механизмы антибиотикорезистентности *K. pneumoniae* ко всем применяемым в терапии лекарственным препаратам включают в себя инактивацию молекул антибиотиков (β -лактамазы, аминоглюкозид-модифицирующие белки и др.); модификацию мишени действия антибиотиков (мутации в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* и др.); активацию эффлюксных насосов (*oqxA*, *oqxB* и др.); изменение проницаемости микробной клетки (мутации в генах поринов *ompK35*, *ompK36* и др.) и активацию метаболического шунта (мутации генов *dfrA* и др.). На основании литературных данных, с вирулентностью *K. pneumoniae* ассоциированы такие фенотипические признаки, как гипермукоидный фенотип, наличие «гладкого ЛПС», наличие разнообразных систем утилизации железа и аллантаина, а также наличие фимбрий 1 и 3 типа, позволяющих клеткам бактерий избегать действия иммунного ответа макроорганизма, обеспечивать себя микро- и макроэлементами в очаге инфекции и активно распространяться в макроорганизме.

Показано, что множественная антибиотикорезистентность является характерным свойством современных штаммов клебсиелл, принадлежащих к эволюционной ветви классических *K. pneumoniae*, а способность вызывать тяжелые формы первичных клебсиеллезных инфекций – для штаммов, относящихся к эволюционной ветви гипервирулентных *K. pneumoniae*. Штаммы двух эволюционных ветвей характеризуются принадлежностью к разным генетическим линиям (сиквенс-типам и клональным комплексам) и капсульным типам. До недавнего времени считалось, что геномы классических и гипервирулентных *K. pneumoniae* различаются настолько существенно, что не могут образовывать гибридные формы. Однако, в последние десять лет появились сообщения о фактах приобретения множественной лекарственной устойчивости гипервирулентными штаммами клебсиелл в Южной Корее, Аргентине, Франции и Китае. Кроме того, описан случай приобретения плазмиды вирулентности классическим экстремально резистентным госпитальным штаммом *K. pneumoniae* в Китае. Это указывает на опасность объединения патогенетических свойств двух эволюционных ветвей клебсиелл и формирование нового «суперпатогена».

В Российской Федерации, как и во всем мире, *K. pneumoniae* являются одним из актуальных возбудителей внутри- и внебольничных инфекций. Многоцентровые исследования показывают, что повсеместно нарастает уровень антибиотикорезистентности госпитальных штаммов клебсиелл, что связано с эпидемическим распространением генов бета-лактамаз, в том числе карбапенемаз. Кроме того, появилось несколько сообщений, указывающих на появление гипервирулентных штаммов в госпитальной среде некоторых регионов.

На основании вышесказанного, оценка потенциалов вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов генетических линий *K. pneumoniae*, циркулирующих в Российской Федерации, путем определения их чувствительности к антибактериальным препаратам, выявления гипермукоидного фенотипа и детекции генетических детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности является актуальной задачей клинической микробиологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Микробиологические методы

2.1.1 Штаммы микроорганизмов

Клинические штаммы *K. pneumoniae*, использованные в работе, выделены от пациентов нейрореанимации Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н. Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации в 2012-2016 гг. (n=278), от пациентов Государственного бюджетного учреждения «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы» в 2013-2015 гг. (n=56), из других источников в 2011-2016 гг. (n=10), в том числе от сельскохозяйственного животного (n=1) и из пресной воды в Краснодарском крае (n=1), получены из лабораторной коллекции отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ (n=14).

Использованные в работе штаммы грамотрицательных бактерий (n=199) выделены из клинических образцов ректальных, трахеальных мазков и мочи пациентов нейрореанимации г. Москвы: *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter absuriae*, *Enterobacter kobei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* и *Stenotrophomonas maltophilia*.

В качестве референс-штаммов для определения чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) использовали штаммы *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218 и *K. pneumoniae* ATCC 700603, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

В качестве референс-штаммов для определения К-серотипов использовали штаммы *K. pneumoniae* ATCC 12657 (K54), ATCC 13886 (K1) и ATCC 43816 (K2), полученные из Американской коллекции типовых культур.

В качестве референс-штаммов для детекции гена карбапенемазы *bla*_{NDM-1} использовали штаммы *K. pneumoniae* KPS409 и KPS410, полученные от профессора Сидоренко С.В. (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», г. Санкт-Петербург).

В качестве референс-штамма для детекции гена карбапенемазы *bla*_{KPC} использовали штамм *K. pneumoniae* ATCC BAA 1902, полученный из Американской коллекции типовых культур.

В качестве реципиентных штаммов в экспериментах по конъюгативной передаче плазмид и трансформации использовали лабораторные штаммы *E. coli* HB101 Rif^R и *E. coli* DH5 α , полученный из лабораторной коллекции отдела молекулярной микробиологии.

2.1.2 Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий

Культивирование микроорганизмов на твердых питательных средах проводили при температуре 37 °С в течение 18-24 ч., на жидких питательных средах - при 37 °С в течение 18-24 ч., при аэрации со скоростью вращения 160-180 об/мин. В работе использовали питательные среды: «Питательная среда № 1 ГРМ-агар» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Агар Эндо-ГРМ» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Muller-Hinton agar» (Himedia, Мумбаи, Индия), «HiCrome UTI Agar, Modified» (Himedia, Мумбаи, Индия), «Мясо-пептонный бульон» (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия), «Muller-Hinton broth» (Himedia, Мумбаи, Индия), «Luria Bertani broth» (Difco, Детройт, США).

Хранение бактериальных культур осуществляли в 15 %-ном глицерине при температуре минус 70 °С, а также в лиофильно высушенном виде.

2.1.3 Выделение бактерий из клинического материала

Выделение бактерий из ректальных и трахельных мазков осуществляли высевом клинического материала «истощающим штрихом», из образцов мочи и ликвора -

распределяя шпателем 0,1 мл образца по поверхности селективной плотной питательной среды «Агар Эндо-ГРМ», «Лактозный ТТХ агар с тергитолом 7» или «HiCrome UTI Agar, Modified». После 18-20 ч культивирования отбирали отличные друг от друга единичные колонии и пересевали их на «ГРМ-агар».

2.1.4 Видовая идентификация бактерий

Видовую идентификацию бактерий проводили согласно инструкциям, прилагаемым к оборудованию, с помощью автоматической системы VITEK-2 Compact (Biomérieux, Марси Л'Этуаль, Франция) с использованием карты GN (для видоидентификации грамотрицательных бактерий) и масс-спектрометра MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия) методом прямого нанесения культуры на мишень.

2.1.5 Стринг-тест

Наличие признака гипермукоидности культур *K. pneumoniae* определяли с помощью стринг-теста, как описано у Shon et al. [167]. Культуры *K. pneumoniae* выращивали в течение 18-20 ч при температуре 37 °С на плотных питательных средах с добавлением 5 % эритроцитов барана. Тест считали положительным, если колония *K. pneumoniae* тянулась за бактериологической петлей на расстояние более 5 мм.

2.1.6 Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам (АБП): амоксициллину-клавулановой кислоте (АМС); амоксициллину-сульбактаму (АМС); цефуроксиму (СЕФ); цефокситину (СЕХ); цефотаксиму (СТХ); цефтриаксону (СТА); цефтазидиму (САЗ); цефоперазону (СРЗ) цефоперазонсульбактаму (СРС); цефепиму (ФЕР); эртапенему (ЕРМ); азтреонаму (АЗР); имипенему (ИМ); меропенему (МЕР); доксициклину (ДОС); тигециклину (ТГС); ципрофлоксацину (СІР); тетрациклину (ТЕТ); хлорамфениколу (СМ); гентамицину (ГЕН); тобрамицину (ТОВ); амикацину (АМІ); котримоксазолу (СТЗ); триметоприму (ТНР); нитрофурантоину (НИТ), колистину (СОЛ) – определяли с помощью автоматической системы VITEK-2 Compact (Biomérieux,

Марси Л'Этуаль, Франция) в соответствии с рекомендациями производителя, а также диско-диффузионным методом с использованием коммерческих дисков (Oxoid, Бейзингстоук, Великобритания) и плотной питательной среды «Muller-Hinton agar» (HiMedia, Мумбаи, Индия) и методом серийных микроразведений в бульоне с использованием жидкой среды «Muller-Hinton Broth» (HiMedia, Мумбаи, Индия). Тестирования проводили 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/).

2.1.7 Селекция устойчивого к рифампицину варианта штамма *K. pneumoniae* КРМ9

Рифампицин-устойчивый клон *K. pneumoniae* КРМ9 получали в результате последовательной селекции штамма на плотных питательных средах с постепенным повышением концентрации рифампицина от 50 до 300 мг/л. Полученную устойчивую культуру хранили в 15 % глицерине при температуре минус 70 °С.

2.2 Биологические методы

2.2.1 Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали самок белых аутбредных мышей с весом 19-22 г., полученных из питомника лабораторных животных «Андреевка» Федерального государственного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», после карантина в виварии ФБУН ГНЦ ПМБ, согласно СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» [20]. Животных содержали в стандартных условиях, в соответствии с требованиями руководства по содержанию и использованию лабораторных животных [92] при свободном доступе к воде и корму (Лабораторкорм, Москва, Россия).

2.2.2 Подготовка бактериальных суспензий для заражения

Культуры *K. pneumoniae* выращивали на плотной питательной среде ГРМ №1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) при температуре 37 °С в течение 18 ч. Единичные колонии суспендировали в физиологическом растворе до плотности 3,2 по стандарту МакФарланда, что соответствовало 1×10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл, готовили серийные разведения, соответствующие 2×10^8 , 2×10^7 , 2×10^6 , 2×10^5 , 2×10^4 , 2×10^3 , 2×10^2 и 2×10^1 КОЕ/мл. Количество живых клеток в инокуляте контролировали высевом 0,1 мл взвеси на плотную питательную среду ГРМ №1. Бактериальную культуру вводили внутривентрально лабораторным животным в объёме 0,2 мл.

2.2.3 Определение вирулентности штаммов *K. pneumoniae* для мышей

Предварительную оценку вирулентности штаммов *K. pneumoniae* осуществляли при внутривентральном заражении двух групп животных по 3 мыши в каждой бактериальными культурами изучаемых штаммов в дозах 1×10^3 и 1×10^6 КОЕ/животное. За животными наблюдали в течение 14 суток. В паренхиматозных органах (печень, селезёнка, лёгкие) и крови погибших мышей исследовали наличие бактерий *K. pneumoniae* методом отпечатков на плотной питательной среде ГРМ №1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). Гибель животных от минимальной дозы свидетельствовала о вирулентности исследуемого штамма *K. pneumoniae*. Если все животные оставались живы после заражения максимальной дозой, культуру считали авирулентной.

2.2.4 Определение среднелетальной дозы штаммов *K. pneumoniae* для мышей

Среднелетальную дозу (LD_{50}) штаммов *K. pneumoniae* определяли с использованием пяти групп животных по 6 мышей в каждой. Заражение проводили внутривентрально по 0,5 мл бактериальной суспензии в дозах 1×10^1 - 1×10^5 КОЕ/животное. Наблюдение за животными проводили в течение 14 суток. Погибшими от специфической клебсиеллезной инфекции считали животных, из внутренних органов и крови которых была выделена культура *K. pneumoniae*. LD_{50} рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева [1].

2.3 Биохимические методы

2.3.1 Выделение липополисахаридов *K. pneumoniae*

Выделение липополисахаридов (ЛПС) *K. pneumoniae* осуществляли по модифицированной методике Hitchcock et al. [96]. Из ночной культуры бактерий, выращенных на плотной питательной среде, готовили суспензию клеток в физиологическом растворе с концентрацией 1×10^9 КОЕ/мл, отбирали 1 мл суспензии в пробирки вместимостью 1,5 мл типа Eppendorf и центрифугировали при 9000 g в течение 3 мин. Клеточный осадок суспендировали в 0,1 мл лизирующего буфера (0,125 М Tris-HCl, 4 % SDS, 20 % глицерин, 10 % 2-меркаптоэтанол, 0,02 % бромфенол синий) и прогревали в течение 5 мин при температуре 100 °С, охлаждали до комнатной температуры, добавляли 5 мкл протеиназы К с концентрацией 10 г/л (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США) и инкубировали 3 ч при температуре 55 °С. ЛПС визуализировали с помощью электрофрезы в 15 % полиакриламидный гель (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (Sodium Dodecyl Sulfate – SDS).

2.3.2 Выделение пориновых белков *K. pneumoniae*

Пориновые белки клеток *K. pneumoniae* выделяли по методу Carlone et al. [55]. Ночную культуру *K. pneumoniae* центрифугировали при 5000 g при температуре 4 °С в течение 10 мин, осадок отмывали в 10 мМ буфере HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота) (pH=7,4) (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США), растворяли в 1 мл 10 мМ HEPES, шестикратно проводили ультразвуковую дезинтеграцию по 10 с при 40 W и осаждали остатки клеток центрифугированием при 15600 g при температуре 4 °С в течение 2 мин. Супернатант центрифугировали в течение 20 мин при 100 000 g при температуре 4 °С. Осадок отмывали дважды 0,5 мл 10 мМ HEPES без суспендирования с центрифугированием, далее осадок суспендировали в 100 мкл HEPES и добавляли 100 мкл лизирующего буфера (20 % глицерин, 10% меркаптоэтанол, 4 % SDS в 0,125 М Tris (pH=6,8) с добавлением в раствор 10 мкл 0,05 % красителя бромфеноловый синий), после чего смесь суспендировали и прогревали 5 мин при температуре 100 °С. Белки визуализировали с

помощью электрофореза в 15 % ПААГ-SDS, внося в гель 10 мкл образца.

2.3.3 Электрофорез в полиакриламидном геле и окрашивание препаратов

Электрофоретический контроль препаратов ЛПС и пориновых белков штаммов *K. pneumoniae* проводили по методам Laemmli и Остермана в 15 % SDS-ПААГ [11, 112]. Для визуализации ЛПС гели окрашивали аммиачным раствором оксида серебра после окисления йодной кислотой, в соответствии с рекомендациями С. Tsai и С. Frash [181]. Для визуализации белковых профилей использовали краситель Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). Гели фотографировали с помощью прибора Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-RAD, Геркулес, США) в проходящем белом свете.

2.3.4 Электрофорез в агарозном геле

Для электрофореза нуклеиновых кислот использовали однократный Трис-боратный буфер, который готовили из двадцатикратного концентрата (121,1 г Трис (молярная масса 121,1 г/моль), 50 г борной кислоты и 80 мл 250 мМ ЭДТА с pH 8,1-8,3).

Разделение ДНК плазмид, препаратов РНК и ПЦР-продуктов осуществляли в электрофоретической камере Sub-Cell 192 (Bio-RAD, Геркулес, США) в 0,7 %, 1,0 % и 1,5 % агарозном геле, соответственно, при напряжении 80-90 В, внося в лунки геля исследуемые образцы с добавлением красителя 6×Orange LD DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Гель окрашивали раствором 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Гель-документацию проводили с использованием прибора Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-RAD, Геркулес, США) в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм.

2.4 Молекулярно-генетические методы

2.4.1 Плазмидные векторы, использованные в работе

В работе использовали ДНК плазмиды pKK214GFP/ASV, предоставленную Dr. M. Forsman, [28]; ДНК плазмиды pB2SK, полученную от к.б.н. Платонова М.Е., с.н.с.

отдела особо опасных инфекций ФБУН ГНЦ ПМБ; ДНК плазмиды pET-NDM-1, полученной от к.х.н. Григоренко В.Г., с.н.с. кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова [2].

2.4.2 Конъюгативный перенос плазмид

Конъюгативный перенос плазмид проводили по ранее описанной методике [24]. Ночные культуры бактерий выращивали при аэрации со скоростью вращения 120 об/мин 18 ч при температуре 37 °С в 3 мл бульона LB, содержащего 10 мг/л цефотаксима (CTX) для штаммов-доноров и 200 мг/л рифампицина (RIF) для штаммов-реципиентов. По 0,05 мл ночной культуры каждого штамма переносили в 5 мл стерильного бульона LB, подрачивали до оптической плотности $OD_{600}=0.6$. Смешивали в стерильной пробирке по 1 мл культуры реципиента и 0,2 мл культуры донора и инкубировали в наклонном положении в течение 3 ч при температуре 37 °С без аэрации. Для каждой конъюгационной смеси готовили ряды десятикратных разведений и высевали по 0,1 мл на питательную среду LB агар с двумя антибиотиками (10 мг/л CTX и 200 мг/л RIF) и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 48 ч. Для определения эффективности конъюгации параллельно конъюгационную смесь высевали на плотную среду LB агар с 200 мг/л RIF. Эффективность конъюгации рассчитывали как отношение колониеобразующих единиц (КОЕ) трансконъюгантов к количеству КОЕ реципиента.

2.4.3 Криотрансформация штаммов бактерий

Криотрансформацию бактерий проводили по ранее описанному методу Merrick et al. с модификациями [128]. Ночные культуры бактерий выращивали в течение 18 ч в 5 мл бульона LB при температуре 37 °С и скорости вращения 120 об/мин. В 4,5 мл стерильной среды LB вносили по 0,5 мл ночной культуры и культивировали в течение 2 ч при тех же условиях. Клетки осаждали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин при температуре 4 °С. Осадок ресуспендировали в 0,4 мл 50 мМ CaCl₂, аликвоты по 0,2 мл суспензии клеток вносили в стерильные пробирки типа Eppendorf и добавляли

по 1,5 мкл (250 нг) ДНК векторных плазмид. Аликвоты двукратно подвергли циклу замораживания-оттаивания погружением в жидкий азот на 1-2 мин и оттаиванием при 37 °С, после чего добавляли в 5 мл стерильной среды LB и инкубировали при прежних условиях до появления видимого роста (2-4 ч). Готовили ряды десятикратных разведений и высевали на среду LB-агар с добавлением 20 мг/л хлорамфеникола (раздел 3.5.2) или 10 мг/л меропенема (раздел 4.8).

2.4.4 Подготовка ДНК матрицы для полимеразной цепной реакции

В качестве матрицы для проведения ПЦР в работе использовали клеточные термолизаты. Бактериологическую петлю ночной бактериальной культуры суспендировали в 0,1 мл лизирующего раствора (0,25 % SDS, 0,05 М NaOH) до концентрации 10^8 - 10^9 КОЕ/мл в пробирках вместимостью 1,5 мл типа Eppendorf. Пробы прогревали при температуре 98-100 °С на водяной бане или в твердотельном термостате, в каждую пробирку добавляли 0,9 мл деионизованной воды, пробы центрифугировали при 19000 g в течение 2 мин при температуре 4 °С. Супернатант отбирали в стерильные микропробирки и использовали в качестве матрицы 1-2 мкл для проведения реакции ПЦР.

2.4.5 Выделение ДНК *K. pneumoniae* для полногеномного секвенирования

Выделение бактериальной ДНК осуществляли методом, описанным Thomas et al. [179]. Ночную культуру (1 мл) центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g при температуре 4 °С. Клеточный осадок суспендировали в 0,5 мл экстрагирующего буфера, содержащего в 100 мл 2 г цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ), 28 мл 5 М NaCl, 4 мл 0,5 М раствора ЭДТА (pH=8,0), 5 мл 2 М Трис-HCl (pH=8,0) и инкубировали в течение 30-40 мин при температуре 60 °С при покачивании, добавляли равный объем хлороформа и инкубировали в течение 30-40 мин при комнатной температуре с периодическим переворачиванием пробирок. После центрифугирования в течение 10 мин при 6000 g отбирали верхнюю фазу в чистые пробирки, добавляли равный объем изопропилового спирта и перемешивали. Пробирки инкубировали на холоду в течение 30-60 мин, центрифугировали 10 мин при 16000 g и промывали осадок 70 %-ным

этиловым спиртом с последующим центрифугированием при тех же условиях. Осадок промывали перегнанным этиловым спиртом, центрифугировали, высушивали и растворяли в деионизированной воде. Визуализацию выделенной ДНК проводили с помощью электрофореза в 0,7 % агарозном геле.

2.4.6 Выделение плазмидной ДНК бактерий

Для выделения плазмидной ДНК бактерий использовали коммерческий набор GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США) согласно инструкции производителя, принцип которой основан на щелочном лизисе осажденных центрифугированием клеток бактерий в присутствии SDS с дальнейшей нейтрализацией лизата, удалением дебриса с SDS с помощью центрифугирования, адсорбцией плазмидной ДНК на колонке с мембраной на силикагелевой основе и ее элюированием с мембраны колонки после удаления примесей двукратным промыванием (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502>). Визуализацию плазмидных профилей осуществляли с помощью электрофореза в 0,7 % агарозном геле.

2.4.7 Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК изучаемых штаммов выделяли коммерческим набором «РНК-Экстран» (Синтол, Москва, Россия), принцип работы которого основан на кислой фенольной экстракции по Хомчинскому [66]. Для изучения экспрессии генов бета-лактамаз ночную культуру клеток бактерий в количестве 0,1 мл вносили в 5 мл стерильного бульона LB с добавлением 100 мг/л ампициллина и выращивали при температуре 37 °С в течение 4 ч при скорости вращения 160-180 об/мин, выделение РНК проводили согласно прилагаемой к набору «РНК-Экстран» инструкции. Для удаления следов ДНК к 40 мкл препарата РНК добавляли 5,6 мкл 10×буфера, 5,6 мкл MgCl₂, 3,5 мкл дезоксирибонуклеазы (ДНАзы) (разведение 1:10), перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 мин. при комнатной температуре. Для инактивации ДНАзы к смеси добавляли 8,5 мкл 20 мМ ЭДТА и инкубировали при температуре 65 °С в течение 15 мин. Визуализацию РНК проводили с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

2.4.8 Обратная транскрипция

Для обратной транскрипции использовали коммерческий набор реактивов «ОТ-1» (Синтол, Москва, Россия). Смесь, содержащую для каждого образца 2 мкл праймера «Random 6», 5 мкл образца РНК и 7 мкл свободной от нуклеаз воды, прогревали в течение 5 мин при температуре 65 °С для проведения отжига праймера. Далее в образцы добавляли 10 мкл 2,5× реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. В пробирку с отрицательным контролем вместо ревертазы вносили 1 мкл свободной от нуклеаз воды. Пробирки перемешивали и краткосрочно центрифугировали для осаждения жидкости со стенок пробирок. Образцы инкубировали в течение 50 мин при температуре 42 °С. Для инактивации ревертазы инкубировали смесь в течение 5 мин при температуре 92 °С. Полученную ДНК использовали в ПЦР, оставшийся объем хранили при температуре минус 20 °С.

2.4.9 Детекция генов антибиотикорезистентности, вирулентности и генов капсулообразования с помощью ПЦР

Аmplification ДНК проводили в приборах GradientPalmCycler CG1-96 (Corbett research, Мортлейк, Австралия) и «Терцик» (ДНК-Технология, Москва, Россия) с использованием реактивов Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США: 10×*Taq*-буфера с аммонием сернокислым ((NH₄)₂SO₄); 25 мМ раствора хлорида магния (MgCl₂); 10 мМ раствор смеси дезоксирибонукле-озидтрифосфатов (дНТФ); рекомбинантной *Taq*-полимеразы с концентрацией 5 ед/мкл; рекомбинантной *Pfu*-полимеразы с концентрацией 5 ед/мкл. ПЦР проводили в 30 мкл реакционной смеси, для каждого образца содержащей: 2,5 мкл 10×*Taq*-буфера с (NH₄)₂SO₄; 2,0 мМ MgCl₂; 0,2 мМ каждого дНТФ; 5 μМ каждого праймера, 0,8 ед. *Taq*-полимеразы или, в случае наработки ампликона для дальнейшего секвенирования, смеси *Taq*- и *Pfu*-полимераз (20:1) и 1-2 мкл матрицы ДНК. В пробирку с отрицательным контролем реакции ДНК не вносили. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация при температуре 94 °С в течение 3 мин; 30 циклов, состоящих из денатурации при температуре 94 °С в течение 30 с; отжига праймеров при температуре, оптимальной для каждой используемой пары специфических праймеров (приложение А), в течение 30 с;

элонгации при температуре 72 °С в течение 40 с; завершающая элонгация при температуре 72 °С в течение 10 мин. Визуализацию продуктов реакции проводили в 1,5 % агарозном геле. Наличие изучаемого в реакции гена отмечали для штаммов по наличию ПЦР-продукта с размером, соответствующим размеру амплифицированного с ДНК-матрицы референс-штамма ПЦР-продукта.

2.4.10 Определение групп несовместимости плазмид

Определение групп несовместимости плазмид проводили по методу Carattoli et al., основанному на ПЦР-детекции со специфическими праймерами репликонов плазмид основных групп несовместимости бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [53]. ПЦР-детекцию плазмид группы IncL/M проводили с специфических праймеров на гены *repA* и *traU*: RepA-A (5'-gacattgagtcagtagaagg-3'), RepA-B (5'-cgtgcagttcgtctttcggc-3'), TraU-A (5'-atctcacgcaatcttacgtc-3'), TraU-B (5'-tcgcgatcatgcgtgatcttc-3') [147].

2.4.11 Генотипирование штаммов *K. pneumoniae* методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК

Внутривидовое генотипирование штаммов бактерий проводили методом случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) с помощью «случайных» праймеров OPA-11 (5'-caatgcccgt-3') и Wil 2 (5'-tcacgatgca-3') по ранее описанному алгоритму [201]. Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, в качестве ПЦР-матрицы использовали термолизаты бактерий. Условия проведения реакции: начальная денатурация при 95,5 °С, 3 мин; затем 5 циклов, состоящих из денатурации при 94 °С, 1 мин, отжига при 35 °С, 1 мин и элонгации при 73 °С, 2 мин; далее проводили 40 циклов, включающих денатурацию при 94 °С, 30 с, отжиг при 35 °С, 30 с и элонгацию при 72 °С, 2 мин; заключительное достраивание происходило при 72 °С, 10 мин. ПЦР-продукты анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле.

2.4.12 Мультилокусное секвенирование-типирование штаммов *K. pneumoniae*

Мультилокусное секвенирование-типирование (MLST) *K. pneumoniae* проводили согласно схеме Diancourt et al., которая включает в себя амплификацию ДНК и секвенирование внутренних регионов семи генов «домашнего хозяйства»: *rpoB* (бета-субъединицы РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы), *mdh* (малат-дегидрогеназы), *pgi* (фосфоглюкоза-изомеразы), *phoE* (фосфорина E), *infB* (фактора инициации трансляции 2), *tonB* (периплазматического энергетического трансдуцера) [76]. Аллели «генов домашнего хозяйства» определяли с помощью инструмента «Sequence query». Идентификацию сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae* проводили по аллельным профилям штамма с помощью инструмента «Search by combinations of alleles» (http://bigsdatabase.pasteur.fr/perl/bigsdatabase/bigsdatabase.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef_public).

2.4.13 Секвенирование нуклеотидных последовательностей изучаемых генов

Секвенирование нуклеотидных последовательностей изучаемых генов проводили методом Сенгера с помощью автоматического секвенатора ABI PRISM 3100-Avant (Applied Biosystems, США) и набора реактивов BigDye Terminator v. 3.1 kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), согласно прилагаемым протоколам. ПЦР-продукты подготавливали к секвенированию путем вырезания их из агарозного геля под контролем системы визуализации в проходящем УФ-свете с длиной волны 254 нм. Для очистки продуктов амплификации использовали набор DNA Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США), согласно прилагаемой инструкции. Каждый очищенный образец ДНК амплифицировали дважды: отдельно с прямым и с обратным праймерами, с дальнейшей очисткой продуктов амплификации.

2.4.14 Полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae*

Полногеномные секвенирования штаммов *K. pneumoniae* проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием наборов Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina, Карлсбад, США) и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, Карлсбад, США), согласно

инструкциям производителя. Полученные единичные прочтения собирали в контиги с использованием программного обеспечения SPAdes 3.9.0. [42].

2.6. Биоинформационный анализ

2.6.1 Дизайн и синтез олигонуклеотидных праймеров

Дизайн последовательностей олигонуклеотидных праймеров для клонирования гена мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36* проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI9 (Invitrogen, Карлсбад, США) с использованием последовательностей данного гена, представленных в базе данных GenBank. Изготовление олигонуклеотидов для исследования осуществляли в ООО «Синтол» (Москва, Россия).

2.6.2 Анализ нуклеотидных последовательностей генов бактерий

Компьютерный анализ последовательностей ДНК проводили с помощью программ Chromas 2.6.2. (Technelysium Pty Ltd, Брисбен, Австралия) и Vector NTI9 (Invitrogen, Карлсбад, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей и идентификацию генов антибиотикорезистентности грамотрицательных бактерий, а также генов, ассоциированных с вирулентностью *K. pneumoniae*, и генов кластера капсулообразования осуществляли с помощью веб-ресурса BLAST (The Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Нуклеотидные последовательности ДНК размещали в базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

2.6.3 Определение клональных комплексов *K. pneumoniae*

Клональные комплексы штаммов *K. pneumoniae* определяли с помощью сервиса eBURST V3 (Imperial College London, Лондон, Великобритания) (<http://eburst.mlst.net/>) [87] по совпадению 6 из 7 аллелей генов «домашнего хозяйства» сиквенс-типов штаммов *K. pneumoniae*.

2.6.4 Филогенетический анализ генов *wabG* и *uge* штаммов *K. pneumoniae*

Множественное выравнивание последовательностей генов *wabG* и *uge* штаммов *K. pneumoniae* проводили в программе Unipro UGENE (Унипро, Новосибирск, Россия) [136], построение филогенетического дерева проводили с помощью метода «ближайших соседей» в программном обеспечении SplitsTree 4 (Университет Эберхарда и Карла, Тюбинген, Германия) [100].

2.6.5 Анализ полных геномов штаммов *K. pneumoniae*

Собранные геномы аннотировали с помощью сервера NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline [35]. Вероятную принадлежность контигов к хромосомным или плазмидным последовательностям определяли с помощью веб-ресурса BLAST.

В работе использовали инструменты Центра геномной эпидемиологии (Center for Genomic Epidemiology, <http://www.genomicepidemiology.org/>): поиск нуклеотидных последовательностей генов устойчивости к антибактериальным препаратам проводили с помощью сервиса ResFinder 2.1 [198]; поиск репликонов плазмид и определение групп несовместимости плазмид – PlasmidFinder 1.3 [54].

2.6.6 Филогенетический анализ полных геномов штаммов *K. pneumoniae*

Филогенетический анализ штаммов *K. pneumoniae* проводили с использованием программного обеспечения Wombac (Университет Монаша, Мельбурн, Австралия) (<https://github.com/tseemann/wombac>). Для визуализации использовали SplitsTree 4 [100]. Сравнение геномов проводили с помощью программного обеспечения Mauve (Технологический университет Сиднея, Сидней, Австралия) [71]. Нуклеотидную последовательность профага аннотировали с помощью web-сервиса Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST) [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3 ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

3.1 Оценка эпидемиологической значимости *Klebsiella pneumoniae* среди
грамотрицательных возбудителей госпитальных инфекций

В 2012-2016 гг. *K. pneumoniae* являлась доминирующим патогеном в этиологической структуре госпитальных инфекций среди грамотрицательных бактерий - частота встречаемости *K. pneumoniae* на 100 пациентов исследуемого отделения нейрореанимации г. Москвы составила ~75 случаев. Среди возбудителей инфекций кровотока клебсиеллы составили ~27 %, мочевыделительной системы - ~26 %, центральной нервной системы - ~20 %, инфекций дыхательной системы - ~19 %.

Штаммы *K. pneumoniae* изучаемой в данной работе коллекции (n=350) преимущественно выделены от 244 пациентов лечебных учреждений г. Москвы, г. Челябинска и из других источников (рисунок 3.1).

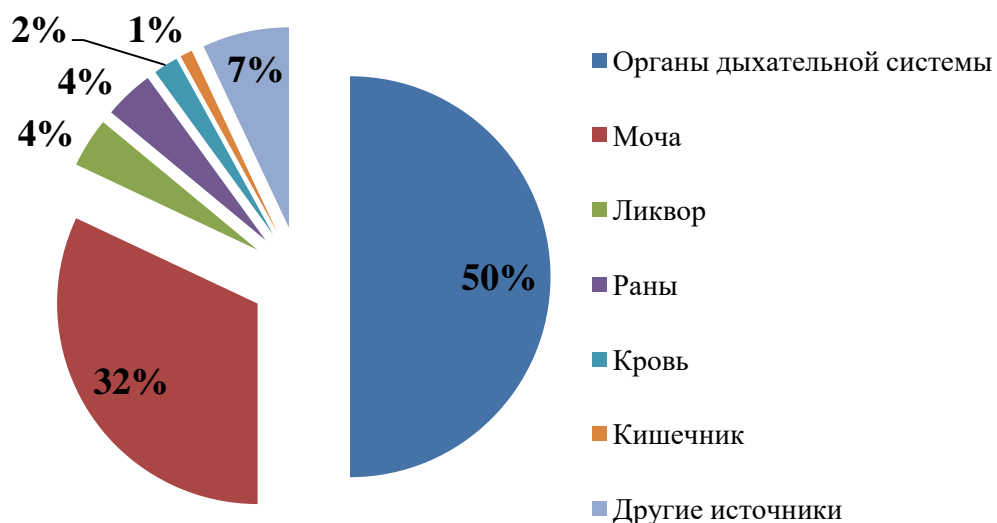


Рисунок 3.1 – Источники выделения штаммов *K. pneumoniae* изучаемой коллекции

Полученные данные о превалентности клебсиелл согласуются с описанными в научной литературе: *K. pneumoniae* составляли 26-58 % среди госпитальных патогенов в

Индии, США, Марокко и Эфиопии [36, 59, 75, 114], а в ряде стационаров России частота выделения *K. pneumoniae* составляла 25-44 % [19]. В исследовании Крыжановской отмечено, что в детском стационаре г. Москвы частота выделения клебсиелл составила 41 % от всех бактериальных патогенов, причем 34 % изолятов *K. pneumoniae* были выделены из дыхательной системы, 28 % - из мочи, 17 % - из крови и 21 % - из ран [10].

3.2 Фенотипическая характеристика коллекции госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в РФ в 2012-2016 гг.

Большинство штаммов *K. pneumoniae* (94 %) были множественно лекарственно устойчивыми (МЛУ), резистентными к трем и более классам антибактериальных препаратов (АБП), используемых для лечения инфекций (рисунок 3.2).

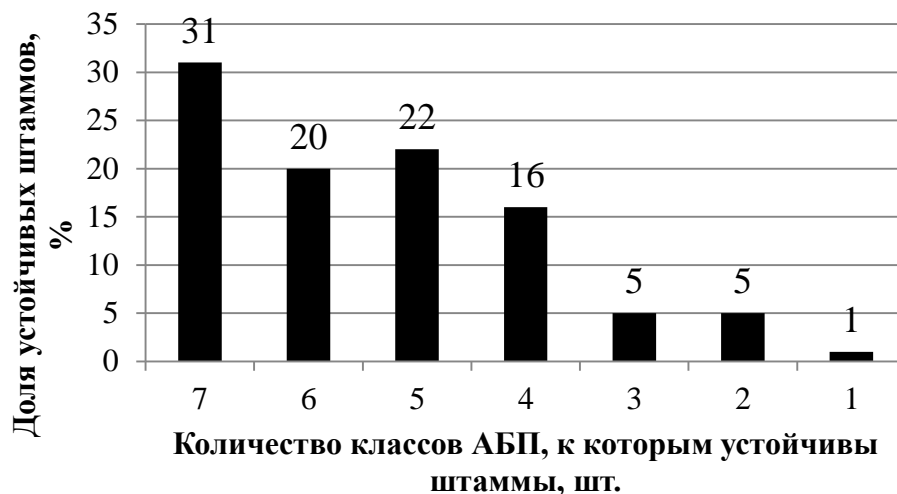
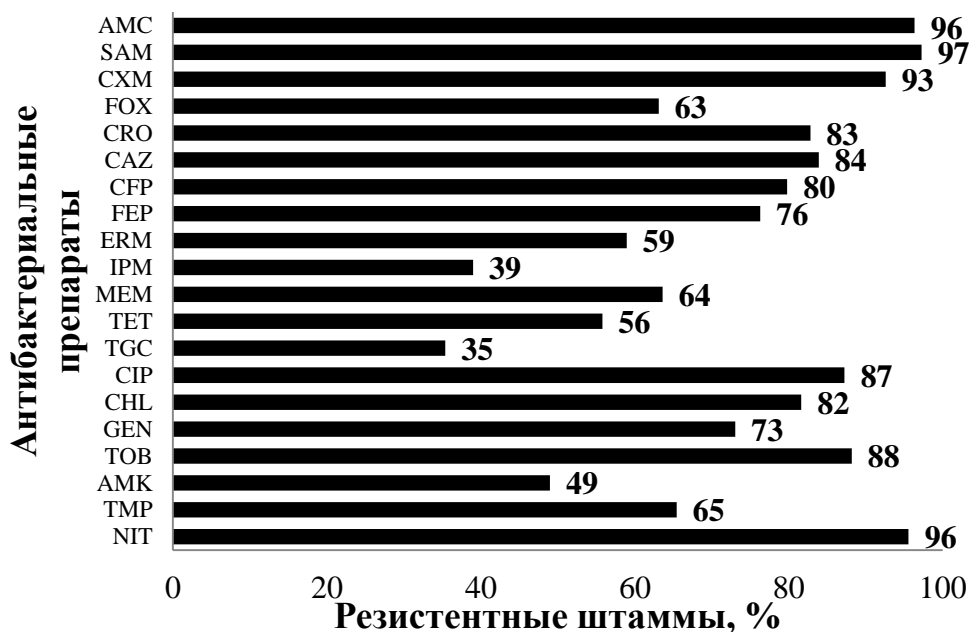


Рисунок 3.2 – Устойчивость штаммов *K. pneumoniae* к классам антибактериальных препаратов

Большая часть штаммов были устойчивы к бета-лактамам (97 %), нитрафуранам (96 %), фторхинолонам (87 %), фениколам (82 %) и аминогликозидам (73 %). Особую тревогу вызывает высокий уровень устойчивости к резервным препаратам тигециклину (МПК > 2 мг/л) у 35 % штаммов, имипенему (МПК ≥ 4 мг/л) у 39 % штаммов, амикацину (МПК ≥ 16 мг/л) у 49 % штаммов, а также к колистину (МПК > 2 мг/л) 19 из 48 тестированных штаммов (рисунок 3.3).



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 3.3 - Устойчивость клинических штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам

Анализ данных показывает, что доля устойчивых штаммов к карбапенемам имипенему и меропенему в изучаемой нами коллекции (31 % и 64 % штаммов, соответственно) существенно выше, чем описанная для клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных ранее в Новосибирске в 2008 г., в Иркутске в 2010 г. и в Ростове-на-Дону в 2015 г. (от 0 % до 23 %) [6, 9, 15].

В то же время, в зарубежных публикациях описаны данные о высоком уровне представленности резистентных к АБП госпитальных штаммов *K. pneumoniae*: в Индии 56 % штаммов устойчивы к карбапенемам [75]; в Китае и Индии 73-78 % штаммов - к аминогликозидам [75, 188]; в Китае, Индии, Италии и США 64-87 % штаммов - к фторхинолонам [75, 188]. В некоторых странах был отмечен еще более высокий, по сравнению с нашими данными, уровень устойчивости *K. pneumoniae* к названным функциональным классам антибиотиков: в Эфиопии и Китае 100 % штаммов были устойчивы к цефалоспорином 3-4 поколений [114, 188]; в Эфиопии и США 90-97 %

штаммов были устойчивы к аминогликозидам [114, 120]. Однако в некоторых регионах мира устойчивость *K. pneumoniae* к АБП была выражена в меньшей степени, чем в нашем исследовании: в Южной Африке 64 % штаммов были устойчивы к цефалоспорином 3-4 поколений [183]; в Китае и Южной Африке 16-18 % штаммов – к карбапенемам [183, 188]; в Южной Африке 51 % штаммов – к аминогликозидам и 30 % - к фторхинолонам [183].

3.3 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности в штаммах *K. pneumoniae*

С помощью молекулярно-генетического типирования в геномах штаммов *K. pneumoniae* были выявлены гены бета-лактамаз *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{NDM}. Ни в одном из тестируемых штаммов не было детектировано генов *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} и *bla*_{IMP}. Наиболее распространенными среди них были гены *bla*_{SHV} и *bla*_{CTX-M}, в меньшей степени в коллекции был представлен ген карбапенемазы *bla*_{NDM} (рисунок 3.4). С помощью секвенирования ДНК идентифицированы следующие аллели генов бета-лактамаз: *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}. В значительной степени преобладали аллели *bla*_{SHV-11} (64 %), *bla*_{CTX-M-15} (91 %) и *bla*_{OXA-48} (79 %) (приложение Б).

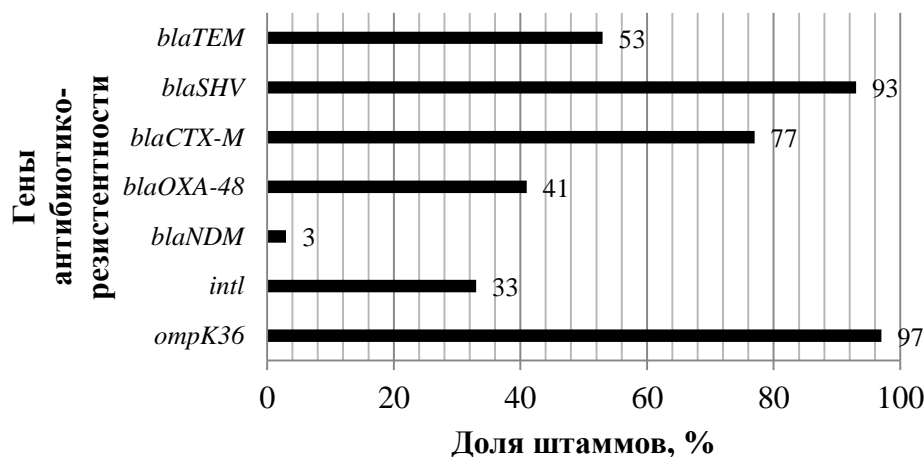


Рисунок 3.4 - Частота встречаемости генов антибиотикорезистентности в изучаемых штаммах *K. pneumoniae* (n=350)

Сравнение полученных нами данных с опубликованными в литературе показало, что значительное превалирование штаммов *K. pneumoniae* с генами *bla*_{SHV} (75-100 %)

также было описано в исследованиях, проведенных в Китае и Южной Африке [183, 188], но на территории Ирана отмечено превалирование штаммов клебсиелл, несущих ген *bla*_{TEM} (38 %) [81], в Малайзии – ген *bla*_{CTX-M-15} (91 %) [33]. Кроме того, в ряде исследований описано широкое распространение в штаммах *K. pneumoniae* генов карбапенемаз: КРС-типа – в Колумбии (86 %) [134], NDM-типа – в Индии (40 %) [34], ОХА-48-типа – в Европе (84 %) [103]. Преобладание антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, несущих карбапенемазу ОХА-48 (89 % штаммов), выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии г. Москвы, было отмечено в исследовании Крыжановской О.А. 2016 г. [10].

В изучаемой нами коллекции клинических штаммов *K. pneumoniae* у 33 % штаммов были обнаружены интегроны класса 1. У 56 % штаммов *K. pneumoniae*, несущих интегроны класса 1, были идентифицированы интегронные вставки (наборы генных кассет) 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*) (приложение Б). Интегроны класса 2 в изучаемых штаммах обнаружены не были. Кроме того, у 97 % штаммов *K. pneumoniae* был детектирован ген поринового белка *ompK36* (рисунок 3.4).

На основании опубликованных в литературе данных, в Китае был отмечен еще более высокий, чем в нашем исследовании, уровень детекции интегровов класса 1 в клинических изолятах *K. pneumoniae* (60 % изолятов), а также детектированы интегроны класса 2 (2 % изолятов) [190], которые в нашей коллекции отсутствовали. Напротив, в Иране только 8 % клинических клебсиелл несли интегроны класса 1, а интегроны класса 2, как и в нашей работе, отсутствовали [81], также в Иране количество штаммов с геном *ompK36* было значительно ниже (73 %), чем в изучаемой коллекции.

Таким образом, анализ наличия генетических детерминант устойчивости к АБП указывает на различия в особенностях эволюции антибиотикорезистентности *K. pneumoniae* в разных регионах мира.

3.4 Генотипы резистентности (R-генотипы) госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* и их распространенность

В процессе анализа данных по выявлению генетических детерминант антибиотикорезистентности разработан новый подход внутривидового типирования штаммов клебсиелл на основе определения «генотипа антибиотикорезистентности» (R-генотипа). Номенклатура R-генотипов основана на том, что количество генов бета-лактамаз обозначено цифрой, варианты сочетания этих генов - строчной буквой латинского алфавита, наличие интегрона класса 1 и гена поринового белка OmpK36 – цифрами (их наличие - единицей, отсутствие – нулем). В изучаемой коллекции идентифицирован 31 R-генотип, наиболее распространенными среди которых являются варианты с комбинациями трех генов бета-лактамаз R3a– 26 % и R3c – 13 %, а также четырех бета-лактамаз R4a – 19 % (таблица 3.1).

Значительное преобладание штаммов клебсиелл, несущих одновременно несколько генов разных бета-лактамаз также отмечено в исследовании Крыжановской – 68 % клинических штаммов, выделенных в детском отделении ОРИТ являлись носителями комбинаций трех генов *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M} и *bla*_{TEM} [10]. Согласно литературным данным, в Японии, Китае и Южной Африке распространены клинические штаммы клебсиелл, соответствующие генотипам R3a, R2a, R2b, R2d, R1a и R1b по нашей номенклатуре, а также были описаны варианты, не представленные в нашей коллекции – несущие два гена бета-лактамаз (*bla*_{OXA-48}+*bla*_{NDM}) и один ген бета-лактамазы (*bla*_{TEM}) [183, 188, 189].

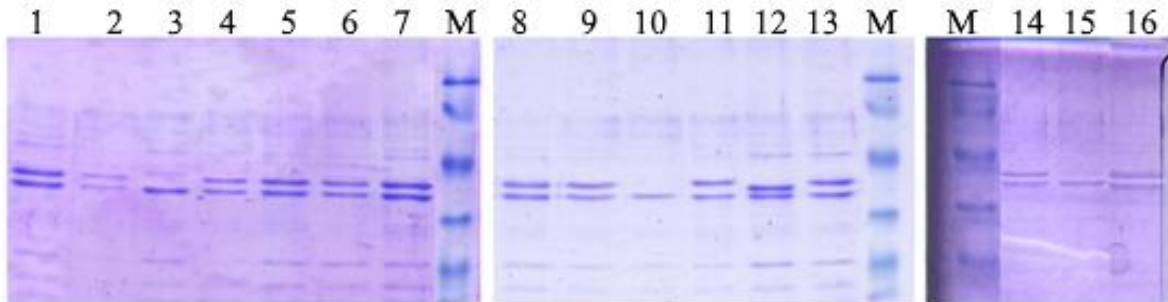
Таким образом, было выявлено значительное разнообразие генотипов резистентности штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в лечебных учреждениях Российской Федерации. Определение R-генотипов может служить инструментом внутривидового типирования клинических изолятов и эпидемически значимых штаммов *K. pneumoniae*.

Таблица 3.1 - 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 |

3.5 Вариабельность генов пориновых белков *K. pneumoniae*

С помощью секвенирования нуклеотидных последовательностей генов мажорного поринового белка клебсиелл OmpK36 (n=38) была выявлена их вариабельность. Анализ профилей белков внешней мембраны показал, что в ряде изолятов отсутствовала экспрессия мажорного поринового белка OmpK36 (рисунок 3.5).



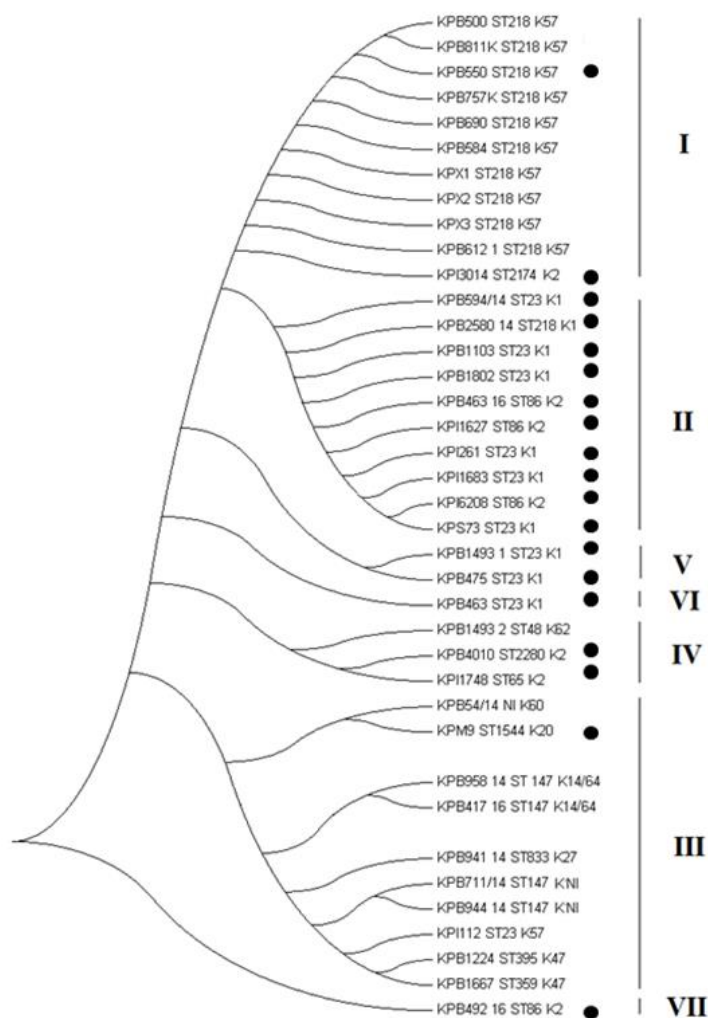
М – маркер молекулярной массы белков от 10 до 250 кДа (Fermentas, Литва); Штаммы *K. pneumoniae*:
 1 – КР16208; 2 – КР11748; 3 – КРВ811К; 4 – КРВ4010; 5 – КРВ1493-1; 6 – КРВ1802-14; 7 – КРВ1103-14;
 8 – КР1261; 9 – КР13014; 10 – КРВ500; 11 – КРВ1493-2; 12 – КРВ417-16; 13 – КРМ9; 14 – КРВ2226К-15;
 15 – КРВ944-14; 16 – КРВ542-16

Рисунок 3.5 - Электрофореграмма белков наружных мембран в 11 %-ном полиакриламидном геле

С помощью филогенетического анализа данных последовательностей определены семь кластеров (рисунок 3.6). Группа I объединяла 11 изолятов, подавляющее большинство которых принадлежали к генетической линии ST218 и были авирулентны для мышей и один средне-вирулентный изолят, принадлежащий ST2174. Группа II включала в себя 10 изолятов, принадлежащих к клональному комплексу CC23 (ST23 и ST218) и к ST86, вирулентных для аутбредных мышей. Группа III включала в себя 10 изолятов, разнородных по первичным последовательностям генов *ompK36* и по принадлежности к генотипам (ST48, ST23, ST147, ST147, ST395, ST833), а также по степени вирулентности (4 вирулентных и 11 авирулентных). Группа IV включала три штамма, принадлежащих к двум генетическим линиям: два вирулентных штамма CC65 (ST65 и ST2280) и авирулентный штамм ST48. Группа V включала в себя два вирулентных штамма сиквенс-типа ST23. Группа VI – один вирулентный штамм ST23. Группа VII – один вирулентный штамм ST86.

Сиквенс-типирование штаммов *K. pneumoniae* и их вирулентность для лабораторных животных подробнее описаны в Главе 4 данного исследования.

Таким образом, продемонстрирована значительная гетерогенность первичных последовательностей генов *ompK36* у клинических изолятов *K. pneumoniae*, а также наличие взаимосвязи этого признака с генетической линией и вирулентными свойствами изолятов.



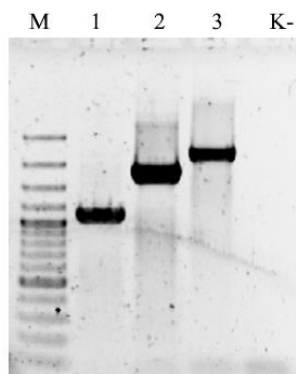
Точками обозначены вирулентные для мышей штаммы *K. pneumoniae*

Рисунок 3.6 – Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей генов пориновых белков клебсиелл

3.6 Влияние встраивания IS-элементов в ген порина *otrK36* на чувствительность к антибактериальным препаратам у госпитальных штаммов *K. pneumoniae*

3.6.1 Характеристика штаммов *K. pneumoniae* с инактивированным геном *otrK36*

Во время ПЦР детекции гена мажорного порина клебсиелл *OtrK36* у пяти штаммов, выделенных от пяти пациентов нейрореанимации, находящихся на ИВЛ, было отмечено увеличение размера продукта амплификации примерно на 1000 п.н. (таблица 3.2, рисунок 3.7).



М – маркер молекулярных масс ДНК Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); штаммы *K. pneumoniae* 1 – КРВ542/15; 2 – КРВ367К/15; 3 – КРВ2304К/15; К- – отрицательный контроль реакции

Рисунок 3.7 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *ompK36*

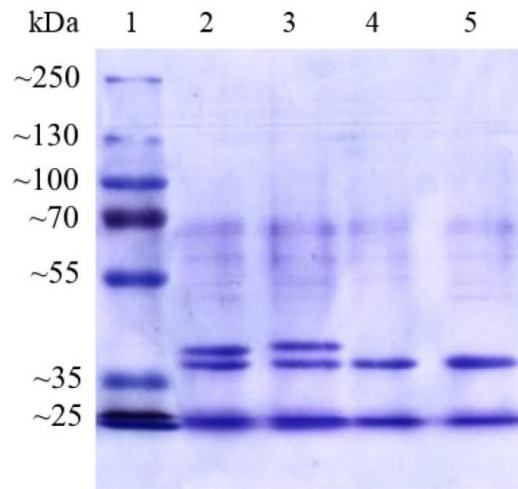
Таблица 3.2 Штаммы *K. pneumoniae*, несущие ген *ompK36* и ген *ompK36::IS*

| Штамм | Дата выделения | Источник выделения | Пациент | Устойчивость к классам АБП | R-генотип | IS элемент в гене <i>ompK36</i> |
|-------------|----------------|--------------------|---------|----------------------------------|-----------|---------------------------------|
| КРВ367К/15 | 02.03.15 | трахея | МГБ | BLA, TET, QNL, CM, AMI, NIT | R2b-01 | IS1 |
| КРВ2304К/15 | 21.12.15 | трахея | МДВ | BLA, QNL, CM, AMI, SUL, NIT | R3a-11 | IS10 |
| КРВ114/16 | 01.02.16 | моча | КМН | BLA, TET, QNL, CM, AMI, SUL, NIT | R3a-01 | IS1 |
| КРВ1237/16 | 02.08.16 | моча | БАА | BLA, TET, QNL, CM, AMI, SUL, NIT | R4a-01 | IS1 |
| КРВ2088/16 | 02.09.16 | ликвор | БМН | BLA, QNL, CM, AMI, SUL, NIT | R2c-01 | IS1 |
| КРВ542/15 | 30.03.15 | моча | ЦДС | BLA, QNL, AMI, PHO, SUL, NIT | R2b-01 | нет |
| КРВ2209/15 | 07.12.15 | трахея | МАВ | BLA, QNL, AMI, PHO, SUL, NIT | R3a-11 | нет |

Примечание: BLA – бета-лактамы, TET – тетрациклины, QNL – фторхинолоны, CM – фениколы, AMI – аминогликозиды, PHO – фосфомицины, NIT – нитрофураны

Штаммы *K. pneumoniae*, имеющие ген *ompK36* со вставкой IS-элементов, обладали МЛУ фенотипом и были устойчивы к шести-семи функциональным классам АБП (таблица 3.2). Эти штаммы несли гены бета-лактамаз *bla_{SHV}* (все штаммы), *bla_{CTX-M}* (штаммы КРВ367К/15, КРВ2304К/15, КРВ114/16 и КРВ1237/16), *bla_{TEM}* (штаммы КРВ2304К/15, КРВ114/16 и КРВ1237/16) и *bla_{OXA-48-like}* (штаммы КРВ1237/16 и КРВ2088/16), штамм *K. pneumoniae* КРВ2304К/15 содержал дополнительно интегрон класса 1, несущий набор генных кассет устойчивости к аминогликозидам, сульфаниламидам и с неизвестной функцией (*dfrA12-orfF-aadA2*). Данные штаммы

K. pneumoniae не продуцировали белок OmpK36, что было выявлено с помощью электрофоретического анализа мембранных белков (рисунок 3.8).



1 - маркер молекулярной массы белков от 10 до 250 кДа (Fermentas, Литва); штаммы *K. pneumoniae*: 2 - KPB542/15; 3 - KPB2226K/15; 4 - KPB367K/15; 5 - KPB2304K/15

Рисунок 3.8 – Электрофореграмма белков наружных мембран в 11 %-ном полиакриламидном геле

С помощью секвенирования последовательностей ДНК генов *ompK36* было обнаружено встраивание в данный ген IS-элементов: *IS1* - в четырех штаммах, а *IS10* - в одном штамме.

У штамма *K. pneumoniae* KPB367K/15, выделенного в марте 2015 г., была детектирована вставка *IS1R*-элемента, принадлежащего к семейству *IS1*, в позиции после 86 нуклеотида. Структура *IS1R*-элемента была идентична ранее описанному *IS1R*-элементу [GenBank J01730]. Данный IS-элемент имеет две открытые рамки считывания (ORF): гены транспозазы *TnpA* (276 п.н.) и транспозазы *TnpB* (525 п.н.), перекрывающиеся друг с другом на 103 п.н., уникальные прямые повторы (DR) размером 9 п.н. (сааагасgg) и инвертированные повторы размером по 50 п.н. – IRL (ggtgatgctgccaaactactgatttagtgtatgatggtgttttgaggtg) и IRR (tcgggcattatctgaacataaaacac tatcaataagttggagtcattacc) [GenBank KX347524]. Вставка *IS1R*-элемента в данном положении в гене *ompK36* ранее не была описана (рисунок 3.9). Встраивание *IS1*-элемента в штаммах *K. pneumoniae* KPB114/16, KPB1237/16 и KPB2088/16 произошло близко к месту посадки праймера OmpK36-F, из-за чего точное определение сайта встраивания IS-элемента данным методом секвенирования оказалось невозможным.

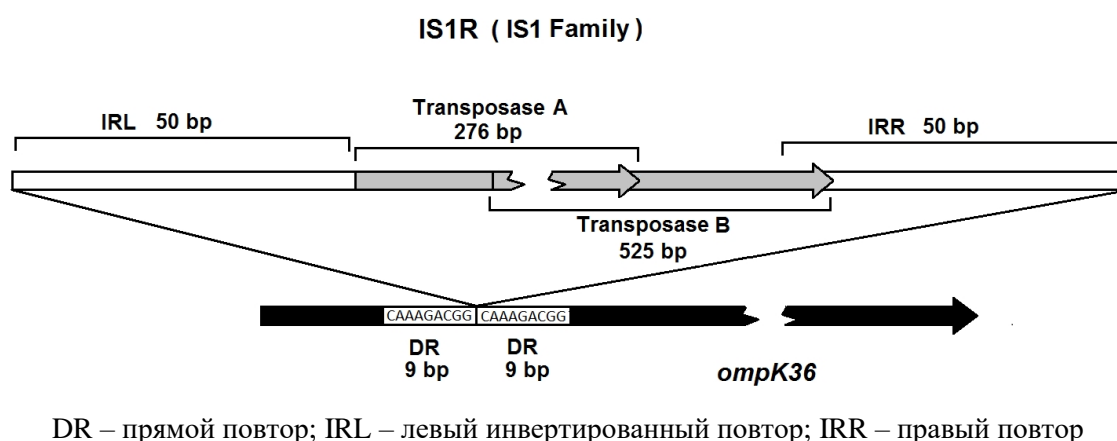


Рисунок 3.9 – Схема гена поринового белка *ompK36* со вставкой *IS1R*-элемента штамма *K. pneumoniae* КРВ367К/15

У штамма *K. pneumoniae* КРВ2304К/15, выделенного в декабре 2015 г., была детектирована вставка *IS10R*-элемента, принадлежащего к *IS10*-группе семейства *IS4*, в положении 41 п.н. Это первый случай обнаружения *IS4* семейства и *IS10* группы в гене *ompK36* *K. pneumoniae*. Данный *IS*-элемент характеризуется наличием уникальных прямых повторов (DR) размером 15 п.н. (ggtagcggctctgct), геном транспозазы размером 1209 п.н. и инвертированными повторами размером по 50 п.н. - IRL (ctgatgaatcccctaagtatttggtaaaaatcattaagttaaggtggat) и IRR (tttattcacacatggttacgctttgggga aattatgaggggatctctcag) [GenBank KX232456] (рисунок 3.1). Данный *IS10R*-элемент идентичен ранее известному *IS10R*-элементу, описанному у *Salmonella typhimurium* [GenBank J01829].

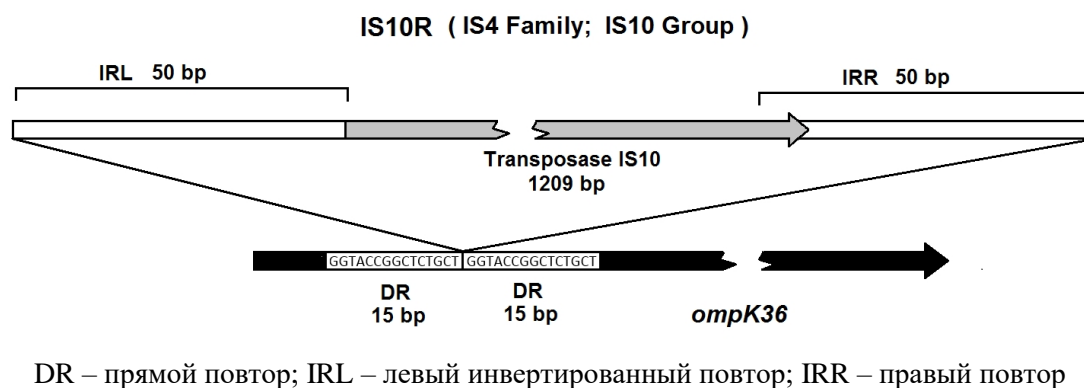


Рисунок 3.10 - Схема гена поринового белка *ompK36* со вставкой *IS10R*-элемента в штамме *K. pneumoniae* КРВ2304К/15

До нашего исследования было описано несколько случаев встраивания *IS*-элементов (*IS1*, *IS5*, *IS26*) в ген *ompK36* у вида *K. pneumoniae*. Авторы отмечали, что мутации в гене *ompK36*, вызванные встраиванием *IS*-элемента, приводили к прекращению экспрессии мажорного порина *Klebsiella* и появлению резистентности *K. pneumoniae* к карбапенемам [95, 171].

3.6.2 Клонирование гена *ompK36* и восстановление продукции порина OmpK36 в штамме *K. pneumoniae* KPB367K/15

Для клонирования гена *ompK36* был сконструирован плазмидный вектор pACYC-gfp на основе плазмиды pKK214GFP/ASV [28], которая была расщеплена рестриктазами PstI и EcoRI. Полученный фрагмент ДНК размером 826 п.н., содержащий ген *gfp* с последовательностью Шайна-Дальгарно (SD-последовательность), был лигирован с ДНК плазмиды pBlu2SK(-), обработанной теми же ферментами. Полученная плаزمида pBlu-gfp была расщеплена рестриктазами SmaI и SalI и лигирована с расщепленной рестриктазами EcoRV и SalI плазмидой pACYC184. Полученная в результате плазмида pACYC-gfp несла репортёрный ген *gfp/asn*, экспрессирующийся под контролем промотера гена *tet* (рисунок 3.11А). Ген *ompK36* амплифицировали в ПЦР с помощью специфичных праймеров *ompK36F* (5'-cca ctc cat atg aaa gtt aaa gta ctg tcc-3') и *ompK36R* (5'-gct ctc gag tta gaa ctg gta aac cag g-3'). В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штамма *K. pneumoniae* KPB542/15. Ампликон обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI и лигировали с обработанной рестриктазами NdeI и SalI и креветочной щелочной фосфатазой (SAP) плазмидной ДНК pACYC-gfp, в результате чего была получена гибридная плазмида pACYC-ompK36 (рисунок 3.11В). Полученным лигатом трансформировали компетентные клетки штаммов *E. coli* DH5α и *K. pneumoniae* KPB367K/15 методом криотрансформации [128]. Колонии отбирали на среде LB с добавлением хлорамфеникола в концентрации 20 мг/л. Клоны со вставкой отбирали ПЦР-скринингом с использованием праймеров, описанных выше. Выделяли плазмидную ДНК и проверяли соответствие последовательности клонированного гена исходной нуклеотидной последовательности гена *ompK36* секвенированием. Плазмидные профили штаммов представлены на рисунке 3.12.

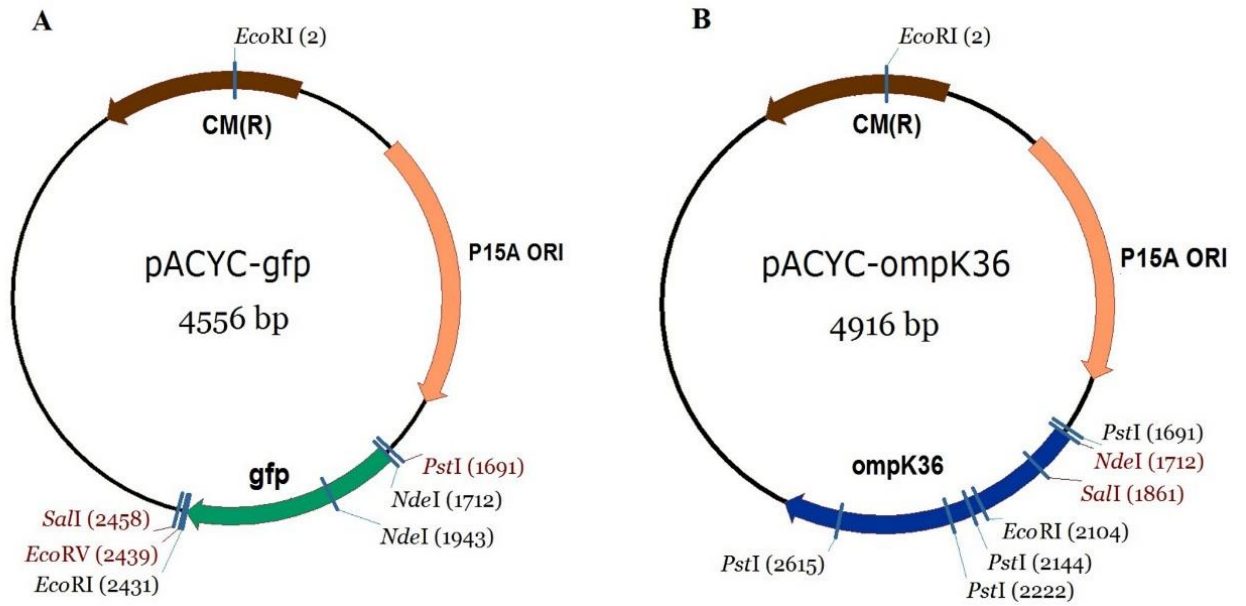
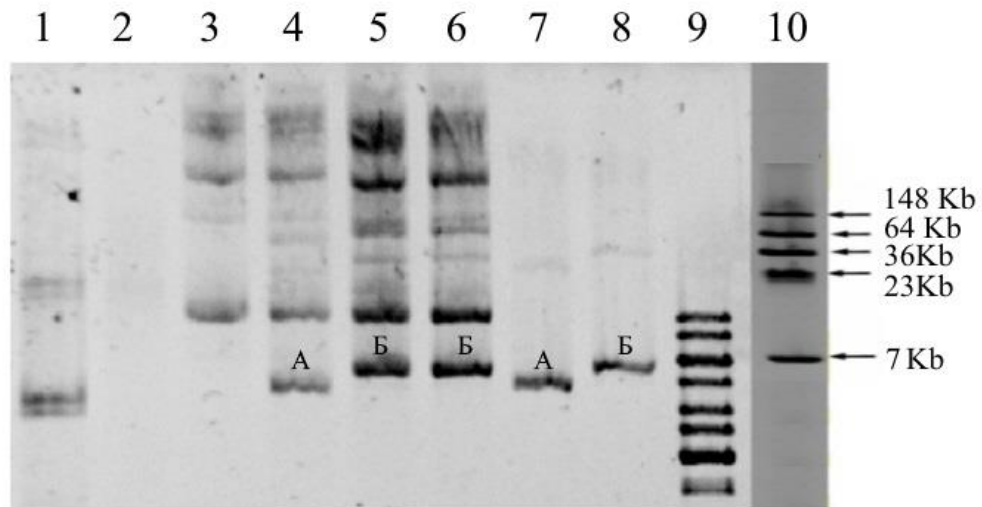


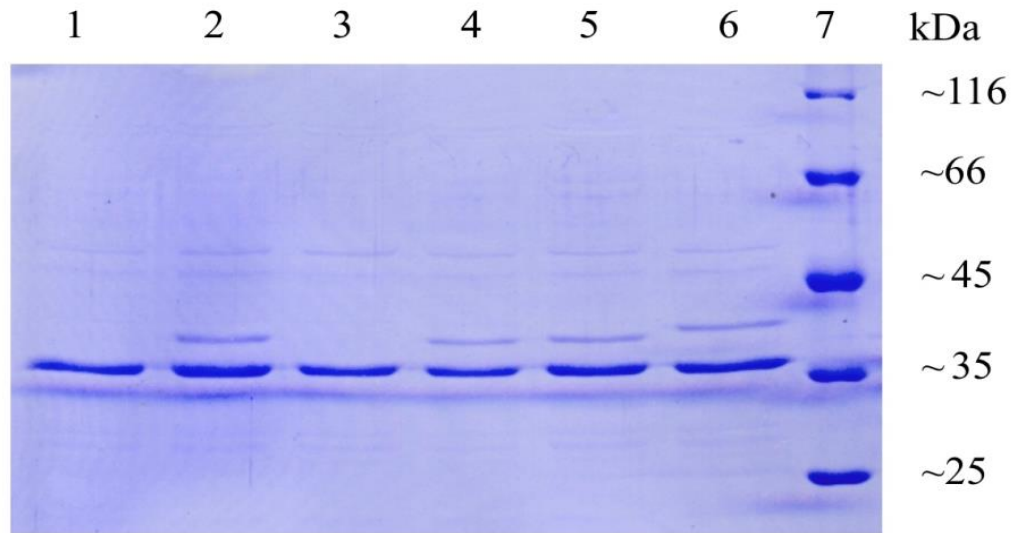
Рисунок 3.11 – Карта вектора pACYC-gfp (A) и гибридной плазмиды pACYCg-ompK36



Штаммы *K. pneumoniae*: 1 - КРВ542/15; 2 - КРВ2304К/15; 3 - КРВ367К/15; 4 - КРВ367К/15pACYC-gfp; 5 - КРВ367К/15pACYCg-ompK36-1; 6 - КРВ367К/15pACYCg-ompK36-2; штаммы *E. coli*: 7 - DH5 α pACYC-gfp; 8 - DH5 α pACYCg-ompK36; 9 - маркер молекулярных весов GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA); 10 - ДНК плазмид штамма *E. coli* NCTC 50192 (156, 66, 48 и 7 Kb); А - ДНК плазмиды pACYC-gfp; Б - ДНК плазмиды pACYCg-ompK36

Рисунок 3.12 – Плазмидные профили донорного и реципиентных штаммов *K. pneumoniae* и трансформантов *K. pneumoniae* и *E. coli*

Клетки штамма *K. pneumoniae* КРВ367К/15, несущие рекомбинантную плазмиду рАСУСg-ompK36, продуцировали пориновый белок OmpK36 (рисунок 3.13).



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

Рисунок 3.13 - Электрофореграмма белков наружных мембран штаммов *K. pneumoniae* в 11 %-ном полиакриламидном геле

3.6.3 Влияние продукции белка OmpK36 на фенотип антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*

Анализ МПК антибактериальных препаратов штаммов *K. pneumoniae* с разрушенным IS – элементами геном *ompK36* (КРВ2304/15 и КРВ367К/15), штамма-донора нативного гена *ompK36* (КРВ542/15) и трансформантов штамма *K. pneumoniae* КРВ367К/15 показал, что штаммы, продуцирующие белок OmpK36 были более чувствительны к имипенему по сравнению со штаммами, у которых продукция данного белка отсутствовала. В изогенных вариантах штамма КРВ367К/15, отличающихся наличием или отсутствием экспрессирующегося гена *ompK36*, МПК имипенема составляли <1 мг/л и 2 мг/л, соответственно (таблица 3.3).

Таблица 3.3 Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам

| АБП/ Штаммы | Штаммы <i>K. pneumoniae</i> OmpK36(-) | | | Штаммы <i>K. pneumoniae</i> OmpK36(+) | |
|----------------|---------------------------------------|------------|-------------------------|---------------------------------------|--------------|
| | КРВ2304К/15 | КРВ367К/15 | КРВ367К/15 pACYC-gfp | КРВ367К/15 pACYCg-ompK36 | КРВ542/15 |
| AMP | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 |
| SAM | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 |
| CXM | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| FOX | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| CAZ | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| CRO | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| CFP | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| FEP | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 | ≥64 |
| ERT | ND | ≥8 | ≥8 | ≥8 | ND |
| IPM | 2 | 2 | 2 | <1 | <1 |
| AMK | ≥64 | ≥64 | 32 | 32 | 4 |
| GEN | ≥16 | ≤1 | ≤1 | ≤1 | ≥16 |
| TOB | ND | ≥16 | ≥16 | ≥16 | ND |
| NAL | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 | ≥32 |
| CIP | ≥4 | ≥4 | ≥4 | ≥4 | ≥4 |
| TET | 4 | ≥16 | ≥16 | ≥16 | ND |
| TGC | ND | 4 | 4 | 4 | ND |
| CHL | ≥64 | 16 | ≥64 | ≥64 | ND |
| SXT | ≥320 | 40 | 40 | 40 | 80 |

Примечание: AMP, ампициллин; SAM, ампициллин-сульбактам; CXM, цефуроксим аксетил; FOX, цефокситин; CAZ, цефтазидим; CRO, цефтриаксон; CFP, цефоперазон-сульбактам; FEP, цефепим; ERT, эртапенем; IPM, имипенем; AMK, амикацин; GEN, гентамицин; TOB, тобрамицин; NAL, налидиксовая кислота; CIP, ципрофлоксацин; TET, тетрациклон; TGC, тигециклин; CHL, хлорамфеникол; SXT, триметоприм-сульфаметоксазол

3.6.4 Экспрессия генов бета-лактамаз в штаммах, отличающихся по наличию продукции поринового белка OmpK36

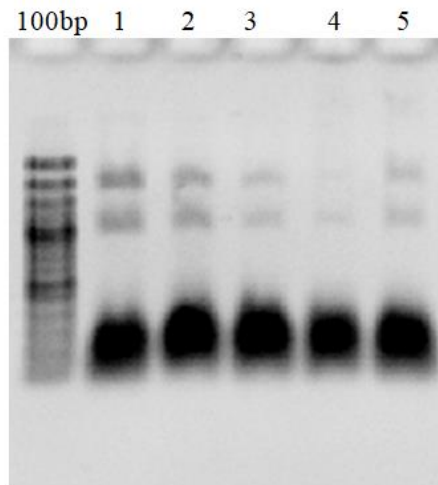
С целью получения информации о том, как продукция порина OmpK36 связана с экспрессией генов бета-лактамаз и чувствительностью к АБП, были изучены штаммы *K. pneumoniae* OmpK36-продуцирующие, OmpK36-непродуцирующие и штаммы с восстановленной продукцией порина OmpK36, полученные в результате трансформации. С помощью метода ОТ-ПЦР было показано, что OmpK36-продуцирующий штамм *K. pneumoniae* КРВ542/15 экспрессировал гены двух представленных в геноме бета-лактамаз (*bla_{SHV}* и *bla_{CTX-M}*), в то время как OmpK36-негативные штаммы *K. pneumoniae* КРВ367К/15 и КРВ2304К/15 проявляли слабый уровень экспрессии генов всех бета-лактамаз (рисунок 3.14, 3.15) В то же время, у

штамма *K. pneumoniae* КРВ367К/15рАСУСg-ompK36 с «восстановленной» продукцией порина OmpK36 был значительно повышен уровень экспрессии гена *bla*_{CTX-M}, по сравнению с исходным штаммом (таблица 3.4). Достоверность полученных результатов была подтверждена в трех повторностях эксперимента.

Таблица 3.4 Экспрессия генов бета-лактамаз в штаммах *K. pneumoniae*, продуцирующих и непродуцирующих пориновый белок OmpK36

| Штаммы <i>K. pneumoniae</i> | Гены бета- лактамаз | Наличие экспрессии гена | | |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|---------------|---------------|
| | | Эксперимент 1 | Эксперимент 2 | Эксперимент 3 |
| КРВ542/15 | <i>bla</i> _{SHV} | + | + | + |
| | <i>bla</i> _{CTX-M} | + | + | + |
| КРВ2304К/15 | <i>bla</i> _{TEM} | - | - | - |
| | <i>bla</i> _{SHV} | +/- | - | - |
| | <i>bla</i> _{CTX-M} | - | - | - |
| КРВ367К/15 | <i>bla</i> _{SHV} | +/- | +/- | +/- |
| | <i>bla</i> _{CTX-M} | +/- | +/- | +/- |
| КРВ367К/15 рАСУС-gfp | <i>bla</i> _{SHV} | +/- | - | - |
| | <i>bla</i> _{CTX-M} | +/- | +/- | +/- |
| КРВ367К/15 рАСУСg-ompK36 | <i>bla</i> _{SHV} | - | - | - |
| | <i>bla</i> _{CTX-M} | + | + | + |

Примечание: (+) - положительный результат ПЦР; (-) - негативный результат ПЦР; (+/-) - слабый положительный результат ПЦР



100bp – Маркер молекулярных масс ДНК Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); препараты гРНК штаммов *K. pneumoniae*: 1 – КРВ542/15; 2 – КРВ367К/15; 3 – КРВ2304К/15; 4 – КРВ367К/15 рАСУС-gfp; 5 – КРВ367К/15 рАСУСg-ompK36

Рисунок 3.14 – Электрофореграмма препаратов РНК, выделенных из штаммов *K. pneumoniae*

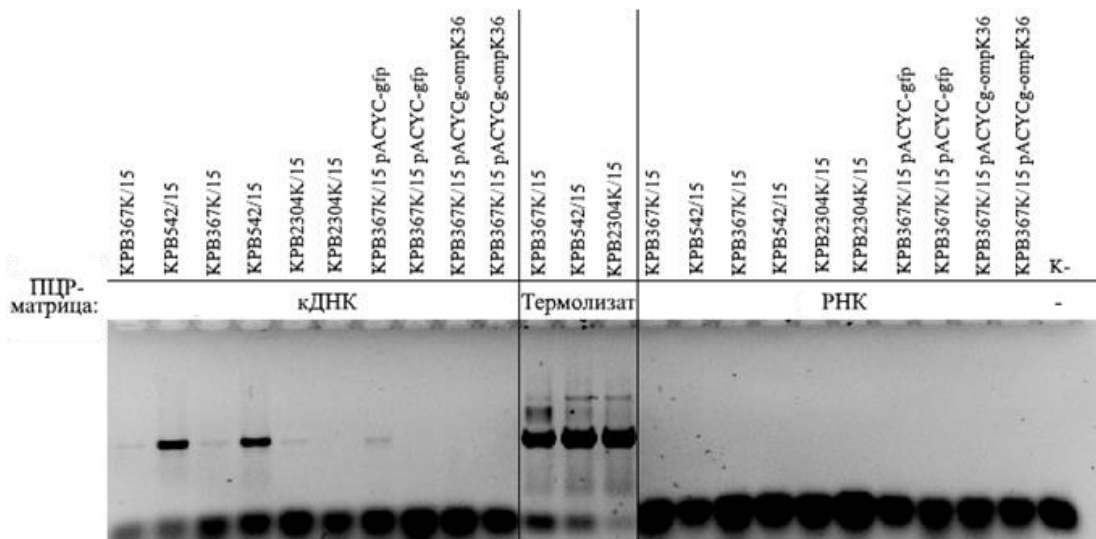


Рисунок 3.15 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *bla*_{SHV} в двух повторностях эксперимента

Таким образом, в пяти клинических изолятах *K. pneumoniae*, выделенных от разных пациентов нейрореанимации, было детектировано встраивание IS-элементов (*IS1* и *IS10*) в ген мажорного поринового белка клебсиелл *OmpK36*. Данные генетические события привели к инактивации гена *ompK36* в этих штаммах и к потере их способности продуцировать данный белок. С помощью трансформации *OmpK36*-непродуцирующего штамма *K. pneumoniae* KPB367K/15 векторной плазмидой, несущей клонированный нативный ген *ompK36* из *OmpK36*-продуцирующего штамма KPB542/15 были получены трансформанты *K. pneumoniae* с «восстановленной» продукцией белка *OmpK36*. В трансформантах зафиксировано повышение чувствительности к имипенему. Полученные данные подтверждают роль IS-элементов как одного из механизмов, регулирующих формирование лекарственно устойчивых штаммов у клебсиелл.

3.7 Оценка роли *K. pneumoniae* как источника распространения генов эпидемических карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} типа среди энтеробактерий в отделении нейрореанимации

3.7.1 Антибиотикорезистентность изолятов энтеробактерий, выделенные в 2013-2014 гг.

Антибиотикорезистентные изоляты энтеробактерий (n=146) были выделены от находящихся на ИВЛ пациентов нейрореанимации г. Москвы в период с января 2013 г.

по октябрь 2014 г (рисунок 3.16).

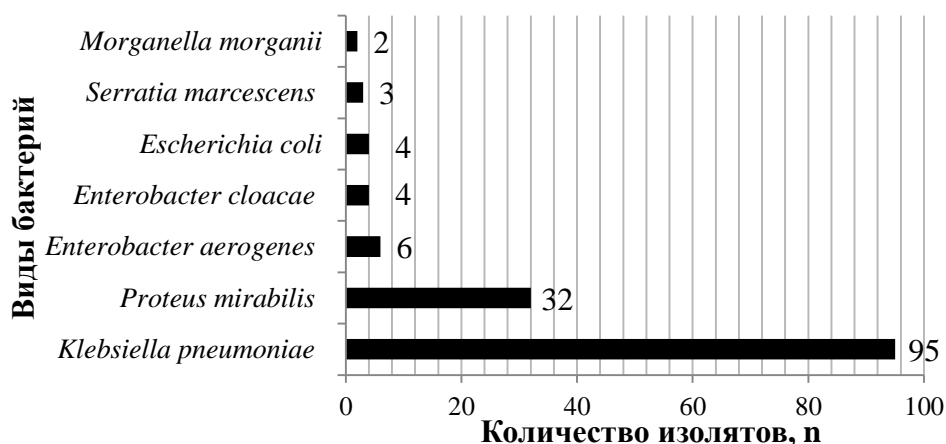


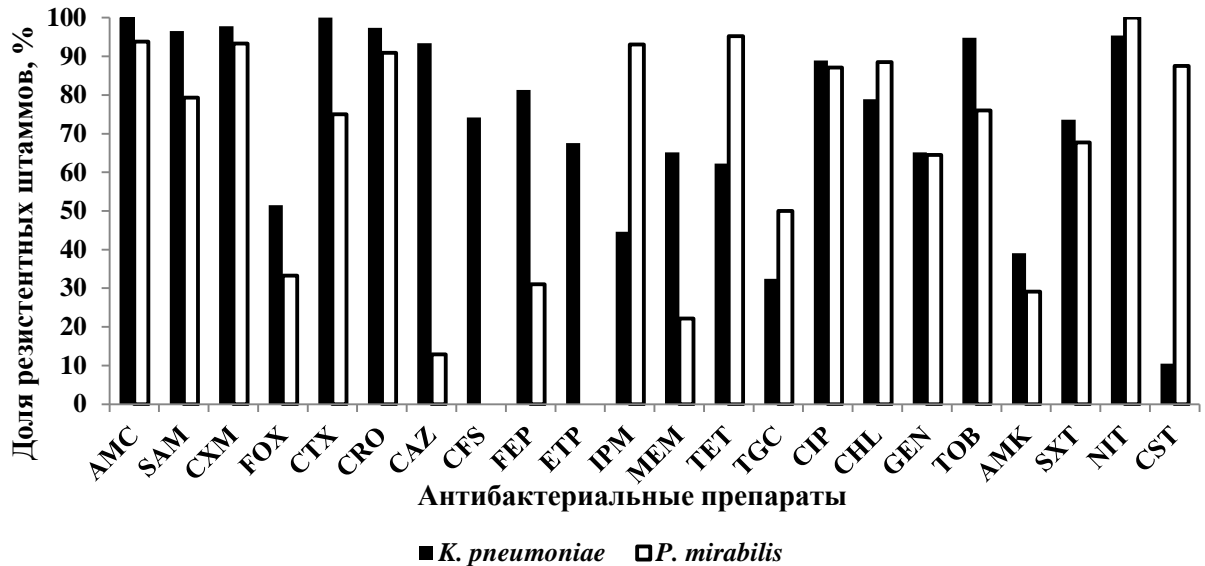
Рисунок 3.16 - Виды энтеробактерий, выделенных в ОРИТ в 2013-2014 гг.

Большая часть изолятов была выделена из органов дыхательной системы и мочи, что ассоциировано с наличием инвазивного вмешательства. Изоляты *K. pneumoniae* были выделены из органов дыхательной системы (47 %), мочи (40 %), ран (6 %), люмбального и вентрикулярного ликвора (4 %), крови (2 %) и кишечника (1 %). Большинство изолятов *P. mirabilis* были выделены из мочи (66 %), а также из органов дыхательной системы (25 %), ран (6 %) и крови (3 %). Изоляты *E. aerogenes* были выделены из ликвора (n=5) и эндотрахеального аспирата (n=1); изоляты *E. cloacae* – из эндотрахеального аспирата (n=3) и мочи (n=1).

Большинство изолятов *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* были устойчивы к применяемым АБП. Многие изоляты были устойчивы к тигециклину (32 % изолятов *K. pneumoniae* и 50 % изолятов *P. mirabilis*) и колистин (87 % *P. mirabilis*), которые применяют для лечения тяжелых госпитальных инфекций. Только один антибиотик, колистин, был эффективен против *K. pneumoniae* (90 % чувствительных изолятов). Три антибиотика были эффективны против изолятов *P. mirabilis*: к цефоперазону-сульбактаму и эртапенему были чувствительны все изучаемые изоляты, к цефтазидиму – 87 % (рисунок 3.17).

Большое количество изолятов *K. pneumoniae* (35,9 %) и *P. mirabilis* (54,8%) были мультирезистентными, устойчивыми к 7 функциональным классам АБП. Один изолят *E. aerogenes* был экстремально резистентным - устойчивым ко всем используемым АБП, за исключением тигециклина; три изолята были резистентны к цефалоспорином, карбапенемам и нитрофуранам; два изолята – были устойчивы только к нитрофуранам.

Среди *E. cloacae* был один изолят, чувствительный только к имипенему и амикацину, другие изоляты энтеробактерий были резистентны только к пенициллинам и цефалоспорином.



AMC, амоксициллин-клавулановая кислота; SAM, амоксициллин-сульбактам; CXM, цефуроксим; FOX, цефокситин; CTX, цефотаксим; CRO, цефтриаксон; CAZ, цефтазидим; CFS, цефоперазон-сульбактам; FEP, цефепим; ETP, эртапенем; IPM, имипенем; MEM, меропенем; TET, тетрациклин; TGC, тигециклин; CIP, ципрофлоксацин; CHL, хлорамфеникол; GEN, гентамицин; TOB, тобрамицин; AMK, амикацин; TMP, приметоприм; SXT, триметоприм-сульфаметоксазол; NIT, нитрофурантоин; CST, колистин

Рисунок 3.17 - Доля устойчивых к антибактериальным препаратам изолятов

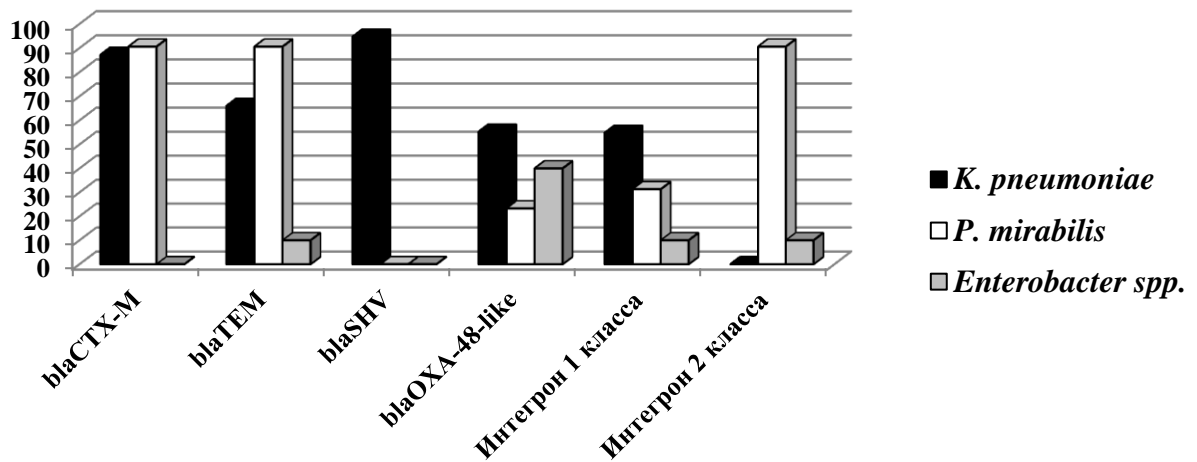
K. pneumoniae и *P. mirabilis*

Таким образом, в 2013-2014 гг. в нейрохирургическом ОРИТ г. Москвы циркулировали грамотрицательные возбудители госпитальных инфекций, отличающиеся высоким уровнем устойчивости к используемым АБП.

3.7.2 Гены антибиотикорезистентности изолятов энтеробактерий, выделенных в 2013-2014 гг.

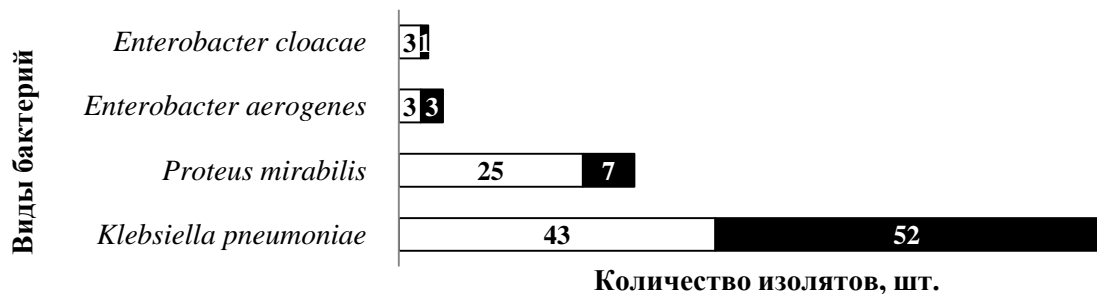
С помощью ПЦР-детекции генов устойчивости к АБП было показано, что у большинства изолятов видов *K. pneumoniae* (87 %) и *P. mirabilis* (91 %) был детектирован ген цефалоспорииназы bla_{CTX-M} (рисунок 3.18). Ген бета-лактамазы bla_{SHV} был детектирован только у *K. pneumoniae* (96 % изолятов). Ген карбапенемазы bla_{OXA-48}

like был обнаружен у 55 % изолятов *K. pneumoniae*, 23 % изолятов *P. mirabilis* и у 20 % изолятов *Enterobacter* spp. (рисунки 3.18 и 3.19).



K. pneumoniae (n=95), *P. mirabilis* (n=32), *Enterobacter* spp. (n=10)

Рисунок 3.18 - Представленность клинических изолятов энтеробактерий, несущих гены устойчивости к антибактериальным препаратам: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-48-like}, интегроны 1 и 2 классов



Заливка – наличие гена *bla*_{OXA-48-like}; нет заливки – отсутствие гена *bla*_{OXA-48-like}

Рисунок 3.19 – Количество бактериальных изолятов, несущих и не несущих ген карбапенемазы *bla*_{OXA-48-like}

Гены карбапенемаз *bla*_{NDM} и *bla*_{KPC} в данном исследовании обнаружены не были. Секвенирование последовательностей генов карбапенемазы OXA-48-типа позволило установить наличие аллели *bla*_{OXA-48} у изолятов *K. pneumoniae* (n=17), *P. mirabilis* (n=6) и *E. cloacae* (n=1); и аллели *bla*_{OXA-244} – у изолятов *K. pneumoniae* (n=4), *P. mirabilis* (n=1) и *E. aerogenes* (n=1). Интегроны 1 класса были детектированы у 55 % изолятов *K. pneumoniae* и у 31 % изолятов *P. mirabilis* (рисунок 3.18). Варибельные регионы интегронов класса 1 *K. pneumoniae* содержали три типа генетических кассет: (*dfrA1*-

orfC), (*dfrA17-aadA5*) и (*dfrA12-orfF-aadA2*). Интегроны класса 1 *P. mirabilis* несли 1 тип генетических кассет - (*dfrA17-aadA5*). Интегроны класса 2, детектированные у изолятов *P. mirabilis* (91 %), содержали 1 тип генетических кассет - (*dfrA12-sat2-aadA1*). Интегроны класса 1 и 2, детектированные у изолятов *E. cloacae* и *E. cloacae*, не содержали генетических кассет, что может рассматриваться в качестве резерва для дальнейшего накопления генетических кассет в интегронах. Описанные генетические кассеты интегროнов широко распространены в геномах бактерий, что отражается их представленностью в базе данных GenBank: на дату 01.05.2017 г. кассета *aadA1* размещена 4408 раз, *aadA2* – 3102 раза, *aadA5* – 935 раз, *dfrA1* – 2959 раз, *dfrA12* – 1203 раза, *orfF* – 398 раз, *dfrA17* – 950 раз, *orfC* – 789 раз, *sat2* – 190 раз.

Таким образом, изучаемые клинические штаммы энтеробактерий в большинстве своем несут в геномах детерминанты резистентности к бета-лактамам (гены бета-лактамаз) и к АБП других функциональных классов (интегроны 1 и 2 классов).

3.7.3 Разнообразии RAPD-генотипов клинических изолятов, выделенных в 2013-2014 гг.

Генотипирование *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* с помощью RAPD-ПЦР показало высокую гетерогенность популяции данных патогенов. Для 95 изолятов *K. pneumoniae* были определены 44 генотипа, а для 32 изолятов *P. mirabilis* – 8 генотипов. Четыре генотипа *K. pneumoniae* преобладали в разные периоды исследования: генотип K23 (n=14) был основным в 2013 г., генотип K26 (n=5) – в первой половине 2014 г., а генотипы K30 и K31 – во второй половине 2014 г. (рисунок 3.20).

Изоляты *K. pneumoniae* генотипов K23, K26 и K31 несли гены *bla*_{OXA-48-like}, в то время как изоляты генотипа K30 данный ген не содержали. Среди всех изолятов *P. mirabilis*, описанных в данном исследовании, преобладали изоляты P1-генотипа (n=23), несущие ген карбапенемазы *bla*_{OXA-48-like}. Два RAPD-генотипа были определены для изолятов *E. aerogenes* (E1 и E2), три изолята, несущие ген карбапенемазы *bla*_{OXA-244}, принадлежали к генотипу E1. К одному генотипу (E3) относились все изоляты *E. cloacae*, включая один, несущий ген *bla*_{OXA-48} (таблица 3.5).

В связи с наличием большого разнообразия RAPD-генотипов *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* невозможно определить единый источник распространения данных патогенов. Вероятно, наличие генов *bla*_{OXA-48-like} дает бактериям популяционное

преимущество на фоне селекционного давления антибиотикотерапии.

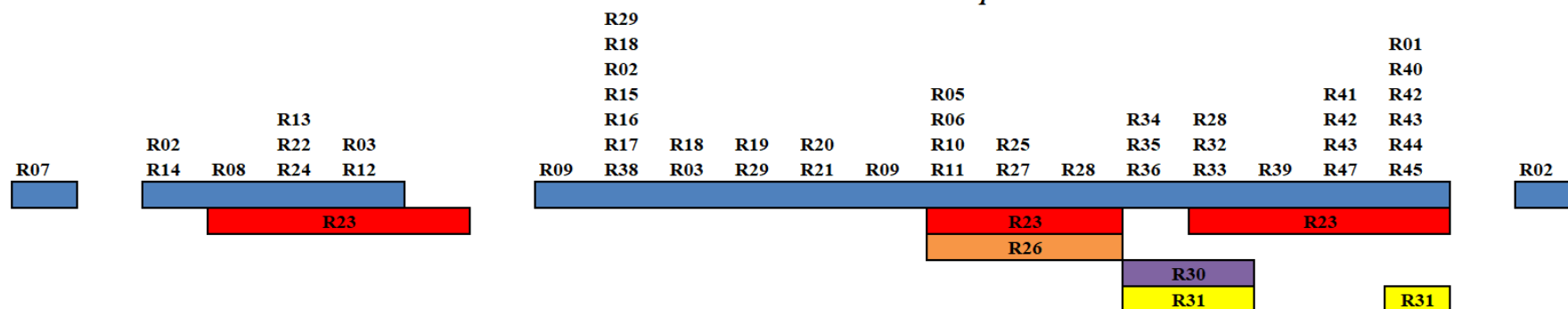
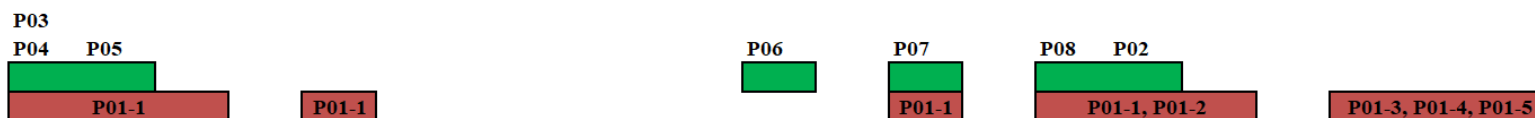
Полученные данные указывают на протекание двух эпидемических процессов в ОРИТ: с одной стороны – на постоянный приток клебсиелл с новыми генотипами из других отделений и лечебных учреждений; с другой стороны – на продолжительную циркуляцию эпидемически значимых генотипов внутри отделения.

3.7.4 Распространение генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} в госпитальной среде

Анализ распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} среди изолятов энтеробактерий, выделяемых в нейрореанимации, позволил высказать гипотезу о том, что источником данных генов являются *K. pneumoniae*, превалирующий вид грамотрицательных бактерий в отделении.

Впервые приобретение гена *bla*_{OXA-48} бактериями *K. pneumoniae* было зафиксировано у пациента К: изолят *K. pneumoniae* КРВ600, выделенный 21.05.2013 г. от данного пациента, принадлежал к К29-генотипу и не содержал ген *bla*_{OXA-48}, однако следующие два изолята КРВ1667 и КРВ1896 К29-генотипа, выделенные от этого пациента 31.10.2013 г. и 12.12.2013 г., уже несли в своих геномах ген *bla*_{OXA-48} (GenBank КР739836, КР739837).

Первый случай приобретения гена карбапенемазы *bla*_{OXA-48} изолятом *P. mirabilis* был отмечен через четыре 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 Н 27.02.2013 г. был выделен изолят *P. mirabilis* В-239 RAPD-генотипа P1₁, не содержащий ген *bla*_{OXA-48}, а 08.04.2013 г. от этого же пациента выделен изолят В431М, который приобрел ген *bla*_{OXA-48} (GenBank КJ579286).

RAPD-генотипы изолятов *Klebsiella pneumoniae*RAPD-генотипы изолятов *Proteus mirabilis*

Месяц, год: янв.13 фев.13 мар.13 апр.13 май.13 июн.13 июл.13 авг.13 сен.13 окт.13 ноя.13 дек.13 янв.14 фев.14 мар.14 апр.14 май.14 июн.14 июл.14 авг.14 сен.14 окт.14 ноя.14 дек.14

Рисунок 3.20 – Динамика представленности RAPD-генотипов *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* в нейрохирургическом ОРИТ г. Москвы в 2013-2014 гг.

Таблица 3.5 – Характеристики изолятов *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* и *Enterobacter* spp., выделенных от пациентов ОРИТ в 2013-2014 гг.

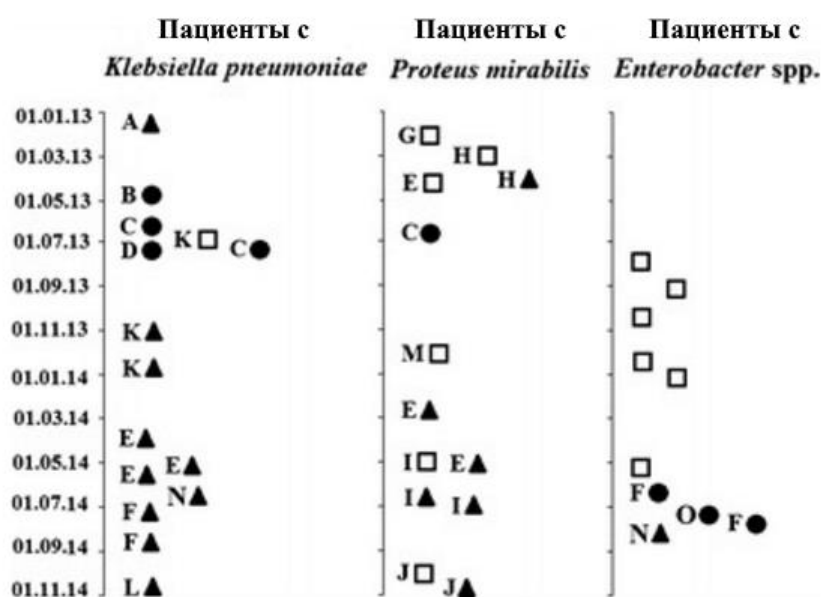
| Вид | Штамм | Дата выделения | Источник выделения | Пациент | <i>bla</i> _{TEM} | <i>bla</i> _{SHV} | <i>bla</i> _{CTX-M} | <i>bla</i> _{OXA-48-like} | <i>int1</i> | <i>ins1</i> | <i>int2</i> | <i>ins2</i> | Устойчивость к АБП | RAPD-тип |
|----------------------|---------|----------------|--------------------|---------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------------------------------|----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
| <i>K. pneumoniae</i> | KPB38 | 15.01.13 | М | А | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM SUL NIT | K7 |
| | KPB500 | 24.04.13 | ЭА | В | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-244} | + | - | - | - | PEN CEF TET QNL CM SUL NIT | K23 |
| | KPB567 | 21.05.13 | М | С | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-244} | + | - | - | - | PEN CEF CRP QNL SUL NIT | K23a |
| | KPB600 | 21.05.13 | ЭА | К | + | + | + | - | - | - | - | - | PEN CEF QNL AMI SUL NIT | K29 |
| | KPB757K | 13.06.13 | М | С | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-244} | + | - | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | K23 |
| | KPB811K | 16.07.13 | ИС | Д | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-244} | + | + | - | - | PEN CEF CRP QNL SUL NIT | K1 |
| | KPB1667 | 31.10.13 | М | К | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | - | - | PEN CEF QNL CM AMI SUL NIT | K29 |

Продолжение таблицы 3.5

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 |
|----------------------|-------------|----------|----|---|---|---|------------------------------|-------------------------------|----|----|----|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | КРВ1896 | 12.12.13 | М | К | + | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | K29 |
| | КРВ481/14 | 25.03.14 | М | Е | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | - | - | - | PEN CEF CRP QNL CM AMI NIT | K23 |
| | КРВ617/14 | 25.04.14 | М | Е | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | - | - | - | PEN CEF CRP QNL CM AMI NIT | K23 |
| | КРВ690/14К | 06.05.14 | М | Е | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | - | - | - | PEN CEF CRP QNL CM AMI NIT | K23 |
| | КРВ767/14 | 27.05.14 | ЭА | Н | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | K28 |
| | КРВ941/14 | 24.06.14 | ЭА | Ф | + | + | - | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | - | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | K36 |
| | КРВR1a | 10.07.14 | РМ | Ф | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | - | - | PEN CEF CRP TET CM AMI SUL | K31 |
| | КРВ1699/14К | 23.10.14 | ЭА | Л | - | + | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | - | - | PEN CEF CRP QNL CM AMI NIT | K31 |
| <i>P. mirabilis</i> | В123 | 07.02.13 | М | Г | + | - | + | - | + | + | + | + | PEN CEF CRP QNL CM AMI SUL NIT COL | P3 |
| | В239 | 27.02.13 | ЭА | Н | + | - | + | - | + | + | + | + | PEN CEF CRP QNL CM AMI SUL NIT COL | P1 ₁ |
| | В371 | 28.03.13 | М | Е | + | - | + | - | - | - | + | + | PEN CEF CRP QNL CM NIT COL | P1 ₁ |
| | В431 М | 08.04.13 | ЭА | Н | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | + | + | PEN CEF CRP QNL CM AMI SUL NIT COL | P1 ₁ |
| | В757 М | 13.06.13 | М | С | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-244} | - | - | + | + | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI Nf | P1 ₁ |
| | В1939 | 17.12.13 | Р | М | + | - | + | - | - | - | + | + | PEN CEF CRP QNL CM AMI SUL NIT | P6 |
| | В416/14 | 13.02.14 | М | Е | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | + | - | PEN CEF CRP TET QNL CM NIT | P1 ₁ |
| | В690/14М | 06.05.14 | М | Е | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | + | + | PEN CEF CRP TET QNL CM NIT | P1 ₁ |
| | В712/14М | 12.05.14 | М | Е | + | - | + | - | - | - | + | + | PEN CEF TET QNL CM NIT | P1 ₂ |
| | В682/14 | 06.05.14 | ЭА | И | + | - | + | - | + | + | + | + | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | P1 ₂ |
| | В799/14 | 26.05.14 | ЭА | И | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | + | + | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | P1 ₂ |
| | В828/14 | 02.06.14 | ЭА | И | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | + | + | + | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | P1 ₂ |
| | В1578/14 | 01.09.14 | М | Ж | + | - | + | - | - | - | + | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | P1 ₅ |
| В1672/14 | 20.10.14 | М | Ж | + | - | + | <i>bla</i> _{OXA-48} | - | - | + | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | P1 ₅ | |
| <i>E. aerogenes</i> | В2012/14 | 17.06.14 | Л | Ф | + | - | - | <i>bla</i> _{OXA-244} | - | - | - | - | PEN CEF CRP NIT | E1 |
| | В2137/14Е | 25.06.14 | Л | О | - | - | - | <i>bla</i> _{OXA-244} | - | - | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | E1 |
| | В2212/14 | 30.06.14 | Л | Ф | - | - | - | <i>bla</i> _{OXA-244} | - | - | - | - | PEN CEF CRP NIT | E1 |
| <i>E. cloacae</i> | В1530/14 | 30.08.14 | М | Н | - | - | - | <i>bla</i> _{OXA-48} | + | - | - | - | PEN CEF CRP TET QNL CM AMI SUL NIT | E3 |

Примечание: ЭА – эндотрахеальный аспират; ИС – интракраниальный синус; Л – ликвор; РМ – ректальный мазок; М – моча; Р – рана; А, В, С, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N и O – пациенты; *bla*_{OXA-244}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} – гены бета-лактамаз; *int1* – ген интегразы класса 1; *ins1* – генетические кассеты интегрона класса 1; *int2* – ген интегразы 2 класса; *ins2* – генетические кассеты интегрона класса 2; PEN – пенициллины; CEF – цефалоспорины; CRP – карбапенемы; TET – тетрациклины; QNL - фторхинолоны, CM -фениколы, AMI - аминогликозиды, SUL – сульфаниламиды; NIT – нитрофураны; «+» позитивный; «-» негативный

Аналогичный случай передачи описан для гена $bla_{OXA-244}$ на примере пациента С: в мае-июне 2013 г. в моче данного пациента были идентифицированы штаммы *K. pneumoniae* КРВ567 и КРВ757К RAPD-типа К23 с геном $bla_{OXA-244}$ (GenBank КР739835, КМ058746), а 13.06.2013 г. ген $bla_{OXA-244}$ был обнаружен в штамме *P. mirabilis* В757М (GenBank КJ579285), выделенного из мочи этого пациента (рисунок 3.21). Ген $bla_{OXA-244}$, отличающийся от гена bla_{OXA-48} одной нуклеотидной заменой, впервые был описан в работе испанских исследователей в 2013 г. [138]. Ретроспективный эпидемиологический анализ не выявил связи между возникновением аллели $bla_{OXA-244}$ в России и Испании.



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, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N и O

Рисунок 3.21 - 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

Первый случай обнаружения нами гена $bla_{OXA-244}$ в изоляте *E. aerogenes* В2012/14 был зафиксирован 17.06.2014 г. у пациента F (GenBank КР205557), т.е. через 18 месяцев после начала исследования. Первый случай детекции гена bla_{OXA-48} в изоляте *E. cloacae* В1530/14 (GenBank КР056311) был описан 30.08.2014 г. у пациента O, после 20 месяцев с начала исследования (рисунок 3.21).

Дополнительным доказательством данной гипотезы является одновременное выделение $bla_{OXA-244}$ -позитивных изолятов *K. pneumoniae* и *P. mirabilis* из мочи

пациента С, а также изолятов *bla*_{OXA-48}-позитивных изолятов *K. pneumoniae* and *E. cloacae*, выделенных из эндотрахеального аспирата и мочи пациента N. К сожалению, с помощью данной гипотезы нельзя объяснить одновременное выделение *bla*_{OXA-48}-позитивных изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из эндотрахеального аспирата и фекалий пациента F и *bla*_{OXA-244}-позитивных изолятов *E. aerogenes*, выделенных из ликвора данного пациента.

Распространение генов *bla*_{OXA-48-like} среди энтеробактерий продолжилось в 2015 г.: в сентябре 2015 г. от двух пациентов нейрохирургического отделения г. Москвы из ликвора и эндотрахеального аспирата были выделены две культуры *Serratia marcescens* B1673/15 и B1693/15, несущие ген *bla*_{OXA-48} (GenBank KU821689, KU821690).

Таким образом, в течение 2013-2015 гг. зафиксировано одновременное параллельное распространение двух аллелей карбапенемазы *bla*_{OXA-48-like} среди нескольких видов энтеробактерий в отделении ОРИТ г. Москвы.

3.7.5 Плазмидная локализация генов *bla*_{OXA-48-like}

Плазмидная локализация генов *bla*_{OXA-244} в штаммах *K. pneumoniae* KPB500 и KPB757K доказана с помощью внутри- и межвидовой конъюгативной передачи этих генов в реципиентные штаммы *K. pneumoniae* KPM9 Rif^R и *E. coli* HB101 Rif^R. Отбор трансконъюгантов был основан на том, что донорные штаммы были устойчивы к 100 мг/л цефотаксима (CTX), а реципиентные - к рифампицину (RIF) в концентрации 350 мг/л. Трансконъюганты были устойчивы к обоим антибиотикам (таблица 3.6).

Локализация генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} на конъюгативной плазмиде группы несовместимости IncL/M была описана ранее в литературе [147, 148]. ПЦР-детекция специфических маркеров плазмиды IncL/M - *repA* и *traU* – в изучаемой коллекции показала наличие этих маркеров во всех *bla*_{OXA-48-like}-позитивных изолятах *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* и *Enterobacter* spp. и отсутствие маркеров в *bla*_{OXA-48-like}-негативных изолятах. Таким образом, все гены *bla*_{OXA-48-like} в изучаемых клинических изолятах были локализованы на конъюгативной плазмиде IncL/M.

Эффективность внутривидовой конъюгации составила $2,0-3,0 \times 10^{-3}$, а межвидовой – $2,0-8,5 \times 10^{-4}$. Распределение генетических маркеров в клетках трансконъюгантов показало, что оба штамма-донора *K. pneumoniae* содержали по две конъюгативные

плазмиды: плазмиду IncL/M, несущую гены $bla_{OXA-244}$, $repA$ и $traU$, и плазмиду IncFII, на которой были расположены гены bla_{CTX-M} , bla_{TEM} и $int1$ (таблица 3.6, рисунок 3.22).

Таблица 3.6 Конъюгативная передача генетических маркеров плазмиды IncL/M, генов бета-лактамаз, интегროнов и генов поринов

| Штамм | Эффективность конъюгации | Генетические маркеры | | | | | | | | Группы несовместимости |
|---------------------------------|--------------------------|----------------------|-------------|-----------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------|---------------|------------------------|
| | | <i>repA</i> | <i>traU</i> | <i>bla</i> OXA-244 | <i>bla</i> CTX-M | <i>bla</i> TEM | <i>bla</i> SHV | <i>int1</i> | <i>ompK36</i> | |
| Донорные штаммы | | | | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> KPB500 | - | + | + | + | + | + | + | + | + | L/M, FII |
| <i>K. pneumoniae</i> KPB757K | - | + | + | + | + | + | + | + | + | L/M, FII |
| Реципиентные штаммы | | | | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> KPM9 Rif | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| <i>E. coli</i> HB101 Rif | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Трансконоъюганты | | | | | | | | | | |
| <i>K. pneumoniae</i> KPM9p500-1 | $2,0 \times 10^{-4}$ | + | + | + | + | + | + | + | + | L/M, FII |
| <i>K. pneumoniae</i> KPM9p500-2 | $2,0 \times 10^{-4}$ | - | - | - | + | + | + | + | + | FII |
| <i>E. coli</i> HB101p500-1 | $2,0 \times 10^{-3}$ | + | + | + | - | - | - | - | - | L/M |
| <i>K. pneumoniae</i> KPM9p757-1 | $8,5 \times 10^{-4}$ | + | + | + | + | + | + | + | + | L/M, FII |
| <i>K. pneumoniae</i> KPM9p757-2 | $8,5 \times 10^{-4}$ | - | - | - | + | + | + | + | + | FII |
| <i>E. coli</i> HB101p757-1 | $3,0 \times 10^{-3}$ | + | + | + | - | - | - | - | - | L/M |

Примечание: *repA*, *traU* – генетические маркеры плазмиды группы IncL/M; $bla_{OXA-244}$, bla_{CTX-M} , bla_{TEM} , bla_{SHV} – гены бета-лактамаз; *int1* – ген интегразы класса 1; *ompK36* – ген мажорного поринового белка клебсиелл *OmpK36*; «+» - положительный; «-» - отрицательный; L/M – наличие конъюгативной плазмиды группы IncL/M; FII – наличие конъюгативной плазмиды группы IncFII

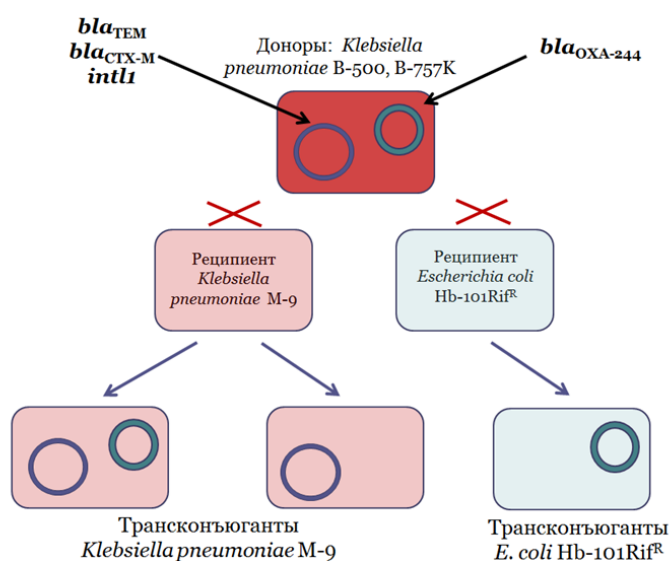
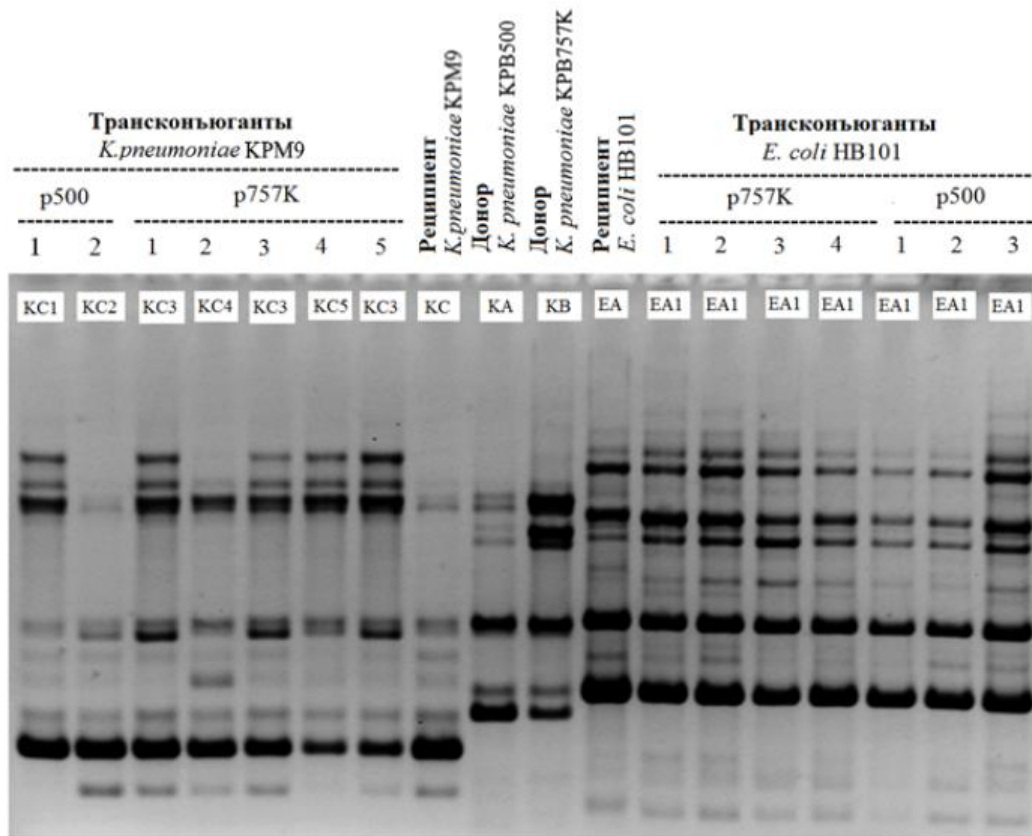


Рисунок 3.22 - Схема эксперимента внутри- и межвидового переноса генов антибиотикорезистентности в составе конъюгативных плазмид

Дополнительно факт конъюгативного переноса плазмид был подтвержден с помощью RAPD-типирования штаммов-доноров, реципиентов и трансконоъюгантов. Донорные штаммы *K. pneumoniae* КРВ500 и КРВ757К принадлежали к RAPD-генотипам КА и КВ, соответственно. RAPD-профили реципиентных штаммов *K. pneumoniae* КРМ9 Rif^R (КС) и *E. coli* НВ101 Rif^R (ЕА) значительно отличались от таковых штаммов-доноров. Все трансконоъюганты *E. coli* принадлежали к одному RAPD-генотипу ЕА1, близкому к RAPD-генотипу ЕА исходного штамма. Трансконоъюганты *K. pneumoniae* также имели RAPD-профили, сходные с RAPD-профилем КС реципиента, но между ними отмечалась варибельность: были определены пять RAPD-подтипов КС1, КС2, КС3, КС4 и КС5, что, по-видимому, связано с наличием в них разных наборов переданных плазмид (рисунок 3.23).



RAPD-PCR (праймеры 1247)

Рисунок 3.23 – RAPD-профили штаммов-доноров, реципиентов и трансконоъюгантов

Таким образом, было показано, что гены *bla*_{OXA-48-like} в изучаемой коллекции клинических изолятов *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* и *Enterobacter* spp., выделенных в нейрохирургическом ОРИТ г. Москвы в 2013-2014 гг., были локализованы на конъюгативной плазмиде группы несовместимости IncL/M.

В результате экспериментального конъюгативного переноса плазмид было доказано, что ген *bla*_{OXA-244} и гены *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} и интегрон 1 класса располагаются на разных плазмидах, которые могут передаваться как между бактериями вида *K. pneumoniae*, так и в бактерии других видов энтеробактерий, в связи с чем бактерии вида *K. pneumoniae* можно считать источником распространения генов карбапенемазы *bla*_{OXA-48-like}.

3.8 Клинические штаммы *K. pneumoniae*, несущие ген эпидемической карбапенемазы *bla*_{NDM-1}, выделенные в г. Москве в 2016 г.

В течение всего периода нашего исследования с января 2013 г. до марта 2016 г. нами не было зафиксировано ни одного случая детекции гена карбапенемазы класса В NDM-типа в штаммах *K. pneumoniae*, однако с марта по декабрь 2016 г. из эндотрахеального аспирата и мочи шести пациентов отделения нейрореанимации г. Москвы были выделены девять штаммов *K. pneumoniae* с геном *bla*_{NDM-1} (таблица 3.7).

На основании данных web-ресурса «AMRmap» (<http://map.antibiotic.ru/>), содержащего результаты исследований Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИАХ) Смоленского государственного медицинского университета и Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), штаммы *K. pneumoniae*, несущие карбапенемазы NDM-типа, на территории России впервые были выделены в декабре 2013 г. в г. Москве, к настоящему времени в базе данных размещены 18 штаммов. Эпидемическое распространение NDM-1 продуцирующих штаммов отмечено в г. Санкт-Петербург [26, 30].

Таблица 3.7 Характеристика чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, несущих ген *bla*_{NDM-1}

| Штамм | Дата выделения | Источник выделения | Пациент | МПК антибиотиков, мг/л | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------|--------------------|---------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | | | | AMC | AMS | CEF | CEX | CTA | CAZ | CPS | FEP | IMI | TET | TGC | CIP | CM | GEN | TOB | AMI | CTZ | NIT |
| КРВ417/16 | 28.03.16 | аспират | БМН | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 1 | >4 | 4 | >16 | ND | >64 | <20 | 128 |
| КРВ1470/16 | 05.09.16 | аспират | ЛНС | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 2 | >4 | >64 | >16 | >16 | >64 | <20 | 128 |
| КРВ1570/16 | 20.09.16 | аспират | ЖНА | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 2 | >4 | >64 | >16 | >16 | >64 | <20 | 128 |
| КРВ1617/16 | 26.09.16 | аспират | ЛНС | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 2 | >4 | >64 | >16 | >16 | >64 | <20 | 128 |
| КРВ1762/16 | 18.10.16 | моча | БЕК | >32 | >32 | >64 | 16 | >64 | >64 | >64 | >64 | >16 | >16 | >8 | >4 | >64 | 4 | >16 | >64 | 160 | 128 |
| КРВ1781/16 | 21.10.16 | моча | БЕК | >32 | >32 | >64 | 16 | >64 | >64 | >64 | >64 | 8 | ND | ND | >4 | ND | 4 | ND | >64 | 80 | 128 |
| КРВ1829/16 | 02.11.16 | моча | МВА | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >16 | 8 | >8 | >4 | >64 | 4 | >16 | >64 | >320 | 256 |
| КРВ1940/16 | 16.11.16 | моча | МВА | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >16 | >16 | >8 | >4 | >64 | >16 | >16 | >64 | >320 | 256 |
| КРВ2086/16 | 13.12.16 | моча | ФВП | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >64 | >16 | >16 | ND | >4 | >64 | 4 | ND | >64 | 80 | 256 |

Примечание: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота; AMS – амоксициллин/сульбактам; CEF – цефуроксим; CEX – цефокситин; CTA – цефтриаксон; CAZ – цефтазидим; CPS – цефоперазон/сульбактам; FEP – цефепим; IMI – имипенем; TET – тетрациклин; TGC – тигециклин; CIP – ципрофлоксацин; CM – хлорамфеникол; GEN – гентамицин; TOB – тобрамицин; AMI – амикацин; CTZ – ко-тримоксазол; NIT – нитрофурантоин; ND – нет данных; зеленым цветом выделены МПК чувствительной культуры, желтым цветом – промежуточно-устойчивой

3.8.1 Чувствительность к антибактериальным препаратам клинических штаммов

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

Штаммы *K. pneumoniae* с геном карбапенемазы bla_{NDM-1} обладали высоким уровнем устойчивости к АБП. Первый штамм, *K. pneumoniae* КРВ417/16, несущий ген bla_{NDM-1} (GenBank KX218441), был устойчив к препаратам четырех классов АБП – бета-лактамам, фторхинолонам, аминогликозидам и нитрофуранам, но сохранял чувствительность к тетрациклину, тигециклину, хлорамфениколу и ко-тримоксазолу. Штаммы с геном bla_{NDM-1} , выделенные в сентябре 2016 г. (КРВ1470/16, КРВ1570/16 и КРВ1617/16) отличались от первого штамма устойчивостью к хлорамфениколу (таблица 3.7). Штаммы *K. pneumoniae* КРВ1762/16 и КРВ1781/16, выделенные из мочи одного пациента в октябре 2016 г., были чувствительны к гентамицину, что отличает их от первых четырех штаммов. Подобным по чувствительности к АБП был штамм *K. pneumoniae* КРВ2086/16, выделенный из мочи другого пациента в декабре 2016 г. В ноябре 2016 г. от еще одного пациента нейрореанимации были выделены два штамма с геном bla_{NDM-1} – КРВ1829/16 и КРВ1940/16, первый из которых, как и штаммы, выделенные в октябре, был чувствителен к гентамицину, но второй являлся устойчивым ко всем исследуемым лекарственным препаратам, то есть может быть отнесен к категории пан-резистентных патогенов (таблица 3.7).

Экспрессия металло-бета-лактамазы NDM-1 в штамме *K. pneumoniae* КРВ417/16 была выявлена с помощью «метода двойных дисков с этилендиаминтетраацетатом (ЭДТА)» и «метода комбинированных дисков» [18], которые основаны на выявлении синергизма между бета-лактамами, в частности, карбапенемами, являющимися субстратом для металло-бета-лактамаз, и ЭДТА, который хелатирует ион цинка, ингибируя фермент карбапенемазу. Увеличение зоны задержки роста штамма *K. pneumoniae* КРВ417/16 между дисками с бета-лактамами и диском с ЭДТА в центре, что указывает на экспрессию гена bla_{NDM-1} и продукцию штаммом фермента карбапенемазы NDM-1 (рисунок 3.24).



А – метод двойных дисков и ЭДТА; Б – метод комбинированных дисков; диски с: 1 – имипенемом (10 мкг); 2 – меропенемом (10 мкг); 3 – цефепимом (20 мкг); 4 – дорипенемом (10 мкг); 5 – 5 мкл 0,5М ЭДТА (pH-8,0); 6 – 5 мкл физиологического раствора

Рисунок 3.24 – Ингибирование с помощью ЭДТА карбапенемазы NDM-1 в штамме *K. pneumoniae* КРВ417/16

3.8.2 Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген карбапенемазы bla_{NDM-1}

В результате ПЦР-детекции генетических детерминант устойчивости к АБП было выявлено, что все изучаемые штаммы-носители гена bla_{NDM-1} (n=9) имели дополнительно гены других бета-лактамаз: bla_{TEM} , bla_{SHV} и bla_{CTX-M} , а также ген поринового белка $ompK36$ и ген интегразы 1 класса с наборами генных кассет: у 8 штаммов - ($dfrA12-orfF-aadA2$) и у 1 штамма - ($dfrA12-orfF-ant3$). В трех штаммах дополнительно выявлены интегроны класса 1, не несущие наборов генных кассет, которые могут рассматриваться как резерв для накопления новых детерминант резистентности. Штамм *K. pneumoniae* КРВ417/16 отличался от других клебсиелл этой группы наличием у него гена карбапенемазы класса D $bla_{OXA-48-like}$, то есть штамм содержал пять генов бета-лактамаз, интегрон 1 класса и ген поринового белка $ompK36$.

Таким образом, в ходе исследования нами зафиксировано изменение молекулярно-эпидемиологической ситуации – расширился спектр эпидемически значимых бета-лактамаз, циркулирующих в госпитальной среде отделения нейрореанимации, а именно, отмечено появление гена метало-бета-лактамазы NDM-1.

3.9 Изучение носительства грамотрицательных бактерий и генов антибиотикорезистентности у пациентов нейрореанимации г. Москвы в рамках трех одномоментных исследований в 2015 г.

В нейрореанимации г. Москвы в 2015 г. были проведены три одномоментных обследования пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких (ИВЛ): 29 января, 3 июня и 13 ноября 2015 г. Исследование заключалось в заборе трахеальных и ректальных мазков, а также в третьем исследовании дополнительно мочи, у пациентов с последующим высевом микроорганизмов на питательные среды, их идентификацией и детекцией генов устойчивости к АБП. Сбор клинического материала был осуществлен медицинским персоналом, а выделение бактериальных культур и их изучение – в лаборатории антимикробных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ.

В ходе трех исследований всего было выделено 199 изолятов грамотрицательных бактерий 20 видов: *Acinetobacter baumannii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter absuriae*, *Enterobacter kobei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens* и *Stenotrophomonas maltophilia*. Наиболее представленными видами бактерий были *K. pneumoniae* (28 % изолятов), *P. aeruginosa* (18 % изолятов), *E. coli* (14 % изолятов) и *A. baumannii* (11 % изолятов) (рисунок 3.25).

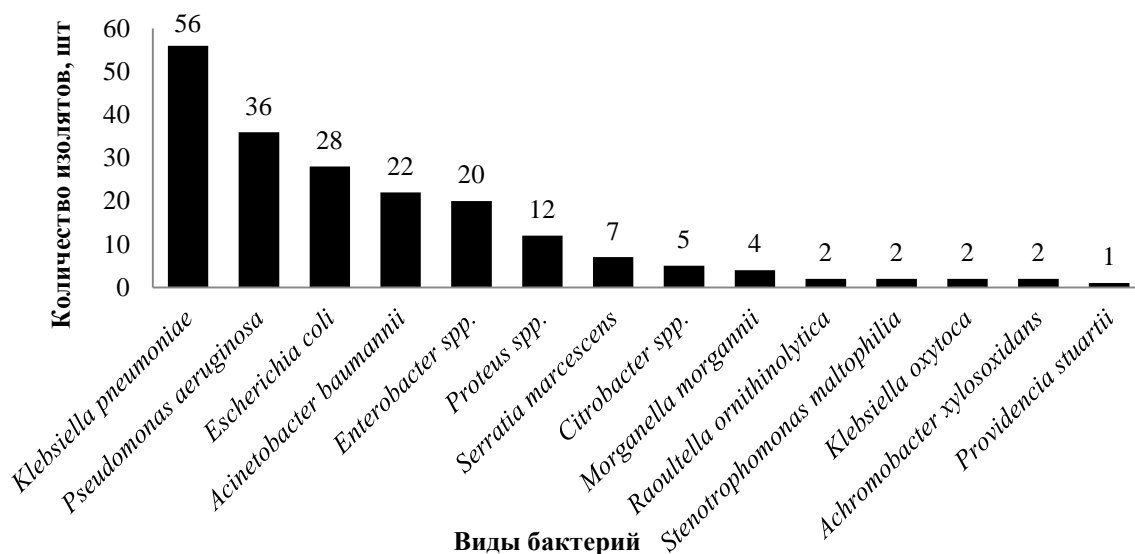


Рисунок 3.25 – Грамнегативные бактерии, выделенные от пациентов нейрореанимации в ходе трех одномоментных исследований

Во время первого обследования было выделено 78 культур от 24 пациентов, во время второго – 43 от 16 пациентов, во время третьего – 78 от 22 пациентов. Большинство пациентов, участвующих в исследовании, не имели признаков пневмонии, ассоциированной с ИВЛ (77 %) и кишечных дисфункций (67 %).

Большинство изолятов были выделены из дыхательной системы пациентов (рисунок 3.26). Доля клебсиелл среди изолятов, выделенных из дыхательной системы, составила 17 %, из кишечника - 38 %, а среди изолятов, выделенных из мочи – 19 %.

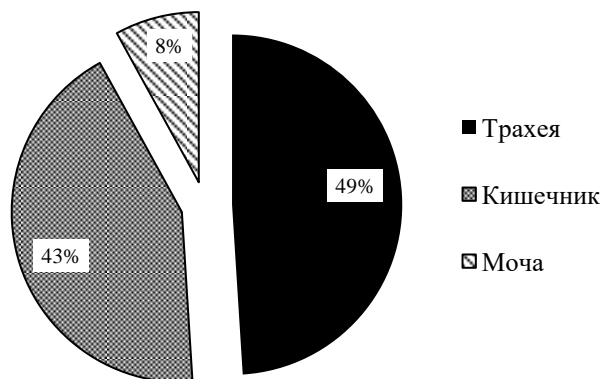


Рисунок 3.26 - Источники выделения бактерий во время трех одномоментных исследований пациентов нейрореанимации г. Москвы

Сравнение данных о количестве выделенных изолятов четырех преобладающих видов грамотрицательных бактерий в каждом из трех одномоментных исследований, проведенных в 2015 г., показало в период с января по ноябрь относительное снижение частоты носительства у пациентов отделения нейрореанимации *K. pneumoniae* (на 14 %) и *A. baumannii* (на 15 %) и увеличение частоты носительства *P. aeruginosa* (на 19 %). Носительство *E. coli* отмечено приблизительно на одинаковом уровне во всех трех исследованиях (рисунок 3.27).

В отмеченный период времени в отделении нейрореанимации, обследуемом на носительство у пациентов грамотрицательных бактерий, произошла смена доминирующего вида – с *K. pneumoniae* на *P. aeruginosa*.

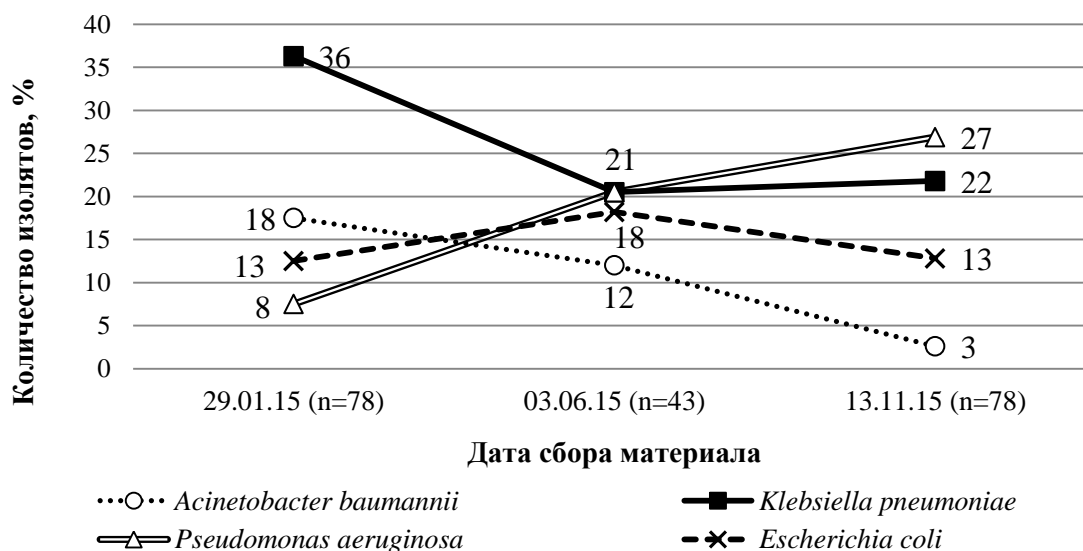


Рисунок 3.27 – Динамика носительства грамотрицательных бактерий доминирующих видов в нейрореанимации г. Москвы в 2015 г.

3.9.1 Генетические детерминанты антибиотикорезистентности бактериальных культур, выделенных в рамках одномоментных исследований

Методом ПЦР со специфичными праймерами в изолятах бактерий определено наличие генов, кодирующих механизмы устойчивости к АБП: гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M}-типа (32 % изолятов), *bla*_{TEM}-типа (32 %), *bla*_{SHV}-типа (26 %), *bla*_{OXA-23}-типа (2 %), *bla*_{OXA-40}-типа (5 %), *bla*_{OXA-51}-типа (11 %), *bla*_{OXA-48}-типа (17 %) и *bla*_{VIM}-типа (2 %), интегроны класса 1 (34 %) и класса 2 (7 %), гены пориновых белков клебсиелл *ompK36* (27 %) и ацинетобактеров *ompA* (11 %), а также регуляторный ген оперона эффлюксного насоса ацинетобактеров *adeR* (11 %).

Представленность генов бета-лактамаз различалась у разных видов бактерий, например, у изолятов *E. coli* чаще всего присутствовал ген бета-лактамаз *bla*_{TEM}-типа, у *A. baumannii* - *bla*_{OXA}-типа, ген бета-лактамазы *bla*_{SHV} был детектирован только у изолятов *K. pneumoniae*, ген *bla*_{VIM} был обнаружен только у изолятов *P. aeruginosa* (рисунок 3.28). Все изоляты *K. pneumoniae* содержали в геномах ген поринового белка *ompK36*, все изоляты *A. baumannii* имели гены *bla*_{OXA-51}-типа, *ompA* и *adeR*.

Выборочное секвенирование последовательностей ДНК детектированных генов бета-лактамаз позволило идентифицировать их аллели: *bla*_{CTX-M-15} (n=14), *bla*_{CTX-M-3} (n=2), *bla*_{OXA-48} (n=21), *bla*_{OXA-244} (n=3) и *bla*_{VIM-2} (n=3).

Изоляты *K. pneumoniae* являлись носителями генов бета-лактамаз нескольких типов - bla_{SHV} (91 % изолятов), bla_{CTX-M} (53 %), $bla_{OXA-48-like}$ (51 %) и bla_{TEM} (38 %).

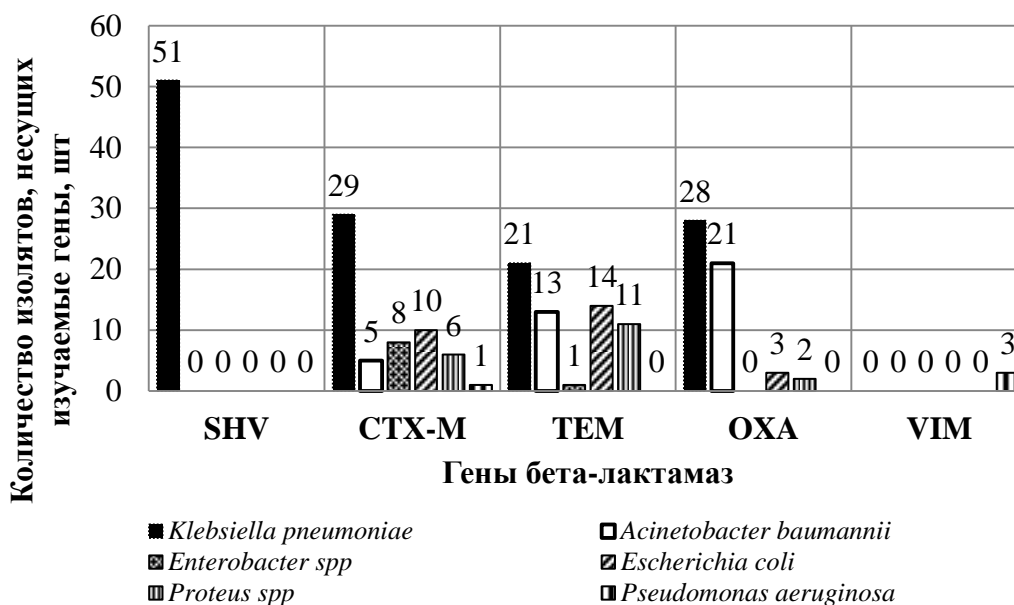


Рисунок 3.28 - Изоляты грамотрицательных бактерий, несущих гены бета-лактамаз SHV-, CTX-M-, TEM- и OXA- и VIM-типов

В соответствии с классификацией генотипов резистентности (R-генотипов), описанной в разделе 3.4, у выделенных в ходе трех одномоментных исследований изолятов клебсиелл преимущественно идентифицированы R-генотипы R2с-01 с двумя генами бета-лактамаз $bla_{SHV}+bla_{OXA-48}$ (32 % изолятов) и R3а-11 - с тремя генами бета-лактамаз $bla_{SHV}+bla_{TEM}+bla_{CTX-M}$ (17 %), а 11 % изолятов *K. pneumoniae* одновременно несли четыре гена бета-лактамаз – генотип R4а-11 (рисунок 3.29).

Ген интегразы класса 1 был детектирован у изолятов грамотрицательных бактерий, выделенных в ходе трех одномоментных исследований в 2015 г., относящихся более чем к десяти видам, наиболее часто – у *K. pneumoniae* (у 21 изолята из 56), *E. coli* (у 14 изолятов из 28) и *P. aeruginosa* (у 10 изолятов из 36). Гены интегразы класса 2 были обнаружены в изолятах шести видов бактерий, преимущественно – у изолятов *P. mirabilis* (у 4 изолятов из 12). Отмечено, что около половины интегронов 1 класса (33 из 62) и интегронов 2 класса (6 из 11) несли в своем составе наборы генных кассет. С помощью секвенирования ДНК был определен состав интегронных вставок. Идентифицированы 9 типов вставок интегронов 1 класса: (*aadA1*), (*dfrA7*), (*dfrA17*-

aadA5), (*dfrA12-orfF-aadA2*), (*dfrA1-aadA1*), (*dfrA12-orfF-aadA2*), (*PSE1-aacA4*), (*aacC1-orfX-orfY-aadA1*) и (*aadA6-ISPa21-orfD*); и один тип вставок интегронов 2 класса: (*dfrA12-sat2-aadA1*).

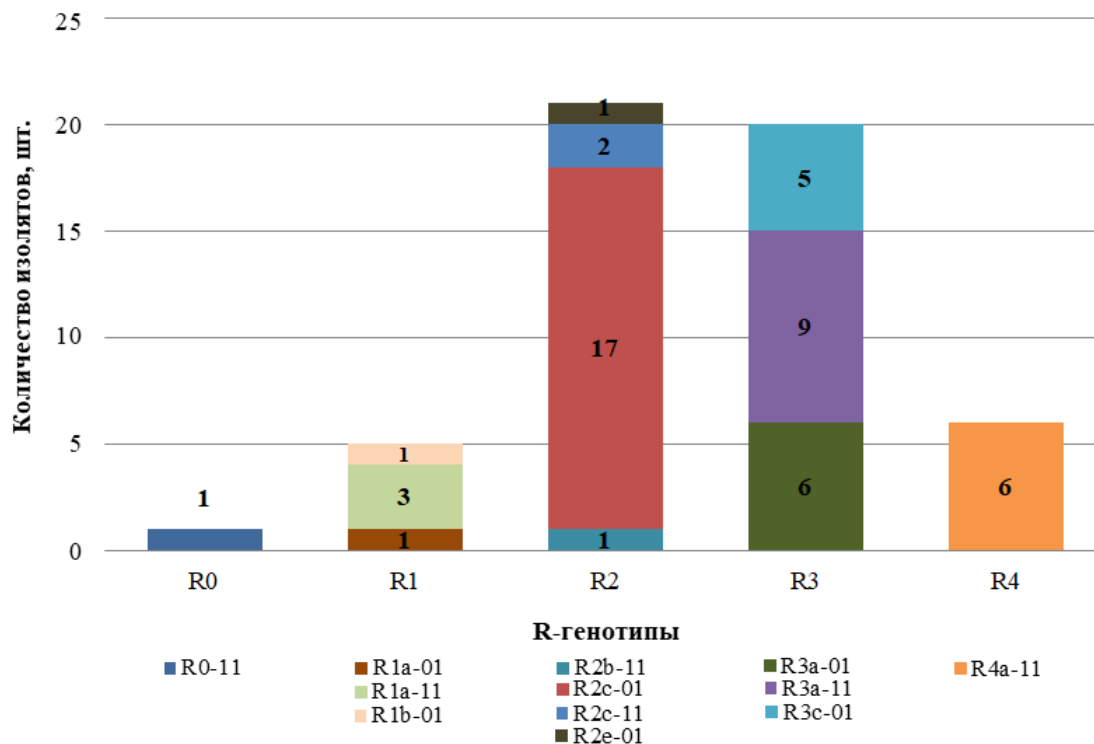


Рисунок 3.29 - Генотипы резистентности изолятов *K. pneumoniae*, выделенных во время трех одномоментных обследований пациентов нейрореанимации в 2015 г.

Таким образом, в ходе трех одномоментных исследований пациентов нейрореанимации в 2015 г. выявлено значительное видовое разнообразие (20 видов) грамотрицательных бактерий, колонизирующих дыхательную систему, кишечник и мочевыводящие пути пациентов, причем большая часть пациентов (около 70 %) не имела клинических проявлений инфекций в данных сайтах организма. Это позволяет сделать заключение о скрытом носительстве потенциально опасных бактерий, которые могут быть причиной инфекционных заболеваний у ослабленных пациентов реанимационного отделения. Отмечена динамика изменения видового состава госпитальных штаммов по времени – в течение года произошла смена доминирующего вида с *K. pneumoniae* на *P. aeruginosa*. Показано, что около одной третьей части изолятов, колонизирующих дыхательные пути, кишечник и мочу, несут эпидемически значимые гены устойчивости к АБП – гены бета-лактамаз, интегроны 1 и 2 классов,

гены пориновых белков и эффлюксных насосов. Наличие большого количества выявленных генов устойчивости к АБП может служить объяснением того, что значительная часть изолятов (81%), выделенных в резистентных к трем и более классам антибактериальных препаратов, то есть могут быть отнесены к категории МЛУ.

В заключение стоит отметить, что проведение одномоментных обследований всех пациентов нейрохирургии является инструментом, позволяющим клиницистам реально оценить эпидемиологическую ситуацию по носительству бактерий и генетических детерминант резистентности в лечебном учреждении для разработки мер профилактики и сдерживания распространения антибиотикорезистентности.

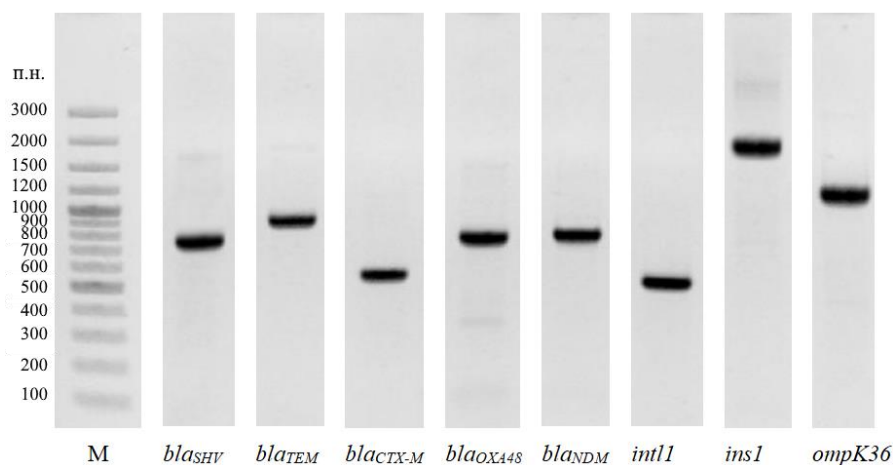
3.10 Разработка методических рекомендаций для детекции генов антибиотикорезистентности в штаммах *K. pneumoniae*

Молекулярные механизмы антибиотикорезистентности клебсиелл, изученных в данном исследовании, связаны с наличием у них генов бета-лактамаз типов TEM, SHV, CTX-M, OXA-48-like и NDM, интегронов 1 класса, а также гена поринового белка OmpK36. В качестве референс-штамма предложен *K. pneumoniae* КРВ417/16 (Номер В-7954 в коллекции «ГКПМ-Оболенск»), выделенный 28.03.2016 г. из эндотрахеального аспирата пациента нейрореанимации г. Москвы. Данный штамм характеризуется мультирезистентным фенотипом: он устойчив к пенициллинам, цефалоспоринам, карбапенемам, фторхинолонам, аминогликозидам и нитрофуранам и чувствителен к тетрациклинам (для тетрациклина МПК=5 мг/л и для тигециклина МПК=1 мг/л), сульфаниламидам (для ко-тримоксазола МПК<20 мг/л) и хлорамфениколу (МПК=4 мг/л). Штамм *K. pneumoniae* КРВ417/16 содержит пять генов бета-лактамаз: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM-1}; ген мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36*, интегразу класса 1 *intl1*, а также интегронную вставку класса 1, содержащую ген устойчивости к триметоприму *dfrA12*, ген гипотетического белка *orfF* и ген устойчивости к аминогликозидам *ant3* (таблица 3.8, рисунок 3.30).

Таблица 3.8 – Генетические детерминанты антибиотикорезистентности референс-штамма *K. pneumoniae* КРВ417/16

| Ген-мишень | Температура отжига праймера | Праймеры для детекции* | Размер ПЦР-продукта, п.н. | Ссылка на GenBank |
|---------------------------------|-----------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>bla_{SHV}</i> | 56 | SHV-F; SHV-R | 731 | KY026070 |
| <i>bla_{TEM}</i> | 58 | TEM dir; TEM rev | 873 | KY026071 |
| <i>bla_{CTX-M}</i> | 58 | CTX-M-Fext, CTX-M-R1 | 544 | KX906675 |
| <i>bla_{OXA48-like}</i> | 55 | OXA-48A, OXA-48B | 744 | KX906674 |
| <i>bla_{NDM}</i> | 55 | NDM F, NDM R | 758 | KX218441 |
| <i>int11</i> | 60 | Int11-F, Int11-R | 483 | KY785317 |
| <i>ins1</i> | 60 | 5'CS, 3'CS | вариабельный | KX906676 |
| <i>ompK36</i> | 57 | ompK36-F, ompK36-R | 1186 | KY026069 |

Примечание: олигонуклеотидные последовательности праймеров представлены в Приложении Б.



М - маркер молекулярных масс ДНК Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США)

Рисунок 3.30 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов генов антибиотикорезистентности

Описанный метод предназначен для молекулярно-генетического анализа штаммов *K. pneumoniae* посредством детекции генов антибиотикорезистентности. Генотипы антибиотикорезистентности (R-генотипы) могут служить инструментом внутривидового типирования клинических изолятов и эпидемически значимых штаммов *K. pneumoniae*.

3.11 Заключение по Главе 3

В результате проведенного исследования были изучены 406 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в ходе мониторинга нозокомиальных инфекций в двух лечебных учреждениях г. Москвы, при трех одномоментных исследованиях пациентов нейрореанимации г. Москвы и из других источников. Показано, что *K. pneumoniae* являлась доминирующим патогеном в этиологической структуре госпитальных инфекций среди грамотригативных бактерий в период с 2013 по 2016 гг.

Изоляты коллекции характеризовались высоким уровнем устойчивости к АБП (94 % штаммов обладали фенотипом множественной лекарственной устойчивости) и несли генетические детерминанты антибиотикорезистентности: гены бета-лактамаз *bla_{SHV}* (93 % изолятов), *bla_{CTX-M}* (77 %), *bla_{TEM}* (53 %), *bla_{OXA-48-like}* (41 %) и *bla_{NDM}* (2 %); интегроны 1 класса (35 %). Зафиксировано расширение спектра эпидемически значимых бета-лактамаз, циркулирующих в госпитальной среде - отмечено появление клебсиелл, несущих ген металло-бета-лактамазы NDM-1.

У большинства изолятов *K. pneumoniae* (98 %) детектирован ген поринового белка OmpK36, который участвует в проявлении антибиотикорезистентности бактерий. В пяти клинических изолятах *K. pneumoniae* было детектировано встраивание *IS1*- и *IS10*-элементов в ген *ompK36*, что привело к инактивации данного гена, утрате поринов OmpK36 и к увеличению уровня устойчивости к антибактериальным препаратам. Восстановление продукции белка OmpK36 с помощью трансформации плазмидой, несущей клонированный нативный ген *ompK36*, приводило к увеличению чувствительности к имипенему. Полученные данные подтверждают роль *IS*-элементов как одного из механизмов, регулирующих формирование лекарственно устойчивых штаммов у клебсиелл.

Отмечено большое разнообразие генотипов *K. pneumoniae*, выделяемых в госпитальной среде в период с 2013 по 2016 гг.: идентифицированы 45 RAPD-генотипов, из которых в разные периоды преобладали четыре RAPD-генотипа. Описаны изоляты *K. pneumoniae* с двумя вариантами гена *bla_{OXA-48-like}*: широко распространенного в мире аллеля *bla_{OXA-48}* и впервые описанного в России аллеля *bla_{OXA-244}*, который ранее был детектирован в Испании в 2013 г. Было доказано, что ген *bla_{OXA-48-like}* локализован на конъюгативной плазмиде группы несовместимости IncL/M, а гены *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* и

интегрон 1 класса - на плазмиде группы несовместимости IncFII. Анализ распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} среди изолятов энтеробактерий, выделяемых в нейрореанимации, позволил высказать гипотезу о том, что источником данных генов являются *K. pneumoniae*.

В ходе исследования описаны штаммы *K. pneumoniae*, принадлежащие к 31 генотипу резистентности (R-генотипу), определяемому на основании наличия генов бета-лактамаз, интегрон 1 класса и гена поринового белка *ompK36*. Наиболее распространенными в изученной коллекции были R-генотипы с комбинациями трех и четырех генов бета-лактамаз.

В ходе трех одномоментных исследований в отделении нейрореанимации в 2015 г. выявлено 20 видов грамотрицательных бактерий, колонизирующих дыхательную систему, кишечник и мочевыводящие пути пациентов, которые несут эпидемические значимые гены устойчивости к АБП – гены бета-лактамаз, интегроны 1 и 2 классов, гены пориновых белков и эффлюксных насосов. Выявление носительства потенциально опасных бактерий, которые могут быть причиной инфекционных заболеваний у ослабленных пациентов реанимационного отделения, является важной информацией для клиницистов при разработке мер профилактики и сдерживания распространения антибиотикорезистентности.

Разработаны методические рекомендации для детекции генетических детерминант антибиотикорезистентности клебсиелл методом ПЦР, с использованием в качестве референс-штамма *K. pneumoniae* КРВ417/16, несущего гены пяти бета-лактамаз, интегрон 1 класса и ген поринового белка *ompK36*.

ГЛАВА 4. ФЕНОТИПЫ И ГЕНОТИПЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

4.1 Клиническая значимость изучаемых штаммов *K. pneumoniae*

В ходе исследования собрана коллекция изолятов *K. pneumoniae* (n=350) которая включает в себя бактерии, выделенные от пациентов двух лечебных учреждений г. Москвы в 2012-2016 гг. (n=330), г. Челябинска в 2007-2012 (n=14), из клинического материала в ходе расследования вспышек инфекционных заболеваний в 2016 г (n=4), от сельскохозяйственного животного (n=1) и из пресной воды Краснодарского края (n=1). Изоляты являются неповторяющимися: от 145 пациентов выделено по одному, от 40 пациентов – по два, от 20 пациентов – по три, от 6 пациентов – по четыре, от 2 пациентов – по пять, от 1 пациента – шесть, от 1 пациента – 10, от 1 пациента – 12 изолятов. При выделении от одного пациента нескольких изолятов все они отличались по локализации в организме, фенотипическим признакам (чувствительность к АБП, гипермукоидность, морфология колоний и др.), по наборам генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности, сиквенс-типу или RAPD-генотипу.

Пациенты, от которых были 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 со множественными абсцессами головного мозга; пансинусит и сепсис. В случае тяжелой, упорной, длительной клебсиеллезной инфекции у пациентов отмечалось отсутствие отклика на антибиотикотерапию и не достигалась эрадикация возбудителя. Основными источниками выделения клинических изолятов *K. pneumoniae* были органы дыхательной и мочевыделительной систем, как было описано в разделе 3.1. У части пациентов было отмечено тяжелое течение заболевания, что является косвенным признаком вирулентности для человека штаммов, выделенных в таких клинических случаях. Так, 15 штаммов *K. pneumoniae* были выделены из крови пациентов, для трех из которых отмечен летальный исход; 8 штаммов выделены из ликвора у пациентов с абсцессами головного мозга.

4.2 Оценка вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на мышинной модели

Исследование вирулентности штаммов *K. pneumoniae* для лабораторных животных проводили на 38 клинических штаммах коллекции.

В качестве вирулентного для мышей референс-штамма использовали штамм *K. pneumoniae* КРМ9, выделенный в 2011 г. из пресной воды в Краснодарском крае при мышинной эпизоотии. Данный штамм являлся высоковирулентным для белых аутбредных мышей с $LD_{50}=10$ КОЕ. При внутрибрюшинном заражении в дозах 10^3 - 10^6 КОЕ/животное все мыши погибали на 3-6 сутки; а в дозах $7 \cdot 10^2$ КОЕ/животное - на 3-8 сутки погибали 50 % мышей (Рисунок 4.1).

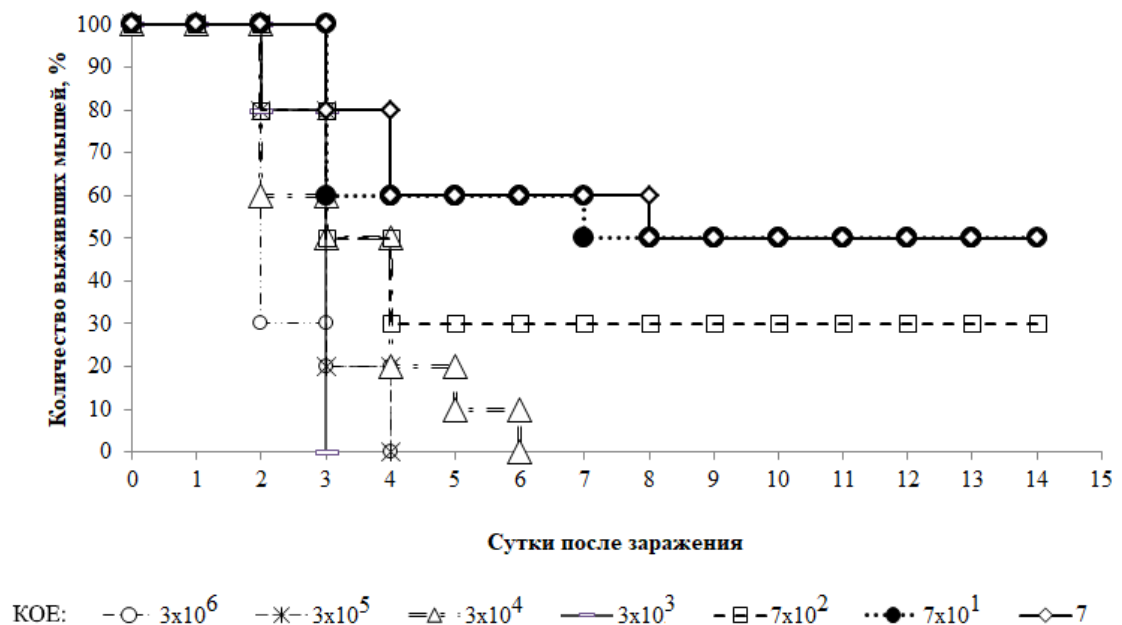


Рисунок 4.1 – Выживаемость белых аутбредных мышей при внутрибрюшинном заражении клетками штамма *K. pneumoniae* КРМ9 в дозах 7×10^1 - 3×10^6 КОЕ/животное

На первом этапе эксперимента по определению степени вирулентности клинических штаммов для лабораторных мышей проводили предварительную оценку вирулентности. Для этого мышей заражали внутрибрюшинно бактериальными культурами тестируемых штаммов *K. pneumoniae* в дозе 10^6 КОЕ/животное и наблюдали на протяжении 14 дней после заражения. Если мыши не погибали в течение периода наблюдения, штаммы считали авирулентными. В случае гибели животных штаммы относили к категории вирулентных для мышей, и для них определяли LD_{50} на втором

этапе эксперимента. Гибель животных от клебсиеллезной инфекции подтверждали микробиологически – выделением чистых культур *K. pneumoniae* из паренхиматозных органов мышей.

На основании полученных данных, определена группа авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* (n=19) и группа вирулентных для мышей штаммов (n=19). Среди вирулентных штаммов определены подгруппы: высоковирулентные (n=12) – с $LD_{50} < 500$ КОЕ; и средневирулентные (n=7) – с $LD_{50} = 10^3 - 10^4$ КОЕ (рисунок 4.2).

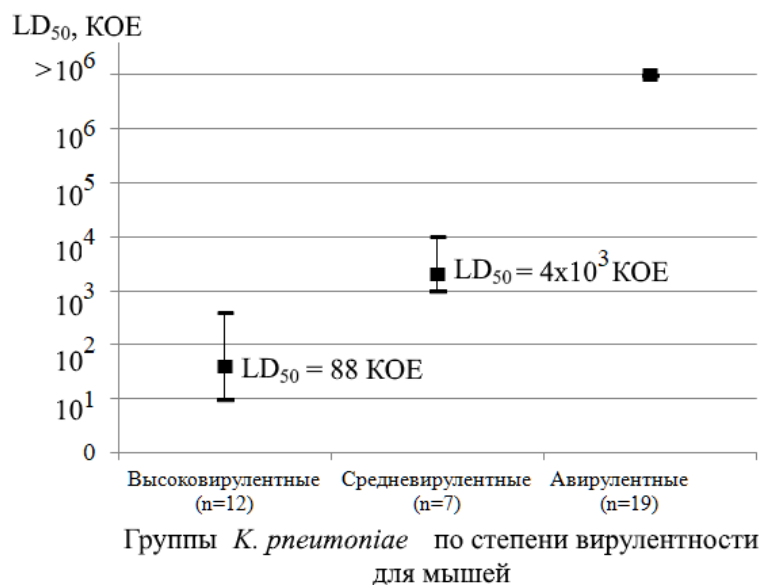


Рисунок 4.2 – Максимальные, минимальные и средние значения LD_{50} для штаммов *K. pneumoniae*

4.3 Гипермукоидный фенотип клинических штаммов *K. pneumoniae*

Одним из общепризнанных фенотипических признаков клебсиелл, ассоциированных с гипервирулентностью для людей, является наличие гипермукоидного фенотипа, который выявляется с помощью стринг-теста. В ходе работы предложена модификация стандартного метода стринг-теста, основанная на использовании репликатора, что позволяет одновременно анализировать 36 штаммов на одной чашке. Модификация метода заключалась в том, что по 100 мкл суспензии изучаемых штаммов (с плотностью 0,5 ед. МакФарланда, разведенные в 2 раза) вносили в лунки 96-луночного планшета, стерильным репликатором наносили на поверхность питательного агара и культивировали 18-20 ч при температуре 37 °С. Выросшие бляшки культуры индивидуально тестировали на наличие положительного стринг-теста с помощью стерильных микробиологических петель (рисунок 4.3).



А – положительный стринг-тест штамма *K. pneumoniae* по стандартной методике (агар с 5 % эритроцитов барана); Б – использование репликатора в модифицированной методике «стринг-теста»; В – положительный стринг-тест штамма одного *K. pneumoniae* на среде с 5 % эритроцитов барана; Г - положительный стринг-тест одного штамма *K. pneumoniae* на среде «ГРМ-агар»

Рисунок 4.3 – «Стринг-тест» штаммов *K. pneumoniae*

При анализе 108 клинических штаммов *K. pneumoniae* показано, что данный тест может проводиться без потери качества не только на питательной среде с 5 % эритроцитов барана [167], но и на плотной питательной среде отечественного производства ГРМ-1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия).

Среди всех штаммов изучаемой коллекции были выявлены 33 (9,4 %) гипермукоидных штамма, которые были выделены в 2013 г. (n=12), 2014 г. (n=13), 2015 г. (n=3) и 2016 г. (n=5) преимущественно 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, от которых выделены 3 штамма, были отмечены фолликулярная ангина с абсцессом, пневмония и инфекция мочевыводящей системы с умеренной лейкоцитурией. Четыре пациента, от которых были выделены 9 гипермукоидных штаммов, умерли, что подтверждает данные о наличии взаимосвязи признаков гипермукоидности и вирулентности *K. pneumoniae* для людей.

Показано, что из 22 штаммов *K. pneumoniae*, вирулентных для мышей, 20 штаммов имели гипермукоидный фенотип, а в группе высоковирулентных для мышей штаммов все без исключения штаммы были гипермукоидными. В то же время, у 3 штаммов из группы авирулентных для мышей также отмечен гипермукоидный фенотип, что указывает на неоднозначность связи признака гипермукоидности с вирулентностью для мышей. По литературным данным, установлена высокая степень корреляции между гипермукоидностью штамма и его вирулентностью для людей, но не в 100 % случаев [56, 167], что соответствует полученным результатам эксперимента.

4.4 Сиквенс-типы и клональные комплексы *K. pneumoniae*

Для 45 штаммов *K. pneumoniae* изучаемой коллекции с помощью секвенирования 7 генов «домашнего хозяйства», согласно протоколу базы данных MLST PASTEUR (Париж, Франция), определены 14 сиквенс-типов (ST): ST5 (n=1), ST11 (n=1), ST20 (n=1), ST23 (n=11), ST48 (n=3), ST65 (n=1), ST86 (n=4), ST147 (n=8), ST218 (n=8), ST395 (n=3), ST833 (n=1), в том числе три новых, ранее не описанных сиквенс-типа, ST1544 (n=1), ST2174 (n=2) и ST2280 (n=1). Для сиквенс-типов ST1544 и ST2280 характерно новое сочетание описанных аллелей генов «домашнего хозяйства», в то время как у штамма ST2174 описан новый вариант гена *gapA*, которому присвоен номер аллеля 125 (приложение В).

Показано, что вирулентные для мышей штаммы *K. pneumoniae* характеризовались сиквенс-типами: ST23 (n=10), ST86 (n=4), ST218 (n=1), ST65 (n=1), ST1544 (n=1), ST2174 (n=1) и ST2280 (n=1); авирулентные: ST20 (n=1), ST23 (n=2), ST218 (n=6), ST147 (n=4), ST395 (n=2), ST48 (n=2), ST833 (n=1), а также один штамм с неидентифицированным сиквенс-типом. (таблица 4.1). Вирулентность штаммов сиквенс-типов ST5 и ST11 на мышинной модели не определяли, однако штамм KPPig (ST5) был выделен из легких свиньи с острой формой пневмонии, что косвенно свидетельствует о его вирулентности для животных.

С помощью алгоритма BURST (<http://eburst.mlst.net/default.asp>), позволяющего выявить степень генетического родства между изучаемыми изолятами бактерий на основании анализа аллельных профилей сиквенс-типов, среди 14 описанных сиквенс-типов *K. pneumoniae* выявлены три клональных комплекса (CC): CC11, к которому относятся ST11 и ST833; CC23, включающий в себя ST23 и ST218; и CC65, включающий в себя ST65 и ST2280. Кроме того, оставшиеся 8 сиквенс-типов (ST5, ST20, ST48, ST86, ST147, ST395, ST1544 и ST2174) не объединены в клональные комплексы, но определена принадлежность 7 из них к клональным комплексам, представленным в базе данных MLST PASTEUR: CC14 (ST2174), CC20 (ST20), CC48 (ST48), CC86 (ST86), CC147 (ST147), CC395 (ST395). Для гипервирулентного для мышей референс-штамма KPM9 ST1544, выделенного из окружающей среды, в базе данных не было обнаружено родственных сиквенс-типов на основании совпадения 6 аллелей генов «домашнего хозяйства».

Таблица 4.1 - Характеристика вирулентных 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 |
| KPM9 | Январь 2011 | Вода | + | K20 | 1544 | 1 (BLA) | R1a-01 | Vir6a | 10 |
| KPS73 | Сентябрь 2016 | Легкие | + | K1 | 23 | 1 (BLA) | R1a-01 | Vir7 | 44 |
| KPB1802K | Ноябрь 2013 | Трахея | + | K1 | 23 | 1 (BLA) | R1a-01 | Vir7 | 86 |
| KPI1683 | Август 2014 | Трахея | + | K1 | 23 | 2 (BLA NIT) | R1a-01 | Vir7 | 26 |
| KPI261 | Январь 2014 | Трахея | + | K1 | 23 | 3 (BLA AMI NIT) | R2b-01 | Vir7 | 16 |
| KPB2580/14 | Июль 2014 | Моча | + | K1 | 23 | 7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT) | R4a-11 | Vir7 | 17 |
| KPB1103/14 | Июнь 2014 | Моча | + | K1 | 23 | 7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT) | R4a-11 | Vir7 | 3×10 ² |
| KPB1493-1 | Август 2013 | Трахея | + | K1 | 23 | 6 (BLA TET QNL AMI SUL NIT) | R3a-11 | Vir7 | 4×10 ² |
| KPB463K/13 | Апрель 2013 | Дых.сист. | + | K1 | 23 | 6 (BLA QNL AMI SUL NIT PHO) | R4a-11 | Vir7 | 1×10 ⁴ |
| KPB475/14 | Июль 2014 | Моча | + | K1 | 23 | 7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT) | R4a-11 | Vir7 | 1×10 ³ |
| KPB594/14 | Февраль 2014 | Рана | + | K1 | 23 | 7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT) | R4a-11 | Vir7 | 3×10 ³ |
| KPI3014 | Январь 2014 | Дых.сист. | + | K2 | 2174 | 6 (BLA TET QNL CHL AMI NIT) | R2a-01 | Vir5d | 1×10 ⁴ |
| KPI1748 | Август 2014 | Дых.сист. | + | K2 | 65 | 5 (BLA QNL CHL AMI SUL) | R1a-01 | Vir6a | 83 |
| KPB4010 | Октябрь 2013 | Ликвор | + | K2 | 2280 | 3 (BLA TET NIT) | R1a-01 | Vir5a | 25 |
| KPI1627 | Январь 2014 | Дых.сист. | + | K2 | 86 | 2 (BLA NIT) | R1a-01 | Vir5a | 14 |
| KPI6208 | Март 2014 | Дых.сист. | + | K2 | 86 | 3 (BLA TET NIT) | R1a-01 | Vir5a | 40 |
| KPB492/16 | Апрель 2016 | Рана | + | K2 | 86 | 1 (BLA) | R1a-01 | Vir5a | 1×10 ³ |
| KPB463/16 | Апрель 2016 | Дых.сист. | + | K2 | 86 | 1 (BLA) | R1a-01 | Vir5a | 1×10 ³ |
| KPB550 | Май 2013 | Моча | + | K57 | 218 | 5 (BLA QNL PHO NIT SUL) | R4a-11 | Vir5b | 2×10 ³ |
| KPB584 | Май 2013 | Моча | - | K57 | 218 | 4 (BLA SUL NIT PHO) | R4a-11 | Vir5b | >10 ⁶ |
| KPB500 | Апрель 2013 | Дых.сист. | + | K57 | 218 | 5 (BLA QNL SUL NIT PHO) | R4a-11 | Vir4b | >10 ⁶ |
| KPB811K | Июнь 2013 | Ликвор | + | K57 | 218 | 5 (BLA QNL SUL NIT PHO) | R4a-11 | Vir4b | >10 ⁶ |
| KPB757K | Июнь 2013 | Моча | + | K57 | 218 | 8 (BLA TET QNL CHL AMK SUL NIT PHO) | R4a-11 | Vir4b | >10 ⁶ |
| KPB612-1 | Май 2013 | Дых.сист. | + | K57 | 218 | 7 (BLA QNL AMI SUL PHO NIT CST) | R4a-11 | Vir4b | >10 ⁶ |
| KPB690/14K | Май 2014 | Моча | - | K57 | 218 | 5 (BLA QNL CHL AMI NIT) | R3c-11 | Vir2b | >10 ⁶ |
| KPB542/15 | Март 2015 | Моча | - | K57 | 23 | 7 (BLA QNL CHL AMI SUL NIT PHO) | R2b-01 | Vir3b | >10 ⁶ |
| KPI112 | Декабрь 2014 | Дых.сист. | - | K57 | 23 | 4(BLA QNL AMI SUL) | R3a-11 | Vir5c | >10 ⁶ |
| KPB1493-2 | Август 2013 | Дых.сист. | - | K62 | 48 | 4 (BLA CHL AMI NIT) | R2b-11 | Vir3a | >10 ⁶ |

Продолжение таблицы 4.1. - Характеристика вирулентных и авирулентных для мышей штаммов *Klebsiella pneumoniae*

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------|--------------|-----------|---|---------|-----|---------------------------------|--------|-------|------------------|
| 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 |
| КРВ417/16 | Март 2016 | Дых.сист. | - | К14/64 | 147 | 4(BLA QNL AMI NIT) | R5-11 | Vir3a | >10 ⁶ |
| КРВ941/14 | Июнь 2014 | Дых.сист. | - | К27 | 833 | 7 (BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT) | R3b-11 | Vir2b | >10 ⁶ |
| КРВ591/15 | Февраль 2015 | Ликвор | - | К28 | 20 | 2 (BLA NIT) | R2c-01 | Vir3a | >10 ⁶ |
| КРВ54/14 | Январь 2014 | Моча | - | К60 | 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: ST – сиквенс-тип; NI – не идентифицирован; * - определена аллель гена, отсутствует ассоциация с К-серотипом; АБП – антимикробные препараты; BLA – бета-лактамы; TET – тетрациклины; QNL – хинолоны; CHL – хлорамфениколы; AMK – аминогликозиды; SUL – сульфаниламиды; NIT – нитрофураны; PHO – фосфомицины.

Сиквенс-тип авирулентного для мышей штамма КРВ54/14 идентифицировать не удалось, т.к. ген *groV* не выявлен с помощью специфичных праймеров, но по аллельному профилю 6 генов «домашнего хозяйства» этот штамм отнесен к клональному комплексу СС15, представленному в базе данных MLST PASTEUR (приложение В). Анализ базы данных MLST PASTEUR (1035 штаммов *K. pneumoniae*) показал, что из выявленных нами клональных комплексов в мире широко распространены клональные комплексы СС11 (40 % изолятов), СС65 (16 % изолятов) и СС23 (15 % изолятов) (рисунок 4.4).

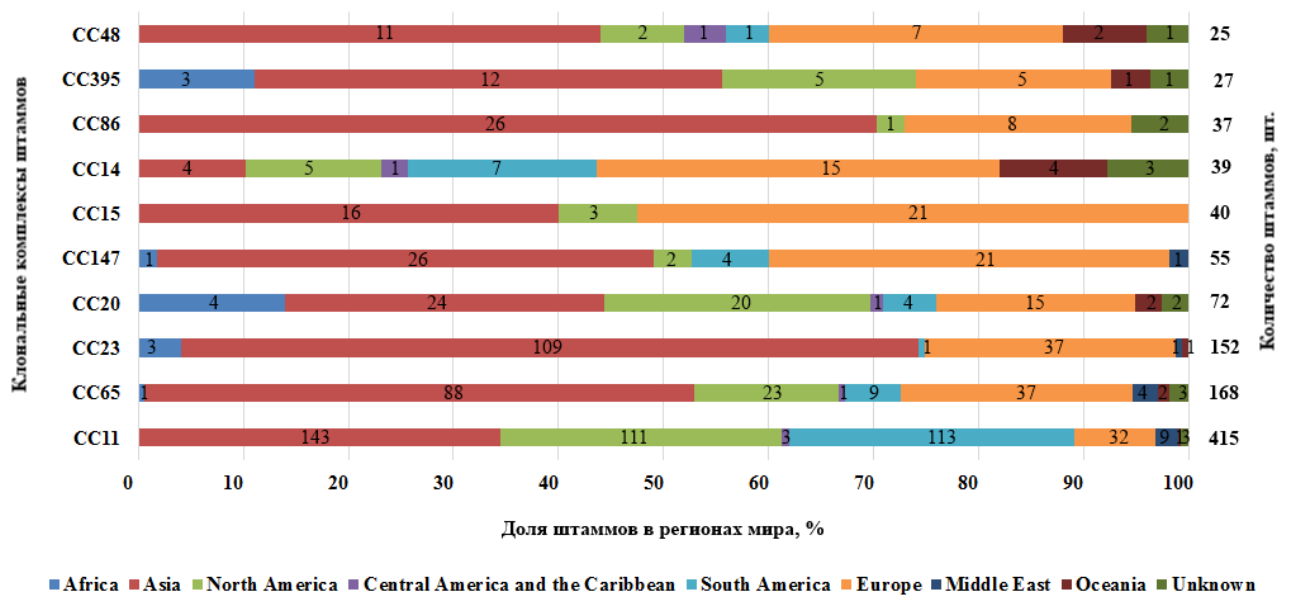


Рисунок 4.4 – Распространенность в мире изолятов *K. pneumoniae* клональных комплексов, представленных в исследовании

Для изолятов СС11 характерен высокий уровень антибиотикорезистентности, а также отсутствие гипермукоидности и вирулентности для лабораторных животных, то есть принадлежность к эволюционной ветви классических (КЛ) клебсиелл. Клональный комплекс СС11 в базе данных на дату 18.08.2017 г. представлен 57 сиквенс-типами. Многие изоляты этих сиквенс-типов выделены от людей (85 %) с бактериемией (13 %) и инфекциями мочевыводящих путей (7 %). Изоляты СС11 наиболее распространены на территории Азии (34 %), Северной и Южной Америки (27,2 % и 26,7 %). В состав СС11 входят изоляты эпидемически значимого ST258, активно распространяющегося в Северной и Южной Америках и Европе (рисунок 4.4).

У изолятов СС11 отмечено наличие широкого спектра генов бета-лактамаз: SHV-, TEM-, CTX-M-, NDM-, OXA-48-like- и KPC-типов. В нашей коллекции штамм *K. pneumoniae* КРВ941/14 СС11 устойчив к АБП 7 функциональных классов и авирулентен для мышей, содержит гены трех бета-лактамаз *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} и *bla*_{OXA-48} (таблица 4.1), то есть соответствует общим характеристикам клонального комплекса.

Изоляты СС65 являются гипермукоидными, характеризуются преимущественно К2 капсульным серотипом, то есть принадлежат к эволюционной ветви гипервирулентных (ГПВ) клебсиелл. Клональный комплекс СС65 в базе данных на дату 18.08.2017 г. представлен 24 сиквенс-типами, наиболее широко представленными в Азии (52 %), Европе (22 %) и Северной Америке (14 %). Изоляты СС65 преимущественно были выделены от человека (80 %), а также от крупного рогатого скота, обезьян, морских млекопитающих, кошек, птиц и из окружающей среды. Для изолятов СС65 отмечено наличие генов бета-лактамаз SHV-, KPC- типов. В нашей коллекции штаммы *K. pneumoniae* КРВ4010 и КР11748 СС65 характеризуются К2-серотипом и высокой степенью вирулентности для аутбредных мышей (таблица 4.1).

Штаммы ST23 в литературе описаны как ГПВ эволюционная ветвь клебсиелл, с вирулентностью для мышей, колеблющейся $LD_{50} < 10^2$ до $LD_{50} > 10^4$ [200]. Клональный комплекс СС23 в базе данных включает 43 сиквенс-типа. Данные изоляты распространены на территории Азии (73 %) и Европы (22 %), отмечено их выделение при тяжелых заболеваниях человека: пневмония, бактериемия, сепсис, менингит, метрит и абсцесс печени. Превалируют гипермукоидные штаммы К1 серотипа (87 %), кроме того описаны штаммы с К-серотипами К57 (8 %), К2 (3 %) и К35 (n=1). У изолятов СС23 отмечено наличие генов бета-лактамаз SHV-, TEM-, CTX-M-, OXA-типов, а также AmpC DNA-1 [65]. В нашей коллекции все штаммы с генотипом ST23^{K1} были гипермукоидными и вирулентными для мышей с $LD_{50} = 16-1 \times 10^4$ КОЕ, а штаммы ST218 были преимущественно авирулентными для животных (таблица 4.1).

4.5 Капсула, капсульные серотипы и липополисахариды *K. pneumoniae*

К общепризнанным факторам патогенности *K. pneumoniae* относятся полисахаридная капсула и липополисахариды (ЛПС). При изучении культурально-морфологических свойств штаммов коллекции показано, что капсула присутствует у

бактерий как негипермукоидного, так и гипермукоидного фенотипа, однако у последних капсульное вещество более обильное (рисунок 4.5).

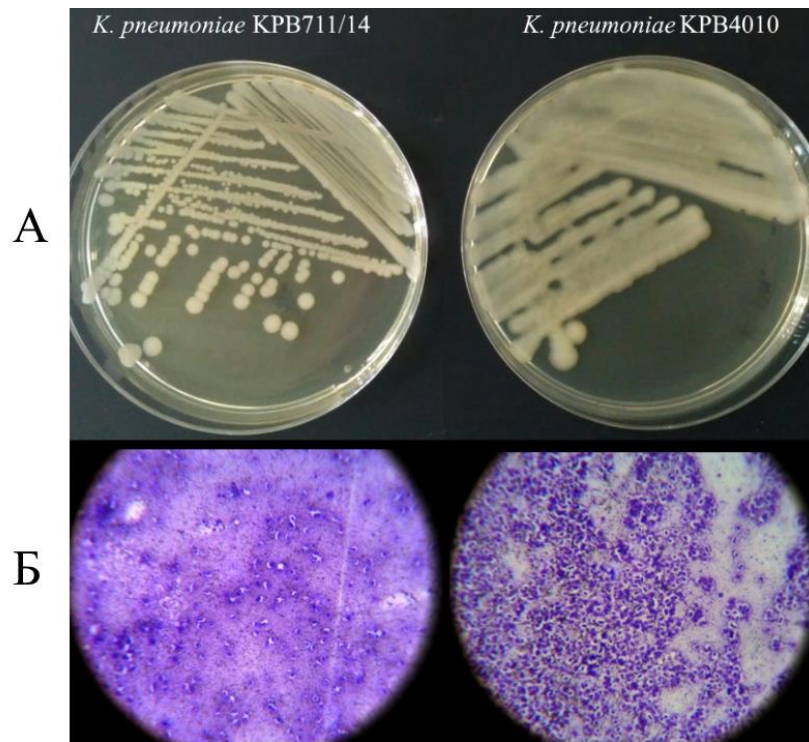


Рисунок 4.5 – Рост на ГРМ-агаре (А) и световая микроскопия $\times 1200$ препаратов клеток (Б) штаммов *K. pneumoniae* KPB711/14 (негипермукоидный) и *K. pneumoniae* KPB4010 (гипермукоидный)

Для 60 штаммов коллекции *K. pneumoniae* с помощью специфичных праймеров на гены *wzy* (полимераза Wzy-типа, участвующая в синтезе капсульного полисахарида), ассоциированные с шестью K-серотипами K1, K2, K5, K20, K54 и K57, идентифицированы K-типы: K57 (n=24), K2 (n=24), K1 (n=10) и K20 (n=2). Высоковирулентный для мышей референс-штамм *K. pneumoniae* KPM9 отнесен к K20 серотипу. Высоковирулентные для мышей клинические штаммы *K. pneumoniae* характеризовались K1 (n=7) и K2 (n=4) капсульными серотипами, средневирулентные для мышей штаммы – серотипами K1 (n=3), K2 (n=3) и K57 (n=1). K57 серотип был определен также у 5 авирулентных для мышей штаммов (таблица 4.1).

Для авирулентных штаммов клебсиелл, у которых с помощью набора праймеров на шесть K-типов серотип не был определен, K-тип определили с помощью секвенирования последовательности гена *wzi* (Wzi белок внешней мембраны, участвующий в прикреплении капсулы к поверхности клетки) и идентификации аллеля этого гена в базе данных MLST PASTEUR (Париж, Франция). По номеру аллеля,

ассоциированного с определенным капсульным серотипом, идентифицированы К-типы еще 13 штаммов *K. pneumoniae*: К62 - аллель *wzi62* (n=3), К14/64 - аллель *wzi64* (n=2), К47 - аллель *wzi120* (n=2), К60 - аллель *wzi93* (n=1), К27 - аллель *wzi27* (n=1), К57- аллель *wzi77* (n=1) и К28 - аллель *wzi84* (n=1). Кроме того, у двух штаммов был идентифицирован аллель *wzi420*, который в базе данных MLST PASTEUR не ассоциирован ни с одним из К-серотипов (рисунок 4.6, таблица 4.1, приложение Б). Секвенированные последовательности ДНК генов *wzy* и *wzi*, участвующих в капсулообразовании, размещены в базу данных GenBank (Приложение Б).

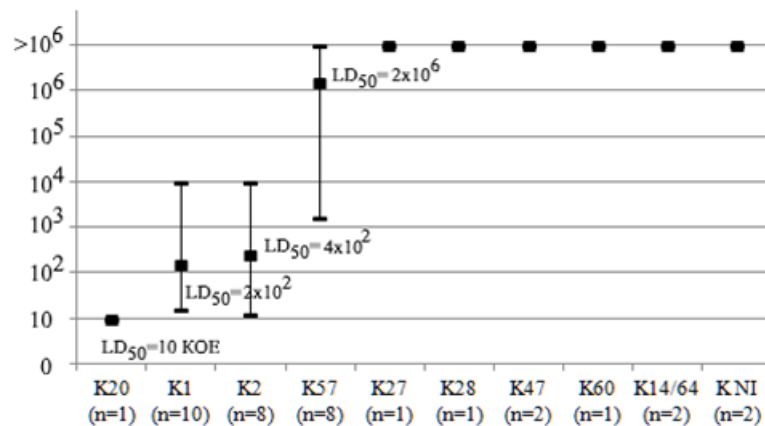
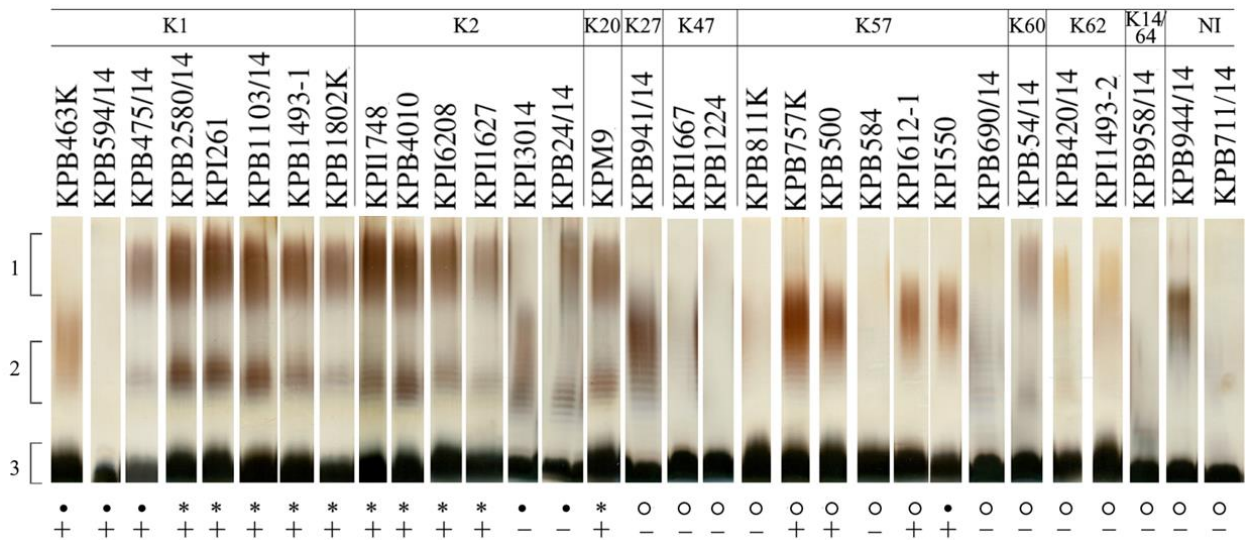


Рисунок 4.6 – LD₅₀ штаммов *K. pneumoniae* разных К-серотипов

Анализ профилей ЛПС показал, что наиболее вирулентные для мышей штаммы *K. pneumoniae* серотипов К1 и К2 имели как высокомолекулярные так и низкомолекулярные фракции ЛПС (за исключением трех штаммов - КРВ463К, КРВ594/14 и КРІ3014), то есть, «гладкий ЛПС», в отличие от авирулентных для мышей штаммов капсульных серотипов К27, К47, К57, К14/64 и штаммов с неидентифицированными К-серотипами, у которых выявляется только низкомолекулярная фракция, либо отсутствуют обе фракции О-антигена, «шероховатый ЛПС». У трех штаммов с К-серотипами К60 и К62 выявлены высокомолекулярные и низкомолекулярные фракции О-антигена, однако характер распределения и степень окрашенности бэндов существенно отличаются от таковых для вирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* (рисунок 4.7).



NI – неидентифицированный К-серотип; 1 – фракция высокомолекулярных ЛПС, 2 – фракция низкомолекулярных ЛПС, 3 – кор с липидом А; вирулентность штаммов для мышей: «•» - средневирулентные; «*» - высоковирулентные, «○» - авирулентные; «+» - гипермукоидный фенотип; «-» - негипермукоидный фенотип

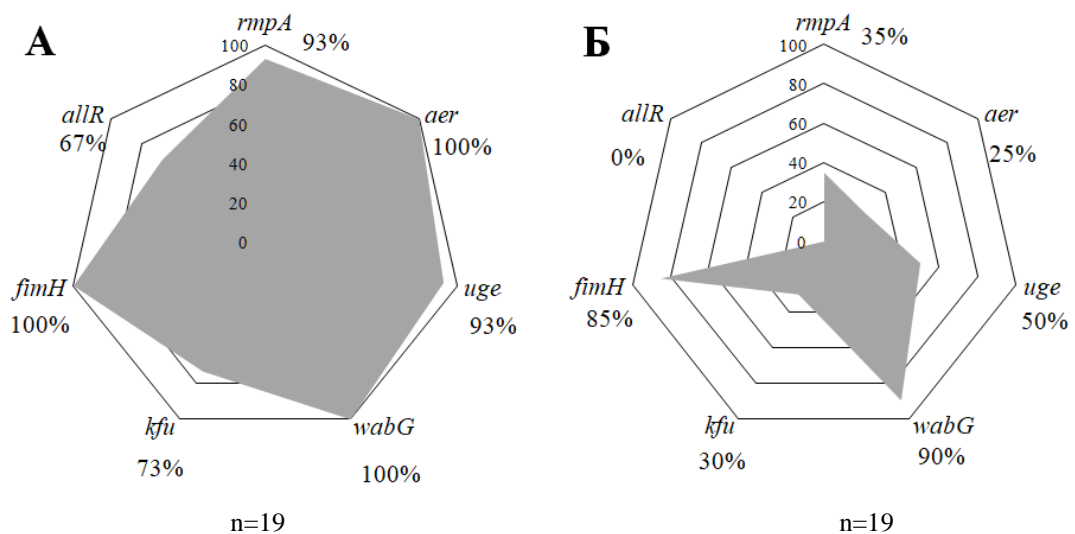
Рисунок 4.7 – ЛПС штаммов *K. pneumoniae* разных капсульных серотипов и их вирулентность для мышей

Таким образом, штаммы разных К-типов проявляли различную степень вирулентности для лабораторных животных. Наибольшую вирулентность проявляли гипермукоидные клинические штаммы *K. pneumoniae* капсульных серотипов К1 и К2, реже – К57, имеющие выраженные высокомолекулярные и низкомолекулярные фракции О-антигена. Полученные данные согласуются с опубликованными ранее сведениями о том, что вирулентные *K. pneumoniae* чаще характеризуются гипермукоидным фенотипом, К1 и К2 капсульными серотипами, а также «гладким ЛПС» [195].

4.6 Гены и генотипы вирулентности клинических штаммов *K. pneumoniae*

Анализ наличия генетических детерминант вирулентности клебсиелл изучали на коллекции из 151 клинического штамма *K. pneumoniae*, при этом в геномах определяли наличие семи генетических детерминант, на основании литературных данных, ассоциированных с проявлением вирулентности данного вида бактерий [67, 101, 121, 184, 195]. Показано, что наиболее распространенными в коллекции штаммов были гены, участвующие в синтезе ЛПС: *wabG* (93 % штаммов) и *uge* (79 %), а также ген *fimH*, кодирующий фимбрии I типа (91 %); менее распространенными были гены *kfu* (30 %) и

aer (21 %), связанные с утилизацией трехвалентного железа, а также ген *rmpA* (24 %), ассоциированный с гипермукоидным фенотипом; наиболее редко встречался ген регулятора аллантиинового регулона *allR* (7 %). С помощью ПЦР-детекции показано различие в наборах генов вирулентности у вирулентных и у авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*. У вирулентных штаммов значительно чаще представлены гены *uge* (93 %, по сравнению с 50 %), *kfu* (73 %, по сравнению с 30 %), *rmpA* (93 %, по сравнению с 35 %) и *aer* (100 %, по сравнению с 25 %). Ген внутреннего региона аллантиинового регулона *allR* был детектирован только у вирулентных штаммов *K. pneumoniae*. Все высоковирулентные для мышей штаммы несли гены *rmpA*, *aer*, *uge*, *wabG* и *fimH* (рисунок 4.8). Сходные результаты по частоте встречаемости генов вирулентности *K. pneumoniae* были опубликованы ранее в исследовании в Китае в 2016 г.: ген *wabG* присутствовал в 96 % штаммов, *kfu* – в 26 % штаммов, *aer* – в 22 % штаммов, *rmpA* – в 22 % штаммов и *allS* – в 14 % штаммов [108].



А – вирулентные для мышей штаммы; Б – авирулентные для мышей штаммы;

Рисунок 4.8 – Распределение генов вирулентности у вирулентных и авирулентных и для мышей клинических штаммов *K. pneumoniae*

В изучаемой коллекции штаммов *K. pneumoniae* описаны 14 вариантов сочетаний семи изучаемых генов вирулентности - генотипов вирулентности (Vir-генотипов). В ходе работы предложена номенклатура Vir-генотипов, основанная на обозначении количества генов вирулентности цифрой, а варианта сочетания генов – строчной буквой латинского алфавита.

В коллекции преобладали штаммы с тремя (48 %) и четырьмя (23 %) генами вирулентности (таблица 4.2).

Таблица 4.2 – Представленность генотипов вирулентности (Vir-генотипов) в коллекции штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в 2012-2016 гг.

| 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 |

Для 38 клинических штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к разным Vir-генотипам была определена вирулентность *in vivo* (полулетальная доза, LD₅₀) на модели аутбредных мышей. Показано, что вирулентные для мышей штаммы несли одновременно пять, шесть или семь генов вирулентности, а авирулентные – до четырех генов. Исключением является авирулентный для мышей (LD₅₀>10⁶ КОЕ) штамм *K. pneumoniae* КР112, несущий пять генов вирулентности *rmpA*, *uge*, *wabG*, *kfu* и *fimH*, вероятно, из-за отсутствия важного для проявления вирулентности гена аэробактина *aer*, который детектировался у 100 % вирулентных штаммов (таблица 4.1, рисунок 4.9).

Таким образом, на основании различий в распределении генов вирулентности в группах вирулентных и авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* установлено, что с вирулентностью данного патогена для мышей ассоциированы гены (в порядке убывания): *aer*, *rmpA*, *allR*, *kfu* и *uge*. Кроме того, показано, что важный вклад в вирулентность штамма вносит структура капсулы бактерии.

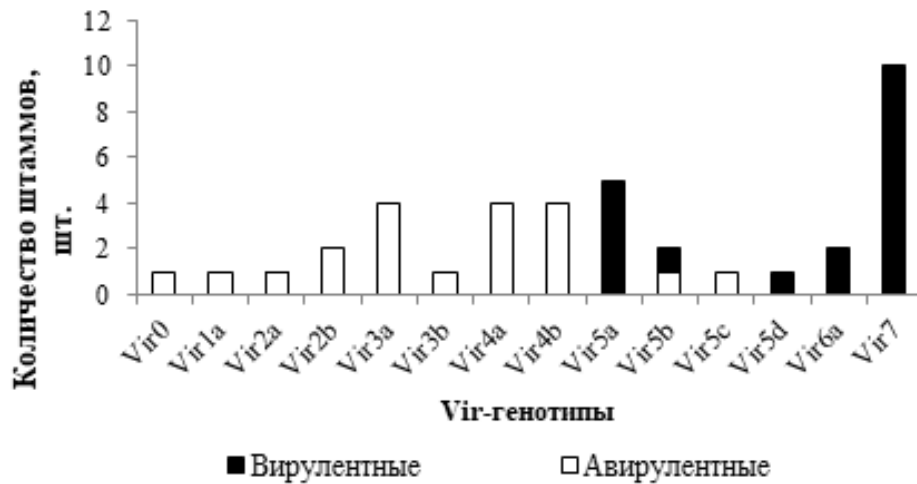


Рисунок 4.9 – Vir-генотипы вирулентных и авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*

4.7 Разработка методических рекомендаций для детекции генов вирулентности в штаммах *K. pneumoniae*

В качестве референс-штамма для ПЦР-детекции генов, ассоциированных с вирулентностью *K. pneumoniae* предложен клинический штамм *K. pneumoniae* KPI261 (Номер В-7850 в коллекции «ГКПМ-Оболенск»), выделенный 02.06.2014 г. из мокроты пациента Государственного бюджетного учреждения Департамента здравоохранения города Москвы «Инфекционная клиническая больница №1». Данный штамм характеризуется устойчивостью к АБП трех функциональных классов: бета-лактамам, аминогликозидам и сульфаниламидам; гипермукоидным фенотипом; высокой степенью вирулентности для мышей ($LD_{50}=16$ КОЕ); а также генотипом ST23^{K1} Vir7, то есть данный штамм обладает полным набором изучаемых в данном исследовании генетических детерминант вирулентности (таблица 4.3, рисунок 4.10).

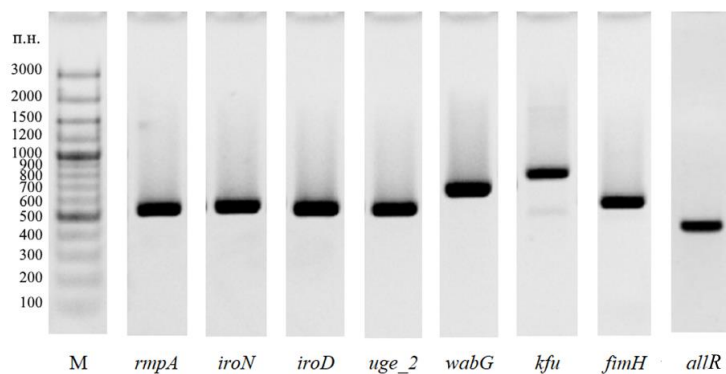
Описанный метод предназначен для молекулярно-генетического анализа штаммов *K. pneumoniae* посредством детекции семи генов вирулентности. Генотипы вирулентности (Vir-генотипы) могут служить инструментом внутривидового типирования клинических изолятов и эпидемически значимых штаммов *K. pneumoniae*.

Таблица 4.3 – Генетические детерминанты вирулентности референс-штамма

K. pneumoniae KPI261

| Ген-мишень | Температура отжига праймера, °С | Праймеры для детекции* | Размер ПЦР-продукта, п.н. | Ссылка на GenBank |
|--------------|---------------------------------|------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>rmpA</i> | 55 | rmpA-F, rmpA-R | 535 | KY026070 |
| <i>aer1</i> | 55 | aer1-F, aer1-R | 556 | KY026071 |
| <i>aer2</i> | 55 | aer2-F, aer2-R | 531 | KX906675 |
| <i>uge_2</i> | 60 | uge-F, uge-R | 535 | KX906674 |
| <i>wabG</i> | 55 | wabG-F, wabG-R | 683 | KX218441 |
| <i>kfu</i> | 60 | kfuB-F, kfuC-R | 797 | KY785317 |
| <i>fimH</i> | 60 | fimH-F, fimH-R | 550 | KX906676 |
| <i>allR</i> | 60 | 10E4-2-5F, 10E4-2-474R | 471 | KY026069 |

Примечание: * - ссылки на последовательности праймеров даны в Приложении А.



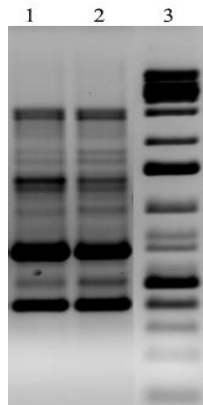
М - Маркер молекулярных масс ДНК Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США); *rmpA* – ген регулятора гипермукоидного фенотипа; *aer1* – ген кластера аэробактина; *aer2* – ген кластера аэробактина; *uge* – ген уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпипраз; *wabG*, ген глюкозилтрансферазы; *kfu* – ген кластера утилизации трехвалентного железа; *fimH* – ген белка фимбрий I типа; *allR* – ген внутреннего региона аллантаинового регулона

Рисунок 4.10 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов генов, ассоциированных с вирулентностью *K. pneumoniae*

4.8 Значимость гена регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA* для проявления вирулентности *K. pneumoniae* для мышей

Как описано в разделах 1.5.1 и 4.3, гипервирулентность клебсиелл для людей в значительной степени ассоциирована с гипермукоидностью, которая, в свою очередь, коррелирует с наличием гена *rmpA*. В нашей работе ген регулятора гипермукоидного

фенотипа *rmpA* выявлен у 36 клинических штаммов *K. pneumoniae*, из которых 34 штамма характеризовались положительным стринг-тестом. Все высоковирулентные для мышей штаммы имели гипермукоидный фенотип и несли ген *rmpA*. Исключением являлся авирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРВ584 ($LD_{50} > 10^6$ КОЕ), который не обладал признаком гипермукоидности, но в котором методом ПЦР детектировался ген *rmpA*. Для сравнения, штамм КРВ550 с аналогичными генетическими характеристиками был гипермукоидным и вирулентным для мышей ($LD_{50} = 1 \times 10^3$ КОЕ) (таблица 4.1, рисунок 4.11).



1 – *K. pneumoniae* КРВ584; 2 – *K. pneumoniae* КРВ550; 3 – маркер молекулярных масс GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США)

Рисунок 4.11 – RAPD-профили штаммов *K. pneumoniae*

Причина фенотипических различий штаммов была выявлена с помощью секвенирования гена *rmpA*: в штамме КРВ584, в отличие от всех других изучаемых штаммов *K. pneumoniae*, несущих ген *rmpA*, была обнаружена точечная делеция G в положении 286 п.н., приводящая к сдвигу рамки считывания с формированием стоп-кодона TAA в положении 340 п.н. и отсутствию экспрессии данного гена (рисунок 4.12). В 2015 г. была описана мутация в том же поли-G участке гена *rmpA*, но произошла вставка нуклеотида G. Отмечено, что штамм с данной мутацией не обладал гипермукоидным фенотипом и был авирулентен для лабораторных животных [196].

Таким образом, обнаружена однонуклеотидная делеция в гене *rmpA* в штамме *K. pneumoniae* КРВ584, объясняющая отсутствие гипермукоидного фенотипа у *rmpA*-позитивного штамма. Это подтверждает важность гена *rmpA* для формирования гипермукоидного фенотипа и реализации вирулентных свойств клетками *K. pneumoniae*.

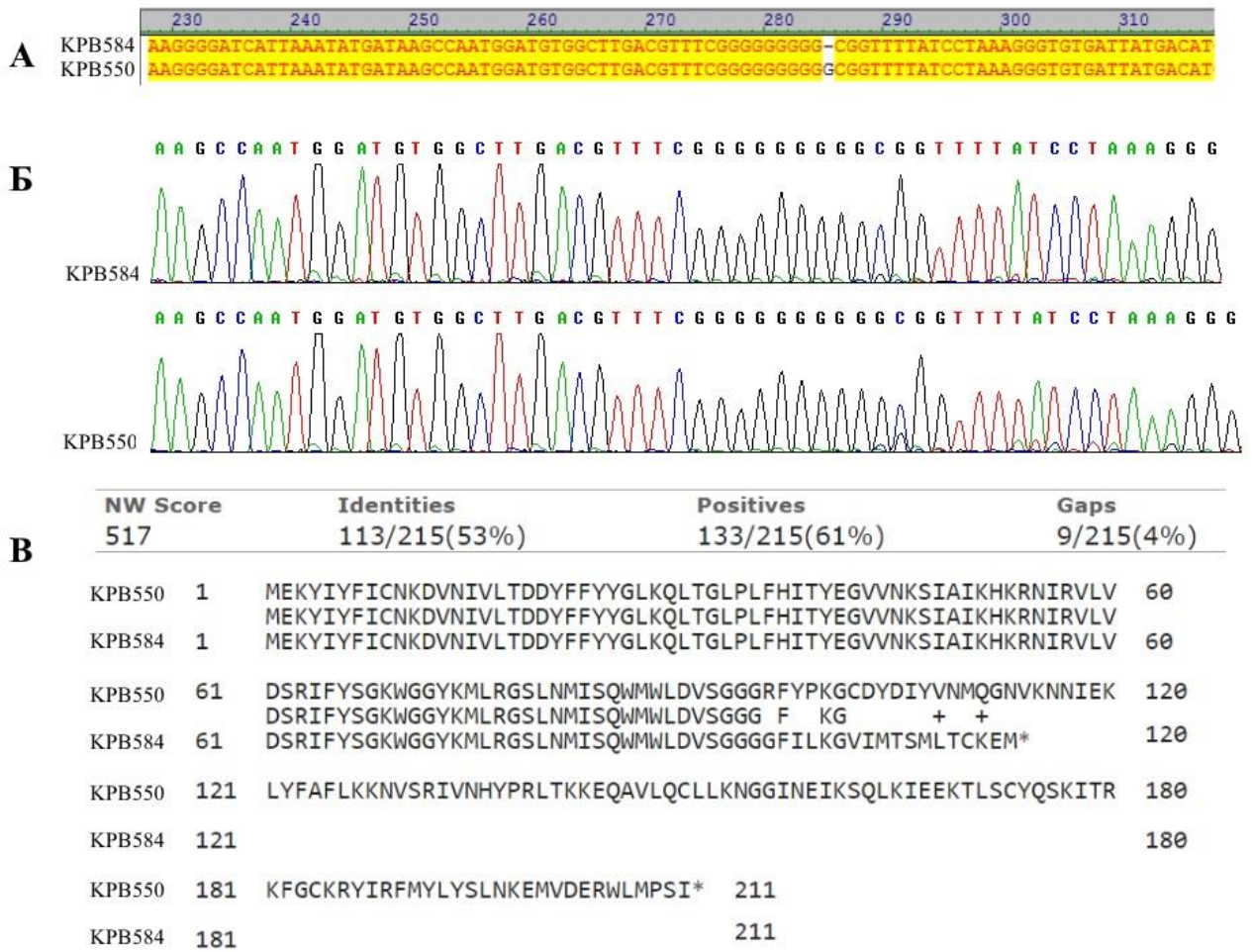
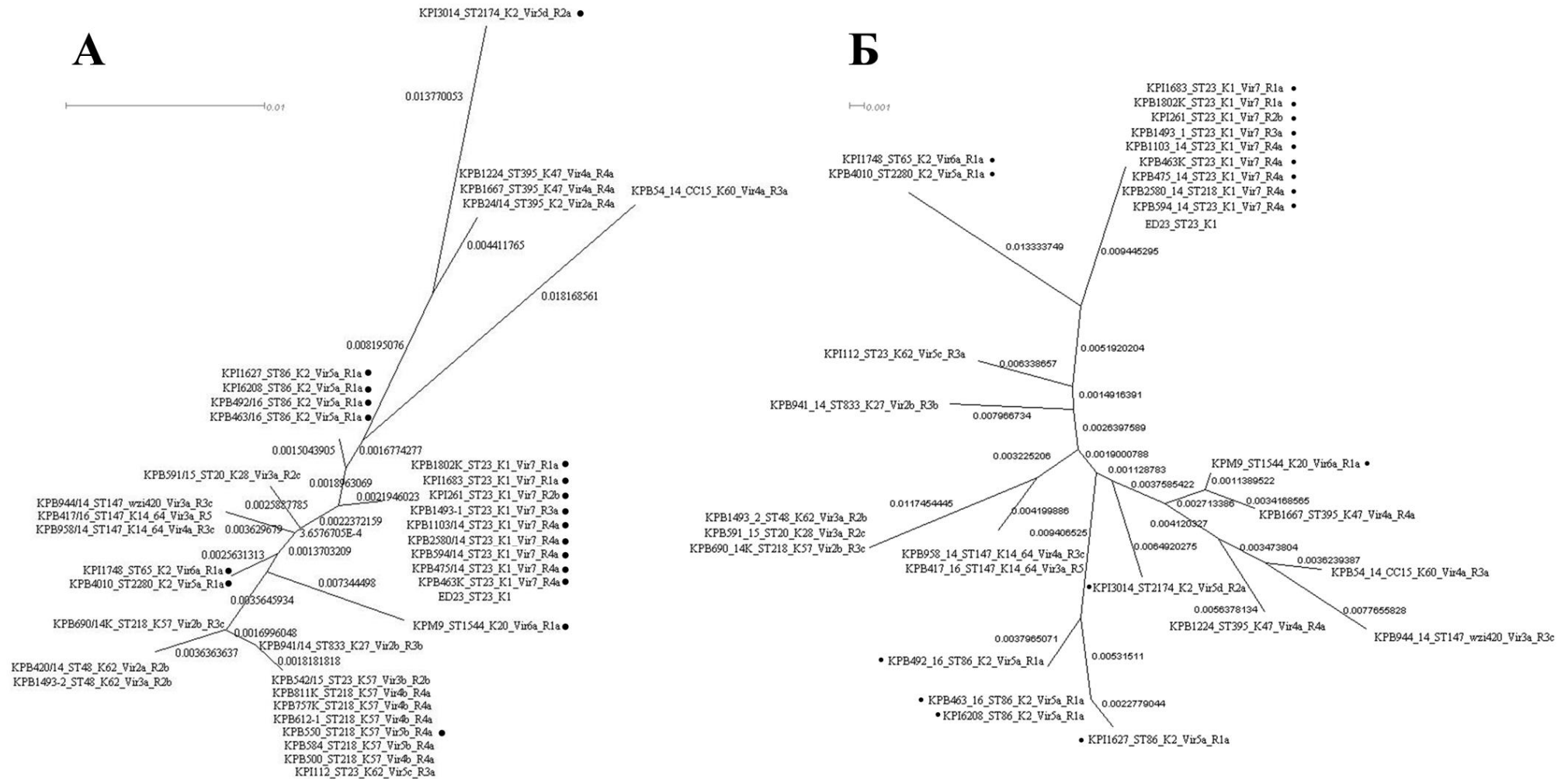


Рисунок 4.12 – Выравнивание фрагментов нуклеотидных последовательностей (А); хроматограмма (Б); трансляция последовательностей гена *rmpA* (Б) в штаммах *K. pneumoniae* KPB584 и KPB550

4.9 Вариабельность генов, участвующих в синтезе липополисахаридов *K. pneumoniae*

Секвенирование нуклеотидных последовательностей гена *wabG* (n=37), кодирующего фермент глюкозилтрансферазу, и гена *uge* (n=28), кодирующего фермент уридин-дифосфат-галактуронат-4-эпимеразу, вовлеченных в синтез ЛПС у *K. pneumoniae* показало, что данные гены вариабельны. Филогенетическое родство генов *wabG* и *uge* в изучаемых штаммах отражено на дендрограммах, построенных на основе анализа однонуклеотидных замен с использованием «метода объединения соседей» (англ., neighbor-joining method). В качестве референс-последовательностей использовали гены *wabG* и *uge* из полногеномной последовательности штамма *K. pneumoniae* ED23 (GenBank CP016814.1) (рисунок 4.13).



«•» – штаммы *K. pneumoniae*, вирулентные для мышей

Рисунок 4.13 – Дендрограммы, отражающие филогенетическое родство нуклеотидных последовательностей генов *wabG* (А) и *uge* (Б) в штаммах *K. pneumoniae*, с указанием принадлежности к сиквенс-типу, капсульному типу, Vir-генотипу и R-генотипу

Важно отметить, что референс-штамм *K. pneumoniae* ED23, выделенный в Китае в 2006 г. из крови пациента с первичным абсцессом печени и метастатическим менингитом, принадлежит к эволюционной ветви гипервирулентных *K. pneumoniae* с генотипом ST23^{K1} [116]. Все 9 вирулентных для мышей клинических штаммов ST23^{K1} с генотипами вирулентности Vir7, описанные в нашем исследовании, формируют с референс-штаммом ED23 единый кластер по последовательностям обоих генов - *wabG* и *uge*. Кроме того, по нуклеотидным последовательностям гена *wabG* выделены еще 6 кластеров (CC23^{K57/62}, ST86^{K2}, ST147, ST395^{K47/K2} CC65^{K2}, ST46^{K62}) и 6 одиночно расположенных штаммов. На дендрограмме последовательностей гена *uge* штаммы, не входящие в группу референс-штамма ED23, распределены менее кластерированно, что говорит о высокой гетерогенности данного гена у клебсиелл (рисунок 4.13).

Таким образом, кластеризация штаммов по нуклеотидным последовательностям генов *wabG* выражена в большей степени, чем по последовательностям гена *uge*. Отмечена корреляция вариантов гена *wabG* с сиквенс-типами и К-серотипами штаммов. Для гипермукоидных вирулентных штаммов *K. pneumoniae* отмечена идентичность нуклеотидных последовательностей генов *wabG* и *uge*.

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

Многолетние наблюдения в разных регионах мира, описанные в научной литературе, показали, что мультирезистентные и гипервирулентные *K. pneumoniae* представляют собой достаточно изолированные генетические линии [91]. Однако в последние годы появляются сведения об «объединении» потенциалов этих эволюционных ветвей клебсиелл [58, 175, 199].

В нашем исследовании большинство клинических штаммов *K. pneumoniae* (84 штамма из 151) по комплексу характеристик относились к ветви классических, мультирезистентных, клебсиелл. Как описано в разделах 3.2 – 3.4, большинство штаммов были одновременно устойчивы к 4-7 функциональным классам АБП, несли по 3-4 гена бета-лактамаз, относились к R-генотипам R3a, R3c и R4a. При этом, мультирезистентные штаммы несли преимущественно по 0-4 гена вирулентности, относились к Vir-генотипам Vir0, Vir1a, Vir2a, Vir2b, Vir3a, Vir3b, Vir4a и Vir4b

(таблица 4.4). Кроме того, к группе классических клебсиелл относились также штаммы, не обладающие мультирезистентностью (n=68). Выборочное изучение вирулентности данной группы штаммов на биологической модели аутобредных мышей показало, что они были авирулентными для животных (рисунок 4.14).

Таблица 4.4 – 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 классические не-МЛУ штаммы, голубым – классические МЛУ штаммы, желтым – гипервирулентные не-МЛУ штаммы, красным – гипервирулентные МЛУ штаммы *K. pneumoniae*

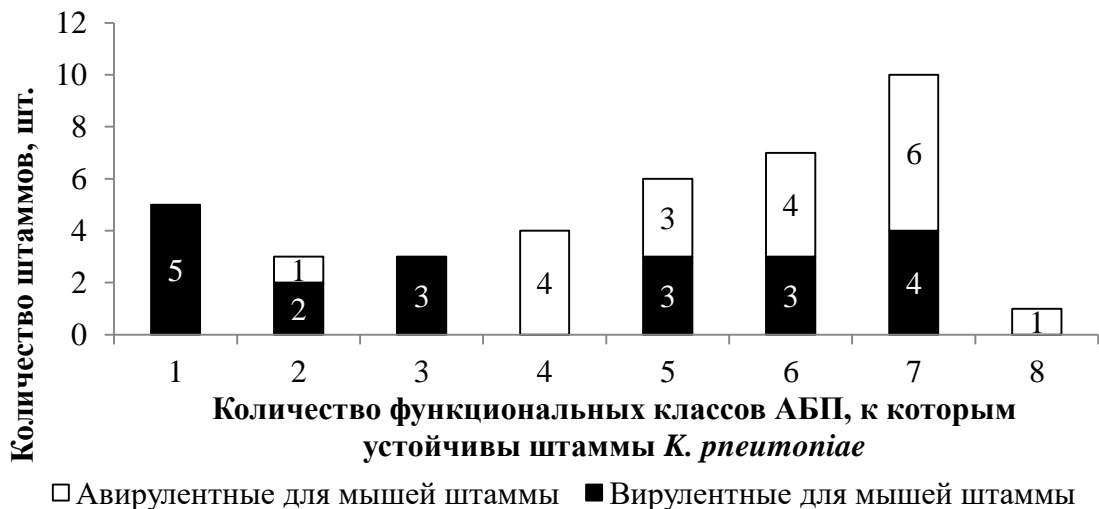


Рисунок 4.14 – Устойчивость к разному количеству функциональных классов АБП авирулентных и вирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*

Группа авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* (n=19) с Vir-

генотипами Vir0, Vir1a, Vir2a, Vir2b, Vir3a, Vir3b, Vir4a, Vir4b, Vir5c и Vir5d включала в себя штаммы, проявляющие устойчивость одновременно к восьми функциональным классам АБП (n=1), к семи (n=6), к шести (n=4), к пяти (n=3), к четырем (n=4) и к двум классам АБП (n=1). В своих геномах эти штаммы содержали одновременно по несколько генов бета-лактамаз (рисунок 4.14, таблица 4.1).

Меньшая часть изучаемой коллекции штаммов *K. pneumoniae* (27 штаммов из 151) имели по 5-7 изучаемых генов вирулентности, 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 характерно для эволюционной ветви гипервирулентных клебсиелл (рисунок 4.14, таблица 4.4).

Другая часть (n=10) характеризовалась наличием не только признаков гипервирулентности, но и одновременно мультирезистентности. Эти штаммы были вирулентными для мышей с $LD_{50}=1,7 \times 10^1 - 1 \times 10^4$ КОЕ и устойчивыми к 5-7 функциональным классам АБП: бета-лактамам, тетрациклинам, фторхинолонам, аминогликозидам, хинолонам, сульфаниламидам и нитрофуранам.

Особое внимание обращают на себя три штамма *K. pneumoniae* КРВ1493-1, КРВ2580/14 и КРВ1103/14, выделенные от пациентов с очень тяжелыми инфекциями дыхательной и нервной систем, впоследствии умерших, которые высоковирулентны для мышей, при этом устойчивые к 6 и 7 классам АБП, соответственно (таблица 4.1). Данные штаммы отнесены к сиквенс-типу ST23 и капсульному серотипу K1, что является характерным для гипервирулентных клебсиелл [174]. Интересно отметить, что по нуклеотидным последовательностям генов синтеза ЛПС *wabG* и *uge* эти штаммы кластеризуются с гипервирулентным референс-штаммом *K. pneumoniae* ED23 (раздел 4.9).

На основании литературных данных, гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью были описаны в последние десять лет. В 2008 г. в Южной Корее был описан штамм *K. pneumoniae* ST23^{K1} с геном цефалоспоринолазы *bla*_{CTX-M-15} [175], в 2014 г. в Аргентине - штаммы *K. pneumoniae* ST23^{K1}, несущие ген карбапенемазы *bla*_{KPC-2} [58], в 2015 г. в Китае – гипервирулентный штамм *K. pneumoniae* нового сиквенс-типа ST1797^{K1}, несущий ген *bla*_{KPC-2} [199], в 2016 г. во Франции – гипервирулентные штаммы ST23^{K1} с геном цефалоспоринолазы *bla*_{CTX-M-3} [176],

в 2017 г. в Южной Корее – штаммы *K. pneumoniae* с генотипом ST23^{K1}, несущие ген *bla*_{СТХ-М-15} [65]. В 2017 г. в Китае зафиксировано приобретение плазмид вирулентности pLVPK-типа мультирезистентными госпитальными *K. pneumoniae* ST11^{K47} [91].

Новизной нашего исследования является выявление штаммов *K. pneumoniae* гипервирулентного генотипа ST23^{K1}, несущих гены одновременно двух эпидемических бета-лактамаз: гена цефалоспоринызы *bla*_{СТХ-М-15} и гена карбапенемазы *bla*_{ОХА-48}.

Таким образом, полученные нами 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 АБП, обусловленной приобретением эпидемических генов цефалоспоринызы СТХ-М-15 и карбапенемазы ОХА-48, а также интегронов класса 1. Это, по-видимому, указывает на продолжающийся глобальный эволюционный процесс формирования нового «суперпатогена» на основе клонального комплекса СС23 клебсиелл.

4.11 Оценка вирулентности штамма *K. pneumoniae* КРМ9 после экспериментальной передачи плазмид резистентности

Для подтверждения возможности приобретения мультирезистентности вирулентными для человека и животных клебсиеллами, с сохранением высокой степени вирулентности штаммов был проведен ряд экспериментов по передаче генетических детерминант антибиотикорезистентности в высоковирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРМ9.

Методом конъюгативного переноса плазмид в клетки штамма *K. pneumoniae* КРМ9 осуществили передачу генов карбапенемазы *bla*_{ОХА-244}, цефалоспоринызы *bla*_{СТХ-М-15} и пенициллиназы *bla*_{ТЕМ-1} из мультирезистентного штамма *K. pneumoniae* КРВ757К с эффективностью $8,5 \times 10^{-4}$ (раздел 3.7.5). Получены два варианта трансконъюгантов: акцептировавших три гена бета-лактамаз (*bla*_{ОХА-244}, *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{ТЕМ-1}) и только один из этих генов (*bla*_{ОХА-244}) (таблица 4.5). Таким образом, было показано, что ген карбапенемазы *bla*_{ОХА-244} локализован на отдельном репликоне, а именно на плазмиде группы несовместимости IncL/M, в то время как гены *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{ТЕМ-1} располагались на общем плазмидном репликоне группы несовместимости IncFII, на

котором дополнительно локализован ген интегразы класса 1 (раздел 3.7.5).

Характер и скорость роста, а также степень мукоидности колоний для трансконъюгантов *K. pneumoniae* КРМ9р757-1 и КРМ9р757-2 не отличались от таковых показателей штамма *K. pneumoniae* КРМ9. Для штаммов КРМ9р757-1 и КРМ9р757-2 показатель LD₅₀ для белых аутбредных мышей при внутрибрюшинном заражении составил 24 и 18 КОЕ, соответственно, то есть находился на том же уровне, что у исходного штамма *K. pneumoniae* КРМ9 - LD₅₀=10 (таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Вирулентность для аутбредных мышей штамма *K. pneumoniae* КРМ9 и его вариантов, несущих дополнительные гены бета-лактамаз

| № | Штамм | Характеристика штамма | Эффективность передачи генов <i>bla</i> | Гены <i>bla</i> | LD ₅₀ , КОЕ |
|---|---------------|-----------------------|---|---|------------------------|
| 1 | КРМ9 | Реципиент | – | <i>bla</i> _{SHV-75} | 10 |
| 2 | КРМ9р757-1 | Трансконъюгант | 8,5×10 ⁻⁴ | <i>bla</i> _{SHV-75} + <i>bla</i> _{ОХА-244} + <i>bla</i> _{СТХ-М-15} + <i>bla</i> _{ТЕМ-1} | 24 |
| 3 | КРМ9р757-2 | Трансконъюгант | 8,5×10 ⁻⁴ | <i>bla</i> _{SHV-75} + <i>bla</i> _{ОХА-244} | 18 |
| 4 | КРМ9рЕТ-NDM-1 | Трансформант | 1,7×10 ⁻⁴ | <i>bla</i> _{SHV-75} + <i>bla</i> _{NDM-1} | 101 |

Примечание: *bla* – ген бета-лактамазы

Плазмиды, несущие ген металло-бета-лактамазы *bla*_{NDM-1}, из штаммов *K. pneumoniae* KPS409 и KPS410, методом конъюгативного переноса передать в штамм *K. pneumoniae* КРМ9 не удалось. Ген *bla*_{NDM-1}, клонированный в составе плазмиды рЕТ-NDM-1 [2], был передан в клетки *K. pneumoniae* КРМ9 с помощью криотрансформации ДНК с эффективностью 1,7×10⁻⁴ (таблица 4.5). Для штамма *K. pneumoniae* КРМ9рЕТ-NDM-1 показатель LD₅₀ для белых аутбредных мышей при внутрибрюшинном заражении составил 101 КОЕ, то есть вирулентность снизилась на один порядок по сравнению с исходным штаммом *K. pneumoniae* КРМ9.

На примере дозы заражения 1×10⁴ КОЕ/животное показано, что при заражении клетками штаммов *K. pneumoniae* КРМ9, КРМ9р757-1 и КРМ9р757-2 гибель всех животных происходила на 6-8 сутки после заражения, а при заражении клетками штамма *K. pneumoniae* КРМ9рЕТ-NDM-1 на 4 сутки погибало 80 % животных, 20 % мышей оставались живы до конца срока наблюдения (рисунок 4.15).

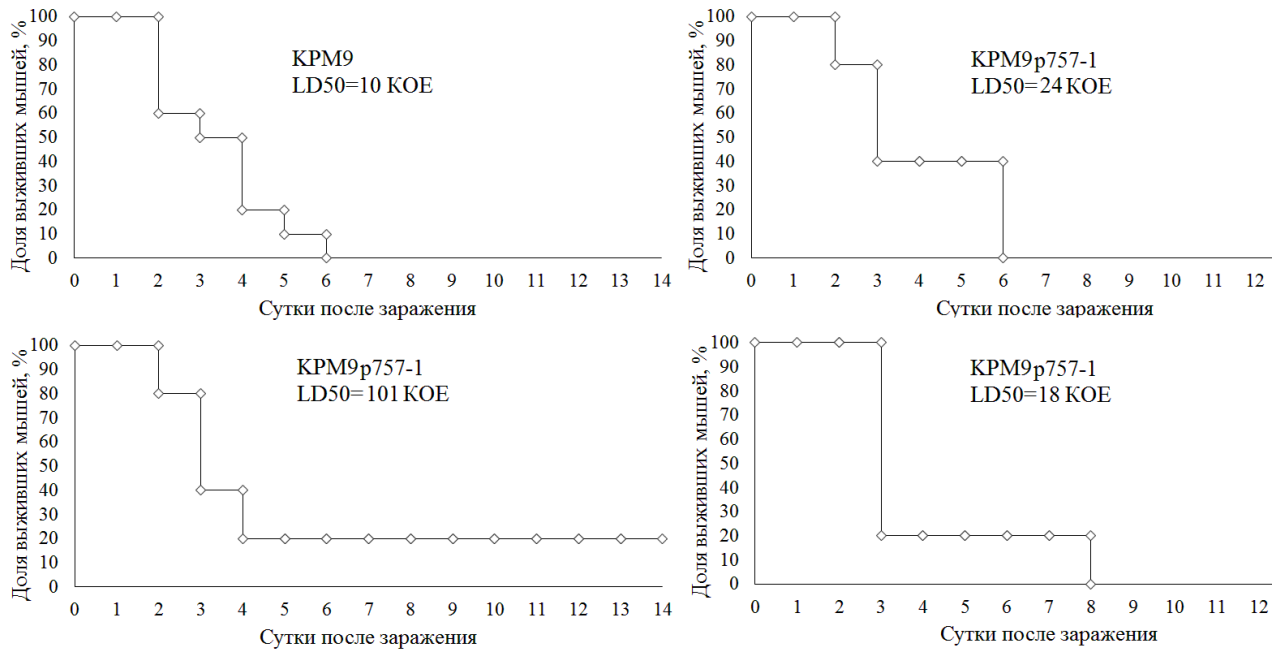
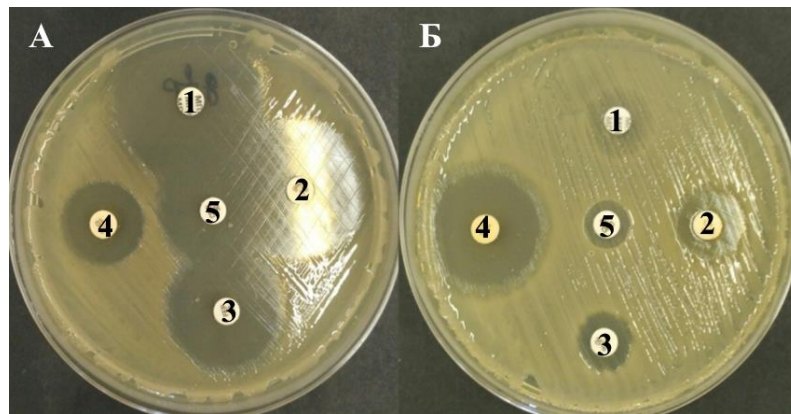


Рисунок 4.15 – Выживаемость белых аутбредных мышей при внутрибрюшинном заражении клетками штаммов *K. pneumoniae* КРМ9, КРМ9р757-1, КРМ9р757-2 и КРМ9рЕТ-NDM-1 в дозе 1×10^4 КОЕ/животное

Экспрессия переданных генов бета-лактамаз в клетках трансконъюгантов и трансформантов подтверждена с помощью фенотипических тестов диско-диффузионным методом и методом микроразведений в бульоне (рисунок 4.16).



А – *K. pneumoniae* КРМ-9; Б – *K. pneumoniae* КРМ9рЕТ-NDM-1; диски с АБП: 1 – меропенем (10 мг/л), 2 – имипенем (10 мг/л), 3 – цефепим (30 мг/л); 4 – эртапенем (10 мг/л); 5 – цефтриаксон (10 мг/л)

Рисунок 4.16 – Зоны подавления роста штаммов *K. pneumoniae* КРМ9 и КРМ9рNDM

Приобретение штаммом *K. pneumoniae* КРМ9 генов $bla_{\text{OXA-244}}$, $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{TEM-1}}$ приводило к формированию устойчивости клеток бактерий к цефтазидиму, цефтриаксону, цефепиму, эртапенему и имипенему; приобретение гена $bla_{\text{OXA-244}}$ – к

цефтриаксону, цефепиму и имипенему; а приобретение гена bla_{NDM-1} – ко всем использованным бета-лактамам (рисунок 4.16, таблица 4.6). Полученные данные согласуются с ожидаемыми фенотипами резистентности, которые обеспечивают гены $bla_{OXA-244}$, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{TEM-1} и bla_{NDM-1} на основании литературных данных.

Таблица 4.6 – Чувствительность к бета-лактамам клеток штамма *K. pneumoniae* KPM9 и его вариантов, акцептировавших гены $bla_{OXA-244}$, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{TEM-1} и bla_{NDM-1}

| Антибактериальные препараты | Штамм / МПК, мг/л | | | |
|-----------------------------|-------------------|------------|------------|---------------|
| | KPM9 | KPM9p757-1 | KPM9p757-2 | KPM9pET-NDM-1 |
| Ампициллин/сульбактам | >32 | >32 | >32 | >32 |
| Цефутоксим | >64 | >64 | >64 | >64 |
| Цефокситин | 32 | >64 | >64 | >64 |
| Цефтазидим | 2 | >64 | 2 | >64 |
| Цефтриаксон | 8 | >64 | 16 | >64 |
| Цефепим | <1 | >64 | 16 | 16 |
| Эртапенем | 1 | 4 | 1 | 8 |
| Имипенем | 2 | 8 | 16 | >64 |

Примечание: зеленым цветом выделены значения, соответствующие чувствительности к АБП, желтым – промежуточным значениям устойчивости, белым – устойчивости

Интересно, что для штамма-трансформанта KPM9pET-NDM-1 был характерен замедленный, по сравнению с исходным штаммом, рост на плотных питательных средах с 10 мг/л меропенема, сниженная степень мукоидности и уменьшенный размер колоний. При множественных пересевах на плотных питательных средах без селективного давления меропенема характер роста культуры и степень мукоидности колоний восстанавливались, а плазмида pET-NDM-1 утрачивалась. Таким образом, показана нестабильность наследования гибридной плазмиды pET-NDM-1, несущей ген металло-бета-лактамазы bla_{NDM-1} .

Таким образом, с помощью конъюгации и криотрансформации в клетки гипервирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* KPM9 были переданы гены эпидемических бета-лактамаз – карбапенемаз $bla_{OXA-244}$ и bla_{NDM-1} и цефалоспоринызы $bla_{CTX-M-15}$. Полученные в ходе эксперимента варианты штамма KPM9 характеризовались расширенным спектром устойчивости к карбапенемам и цефалоспорином при незначительном снижении показателя LD₅₀ для аутбредных мышей. Полученные данные экспериментально показывают принципиальную

возможность приобретения и экспрессии генов резистентности вирулентными клебсиеллами. Вопрос о стабильности таких гибридных штаммов остается открытым.

4.12 Заключение по Главе 4

Клинические штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в лечебных учреждениях г. Москвы в 2012-2016 гг., получены от пациентов с клебсиеллезными инфекциями в разных локусах организма и с разной степенью тяжести: от очень серьезных инфекций дыхательной и нервной систем до бессимптомного носительства в трахее, мочевыводящих путях и кишечнике. Использование *in vivo* модели клебсиеллезной инфекции на аутбредных мышах позволило разделить штаммы на три группы: авирулентные ($LD_{50} > 1 \times 10^6$ КОЕ), средневирулентные ($LD_{50} > 1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ КОЕ) и высоковирулентные ($LD_{50} < 500$ КОЕ) для мышей *K. pneumoniae*. Все вирулентные для мышей штаммы характеризовались гипермукоидным фенотипом, ассоциированным с капсульными серотипами K1, K2, K20 и K57 и сиквенс-типами ST23, ST86, ST218, ST65, ST1544, ST2174 и ST2280. Такие штаммы несли ген регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA*. Так же был выявлен *rmpA*-позитивный авирулентный штамм KPB584, который не обладал признаком гипермукоидности; в гене *rmpA* данного штамма была обнаружена точечная делеция, приводящая к отсутствию его экспрессии.

Отмечена высокая вариабельность генотипов изучаемых штаммов клебсиелл по наличию семи генов вирулентности: гена *rmpA*; генов кластера аэробактина *aer*, гена уридин-дифосфат-галактуронат-4-эпимеразы *uge*, гена глюкозилтрансферазы *wabG*, гена системы поглощения трехвалентного железа *kfu*, ген фимбрий I типа *fimH* и гена внутреннего региона аллантиинового регулона *allR*. В изучаемой коллекции штаммов выявлены 14 вариантов сочетания генов вирулентности (Vir-генотипов). Вирулентные для мышей штаммы *K. pneumoniae* принадлежали к Vir-генотипам с 5-7 генами вирулентности, а авирулентные – к Vir-генотипам с 0-5 генами. Несмотря на то, что гены *wagG* и *uge* присутствуют практически во всех штаммах, независимо от степени их вирулентности, первичная структура этих генов ассоциирована с филогенетическими группами, различающимися по вирулентности. Отмечена корреляция вариантов гена *wabG* с сиквенс-типами и K-типами штаммов. Для гипермукоидных вирулентных штаммов *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 отмечена идентичность нуклеотидных последовательностей генов *wabG* и *uge*.

В изучаемой коллекции *K. pneumoniae* присутствуют штаммы, соответствующие характеристикам широко распространенных в мире клональных комплексов: CC11, представленным изолятами классической эволюционной ветви *K. pneumoniae*, а также CC23 и CC65, представленными изолятами гипервирулентной эволюционной ветви клебсиелл. Важным результатом данного исследования является констатация факта, что в лечебных учреждениях г. Москвы впервые зафиксировано появление гипервирулентных штаммов сиквенс-типа ST23, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью. Так, три штамма *K. pneumoniae* с генотипами ST23^{K1} Vir7, выделенные в 2013-2014 гг. от пациентов с очень тяжелыми инфекциями дыхательной и нервной систем, впоследствии умерших, и высоковирулентные для мышей, были устойчивы к 6 и 7 классам АБП. Впервые описано наличие в штаммах ST23 одновременно генов двух эпидемических бета-лактамаз – цефалоспоринызы *bla*_{CTX-M-15} и карбапенемазы *bla*_{OXA-48}.

Принципиальная возможность приобретения плазмид резистентности вирулентными штаммами клебсиелл продемонстрирована экспериментально на примере передачи плазмид, несущих гены бета-лактамаз *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-244} и *bla*_{NDM-1} в высоковирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРМ9. При этом вирулентность рекомбинантных штаммов существенно не снижалась.

ГЛАВА 5. АНАЛИЗ ПОЛНЫХ ГЕНОМОВ ГИПЕРМУКОИДНЫХ И МУЛЬТИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

5.1 Характеристика полных геномов трех высоковирулентных и двух авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae*

Объектом исследования данного раздела являлись: (1) два мультирезистентных и авирулентных для мышей штамма *K. pneumoniae* КРВ417/16 и КРВ1470/16, выделенные из аспирата пациентов нейрореанимации г. Москвы в марте и сентябре 2016 г.; (2) один высоковирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРМ9, выделенный из пресной воды в Краснодарском крае при мышинной эпизоотии в 2011 г.; (3) два высоковирулентных для мышей штамма КРВ4010 и КР1261, выделенные из ликвора пациента нейрореанимации г. Москвы и из мокроты пациента инфекционной клинической больницы г. Москвы в 2013 и 2014 гг. (таблица 5.1).

Полногеномное секвенирование штаммов осуществляли с использованием платформы Illumina MiSeq. Первичные прочтения собирали *de novo*, в результате чего получены от 54 до 135 контигов для каждого генома. Размеры геномов штаммов варьировали от 5,43 до 5,72 Мб с GC-составом от 57,0 до 57,4 % и количеством кодирующих последовательностей от 5130 до 5401 (таблица 5.2).

5.2 Сиквенс-типы и капсульные типы

Анализ геномных последовательностей подтвердил принадлежность штаммов *K. pneumoniae* к ранее идентифицированным сиквенс-типам: ST23 штамма КР1261, ST2280 штамма КРВ4010, ST1544 штамма КРМ9, ST147 штаммов КРВ417/16 и КРВ1470/16. У всех штаммов *K. pneumoniae* идентифицированы кластеры генов синтеза капсульного полисахарида (CPS кластеры). Нуклеотидные последовательности кластеров CPS штаммов КР1261 и КРВ4010 были гомологичны на 99,98 % и 98,34 % с кластерами CPS штамма *K. pneumoniae* NTUH-K2044 K1 типа (GenBank AB924547.1) и штамма *K. pneumoniae* ATCC 43816 K2 типа (GenBank KJ541664.1), соответственно.

Таблица 5.1 – Фенотипическая характеристика 5 штаммов *K. pneumoniae*

| Штамм | Дата выделения | Источник выделения | Стринг-тест | МПК антибиотиков, мг/л | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|----------------|--------------------|-------------|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | | | | AMC | AMS | CEF | СТА | CAZ | CPS | FEP | IMI | TET | TGC | CIP | CM | GEN | TOB | AMI | CTZ | NIT |
| КРВ417/16 | 28.03.2016 | Аспират | - | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 1 | >4 | 4 | >16 | ND | >64 | <20 | 128 |
| КРВ1470/16 | 05.09.2016 | Аспират | - | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | >64 | 16 | >16 | 2 | 2 | >4 | >64 | >16 | >16 | >64 | <20 | 128 |
| КРМ9 | 01.09.2011 | Вода | + | >32 | >32 | >64 | 8 | <1 | 32 | <1 | <1 | 8 | 1 | <0,25 | 4 | <1 | <1 | <2 | <20 | ND |
| КРВ4010 | 31.10.2013 | Ликвор | + | >32 | >32 | >64 | 8 | >64 | 32 | >64 | 16 | ND | >8 | <0,25 | 8 | 4 | 8 | 8 | <20 | 512 |
| КРІ261 | 02.06.2014 | Мокрота | + | >32 | >32 | >64 | >64 | >64 | ND | >64 | <1 | <1 | ND | <0,25 | <2 | >16 | >16 | <2 | >320 | 64 |

Примечание: «+» – положительный стринг-тест; «-» – отрицательный стринг-тест; AMC - амоксициллин/клавулановая кислота; AMS – амоксициллин/сульбактам; CEF - цефуроксим; СТА - цефтриаксон; CAZ - цефтазидим; CPS – цефоперазон/сульбактам; FEP – цефепим; IMI – имипенем; TET – тетрациклин; TGC – тигециклин; CIP – ципрофлоксацин; CM – хлорамфеникол; GEN – гентамицин; TOB - тобрамицин; AMI - амикацин; CTZ – ко-тримоксазол; NIT – нитрофурантоин; ND – нет данных; зеленым цветом выделены МПК чувствительной культуры, желтым цветом – промежуточно-устойчивой

Таблица 5.2 – Основная статистическая информация о сборках и аннотации геномов пяти штаммов *K. pneumoniae*

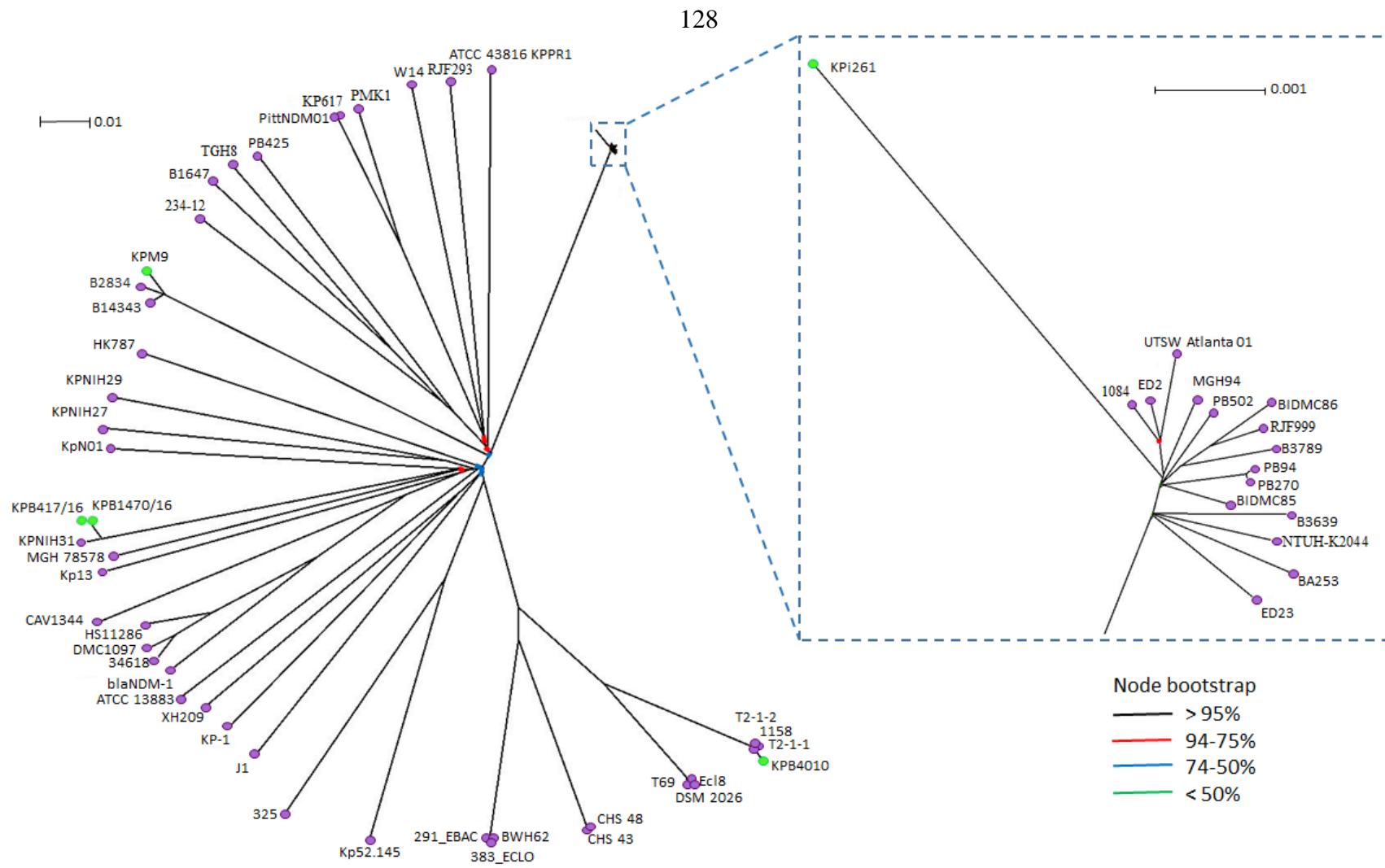
| Характеристика | Штамм <i>K. pneumoniae</i> | | | | |
|-------------------------------|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | КРІ261 | КРВ4010 | КРМ9 | КРВ417/16 | КРВ1470/16 |
| Номер в ГКПМ «Оболенск» | B-7850 | B-7846 | B-7749 | B-7954 | B-8045 |
| Номер GenBank | MCNO000000000.1 | MCNN000000000.1 | MCNM000000000.1 | NPJW000000000.1 | NPPI000000000.1 |
| Размер генома, п.н. | 5 719 189 | 5 431 785 | 5 427 926 | 5 625 359 | 5 637 851 |
| Количество контигов | 135 | 68 | 54 | 115 | 110 |
| Покрытие | 33 | 47 | 33 | 36 | 43 |
| G+C состав (%) | 57,0 | 57,1 | 57,4 | 57,0 | 57,0 |
| Количество генов | 5654 | 5389 | 5330 | 5473 | 5508 |
| Кодирующие последовательности | 5401 | 5192 | 5130 | 5367 | 5399 |
| Количество генов tРНК | 83 | 86 | 84 | 106 | 109 |

CPS кластер штамма *K. pneumoniae* KPM9 на 99,95 % идентичен CPS кластеру штамма *K. pneumoniae* AKPRH1294431 K20 типа (GenBank LT174542.1). CPS кластеры авирулентных для мышей штаммов KPB417/16 и KPB1470/16 были идентичны на 100,0 % нуклеотидной последовательности CPS кластера штамма *K. pneumoniae* AKPRH125171 K64 типа (GenBank LT174570.1). Полученные данные подтверждают результаты К-типирования с помощью ПЦР-детекции генов *wzu* и уточняют данные о К-типе штаммов KPB417/16 и KPB1470/16, у которых ранее был определен аллель гена *wzi64*, ассоциированный с двумя К-типами – К14 и К64 (раздел 4.5).

5.3 Филогенетический анализ полных геномов изучаемых штаммов

С помощью программы Wombac 2.0 определены единичные нуклеотидные полиморфизмы (SNP) полных геномов штаммов *K. pneumoniae* KPI261, KPB4010, KPM9, KPB417/16 и KPB1470/16, а также 56 штаммов *K. pneumoniae* из разных географических регионов, представленных в базе данных DDBJ/EMBL/GenBank и (приложение Г). Дендрограмма построена с использованием «метода ближайших соседей» в программе SplitsTree [100]. Значение bootstrap всех ветвей составило 99-100 %, за исключением нескольких ветвей в центральной области филогенетического дерева. Штаммы сгруппированы в кластеры, четко разделенные между собой, что демонстрирует гетерогенность *K. pneumoniae* по SNP (рисунок 5.1). Штамм *K. pneumoniae* KPB4010 на дендрограмме близко расположен с выделенным в Тайване в 2002 г. клиническим штаммом *K. pneumoniae* 1158, имеющим К2 капсульный серотип, и с двумя штаммами *K. pneumoniae*, выделенными в Малайзии с поверхности языка здорового человека. Штамм *K. pneumoniae* KPM9 расположен на отдельной ветви филогенетического дерева вместе с двумя штаммами, выделенными из крови пациентов в Индии в 2015 г. Штамм *K. pneumoniae* KPI261 отнесен к группе штаммов клонального комплекса CC23 с К1 капсульным серотипом, большинство из которых были выделены из крови пациентов с первичными абсцессами печени: *K. pneumoniae* 1084 [118], *K. pneumoniae* NTUH_K2044 [47], *K. pneumoniae* ED2 и ED23 [116].

Клинические штаммы *K. pneumoniae* KPB417/16 и KPB1470/16 расположены на одной ветви филогенетического дерева со штаммом *K. pneumoniae* KPNH31, выделенном из мочи пациента в США в 2013 г.



Зеленым цветом отмечены положения изучаемых штаммов *K. pneumoniae*

Рисунок 5.1 - Филогенетическое дерево

С помощью базы данных MLST PASTEUR у данного штамма нами определен сиквенс-тип ST392, включенный в клональный комплекс CC147, и К-серотип K27, ассоциированный с аллелем *wzc28* гена кластера капсулообразования.

Таким образом, для гипермукоидных высоковирулентных для человека и лабораторных животных штаммов *K. pneumoniae* KPI261, KPB4010 и KPM9 выявлено генетическое родство с гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*, выделенными в других регионах мира. А для авирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* KPB417/16 и KPB1470/16, продуцирующих эпидемическую карбапенемазу NDM-1 установлено их филогенетическое родство с госпитальным штаммом *K. pneumoniae* KPNIN31, продуцирующим эпидемическую карбапенемазу KPC-2.

5.4 Сравнительный анализ резистомов и факторов вирулентности высоковирулентных и мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae*

В полных геномах пяти изучаемых штаммов *K. pneumoniae* с помощью веб-сервиса ResFinder-2.1 выявлены 24 гена, ассоциированные с резистентностью к бета-лактамам (n=17), аминогликозидам (n=14), фторхинолонам (n=6), фосфомицинам (n=5), сульфаниламидам (n=4), триметоприму (n=3), макролидам (n=4) и фениколам (n=3). Хромосомные гены резистентности (*bla_{SHV}*, *oqxAB* и *fosA*) одинаково представлены во всех изучаемых штаммах, а плазмидные (гены бета-лактамаз, аминогликозид-модифицирующих ферментов, Qnr белков и др.) в большей степени представлены в геномах мультирезистентных штаммов (таблица 5.3). В геномах высоковирулентных штаммов *K. pneumoniae* KPI261, KPB4010 и KPM9 идентифицировано по 1-2 гена бета-лактамаз и по 2-6 генов устойчивости к другим классам АБП, а в геномах авирулентных штаммов *K. pneumoniae* KPB417/16 и KPB1470/16 – по 6-7 генов бета-лактамаз и по 12-17 генов устойчивости к другим классам АБП (таблица 5.3). Таким образом, полные геномы авирулентных для мышей клинических штаммов *K. pneumoniae* KPB417/16 и KPB1470/16 отличаются большим набором генов устойчивости к АБП, по сравнению с гипервирулентными для мышей штаммами KPI261, KPB4010 и KPM9.

Таблица 5.3 – Генетические детерминанты устойчивости к АБП и плазмидные репликоны, выявленные в полных геномах пяти штаммов *K. pneumoniae*

| Гены | Штаммы <i>K. pneumoniae</i> (совпадение с референс-последовательностью, %) | | | | |
|--------------------------------|--|------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| | КР1261 | КРВ4010 | КРМ9 | КРВ417/16 | КРВ1470/16 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Устойчивость к бета-лактамам | | | | | |
| <i>bla_{SHV}*</i> | <i>bla_{SHV-36}</i> (99,7) | <i>bla_{SHV-11}</i> (99,8) | <i>bla_{SHV-75}</i> (100,0) | <i>bla_{SHV-11}</i> (100,0) | <i>bla_{SHV-11}</i> (100,0) |
| <i>bla_{CTX-M}</i> | <i>bla_{CTX-M-15}</i> (100,0) | – | – | <i>bla_{CTX-M-15}</i> (100,0) | <i>bla_{CTX-M-15}</i> (100,0) |
| <i>bla_{TEM}</i> | – | – | – | <i>bla_{TEM-1}</i> (100,0) | <i>bla_{TEM-1}</i> (100,0) |
| <i>bla_{NDM}</i> | – | – | – | <i>bla_{NDM-1}</i> (100,0) | <i>bla_{NDM-1}</i> (100,0) |
| <i>bla_{OXA}</i> | – | – | – | <i>bla_{OXA-1}</i> (100,0) | <i>bla_{OXA-1}</i> (100,0) |
| | – | – | – | <i>bla_{OXA-9}</i> (99,9) | <i>bla_{OXA-9}</i> (99,9) |
| | – | – | – | <i>bla_{OXA-48}</i> (100,0) | – |
| Устойчивость к аминигликозидам | | | | | |
| <i>aadA1</i> | <i>aadA1</i> (100,0) | – | – | <i>aadA1</i> (100) | <i>aadA1</i> (100) |
| <i>aadA2</i> | – | – | – | <i>aadA2</i> (100) | <i>aadA2</i> (100) |
| <i>aadB</i> | <i>aadB</i> (99,1) | – | – | – | – |
| <i>armA</i> | – | – | – | <i>armA</i> (100) | <i>armA</i> (100) |
| <i>strAB</i> | – | – | – | – | <i>strAB</i> (99,8) |
| <i>aph(3')-VIa</i> | – | – | – | <i>aph(3')-VIa</i> (98,5) | <i>aph(3')-VIa</i> (98,5) |
| <i>aac(6')Ib-cr</i> | – | – | – | <i>aac(6')Ib-cr</i> (99,5) | <i>aac(6')Ib-cr</i> (99,8) |
| <i>aac(3)-IIa</i> | – | – | – | – | <i>aac(3)-IIa</i> (99,8) |
| Устойчивость к фторхинолонам | | | | | |
| <i>oqxAB*</i> | <i>oqxAB</i> (99,7) | <i>oqxAB</i> (99,7) | <i>oqxAB</i> (99,5) | <i>oqxAB</i> (99,5) | <i>oqxAB</i> (99,5) |
| <i>qnrS1</i> | – | – | – | – | <i>qnrS1</i> (100,0) |
| Устойчивость к фосфомицинам | | | | | |
| <i>fosA*</i> | <i>fosA</i> (97,4) | <i>fosA</i> (96,9) | <i>fosA</i> (96,9) | <i>fosA</i> (98,8) | <i>fosA</i> (98,8) |
| Устойчивость к сульфаниламидам | | | | | |
| <i>sul1</i> | <i>sul1</i> (100,0) | – | – | <i>sul1</i> (100,0) | <i>sul1</i> (100,0) |
| <i>sul2</i> | – | – | – | – | <i>sul2</i> (100,0) |
| Устойчивость к триметоприму | | | | | |
| <i>dfrA1</i> | <i>dfrA1</i> (100,0) | – | – | – | – |
| <i>dfrA12</i> | – | – | – | <i>dfrA12</i> (100) | <i>dfrA12</i> (100) |
| Устойчивость к макролидам | | | | | |
| <i>msr(E)</i> | – | – | – | <i>msr(E)</i> (100,0) | <i>msr(E)</i> (100,0) |
| <i>mph(E)</i> | – | – | – | <i>mph(E)</i> (99,9) | <i>mph(E)</i> (99,9) |
| Устойчивость к фениколам | | | | | |
| <i>catA2</i> | – | – | – | – | <i>catA2</i> (96,1) |
| <i>catB4</i> | – | – | – | <i>catB4</i> (100,0) | <i>catB4</i> (100,0) |
| Группы несовместимости плазмид | | | | | |
| IncHI1B | 99,2 | 99,3 | 99,3 | 100,0 | 100,0 |
| IncA/C2 | 100,0 | – | – | – | – |
| IncL/M | – | – | – | 100,0 | – |
| FIA | – | – | – | 95,6 | 95,6 |
| IncFIB | – | – | – | 100,0 | 100,0 |
| IncFII | – | – | – | 98,0 | 98,0 |

Примечание: * - гены, локализованные на контигах, ассоциированных с хромосомой *K. pneumoniae*

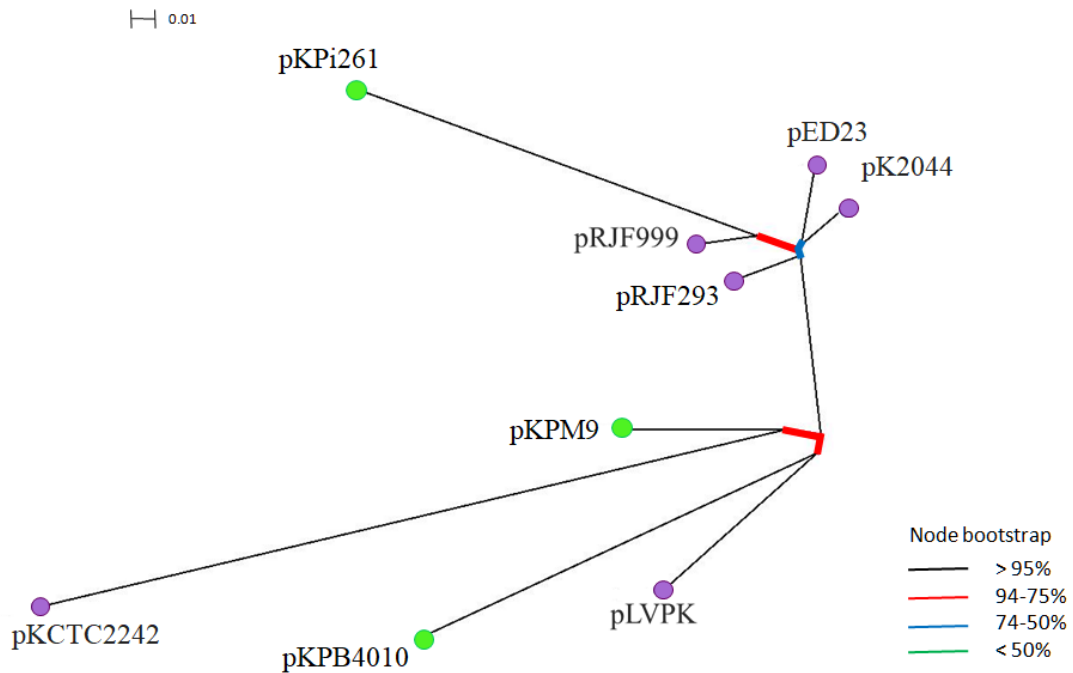
Нуклеотидные последовательности плазмид выявлены в контигах всех пяти штаммов *K. pneumoniae*. С помощью web-ресурса PlasmidFinder [53] идентифицировали группы несовместимости плазмид, маркеры которых присутствуют в полных геномах штаммов (таблица 5.3). Последовательности репликонов групп FIA, IncFIB и IncFII присутствуют только у авирулентных для мышей и МЛУ штаммов КРВ417/16 и КРВ1470/16. Плазмидный репликон IncL/M, ассоциированный с генами карбапенемаз *bla*_{ОХА-48}-типа, выявлен в штамме КРВ417/16. Особое внимание привлекает плазида группы несовместимости IncA/C2, идентифицированная в штамме КР1261, по-видимому, несущая ген эпидемической цефалоспоринызы *bla*_{СТХ-М-15}. Нуклеотидные последовательности репликонов группы несовместимости IncHI1В присутствуют у всех изучаемых штаммов *K. pneumoniae*. Для плазмид этой группы несовместимости у высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* КР1261, КРВ4010 и КРМ9 выявлены гомологи в базе данных GenBank: высокомолекулярные плазмиды рLVPK, рК2044, рRJF293, рRJF999, рКСТС2242 и рED23, несущие генетические детерминанты вирулентности *K. pneumoniae* [63] (таблица 5.4).

Таблица 5.5 – Характеристики плазмид *K. pneumoniae*

| 1 | Название плазмиды | Ссылка на GenBank | Размер, bp | GC, % | CDS | Штамм <i>K. pneumoniae</i> | Ссылка на публикацию |
|---|-------------------|-------------------|------------|-------|-----|----------------------------|----------------------|
| 1 | рED23 | CP016815.1 | 212770 | 50.10 | 246 | ED23 | – |
| 2 | рК2044 | AP006726.1 | 224152 | 50.17 | 281 | NTUH-K2044 | Wu et al., 2009 |
| 3 | рКСТС2242 | CP002911.1 | 202852 | 50.2 | 229 | КСТС 2242 | Shin et al., 2012 |
| 4 | рLVPK | AY378100.1 | 219385 | 50.35 | 251 | CG43 | Chen et al., 2004 |
| 5 | рRJF293 | CP014009.1 | 224263 | 50.11 | 216 | RJF293 | – |
| 6 | рRJF999 | CP014011.1 | 228907 | 50.1 | 215 | RJF999 | – |

Выявлены 203 SNP в нуклеотидных последовательностях плазмид вирулентности в изучаемых штаммах и в референс-плазмидах, на основании которых построено филогенетическое дерево (рисунок 5.2).

Плазмиды группы IncHI1В в высоковирулентных штаммах КР1261, КРВ4010 и КРМ9, в отличие от плазмид в авирулентных штаммах, несли гены аэробактин-продуцирующей системы *iucABCDiutA* и двух дополнительных систем транспорта железа – *iroBCDN*, кластера генов утилизации железа через катехол-содержащий сидерофор, и *fecIRA*, Fur-зависимой регуляторной системы утилизации железа.



Зеленым цветом отмечены плазмиды изучаемых штаммов *K. pneumoniae*, фиолетовым – референсные плазмиды

Рисунок 5.2 – Филогенетическое дерево гомологичных последовательностей плазмид *K. pneumoniae*

Последовательности генов, кодирующих систему *iucABCDiutA*, были на 100 % гомологичны для плазмид изучаемых штаммов KPI261, KPB4010 и референс-плазмид pLVPK и pK2044. В то же время, последовательность гена *iutA* в штамме KPM9 содержала один SNP, отличающий ее от последовательностей этого гена в других штаммах. Нуклеотидные последовательности генов кластеров *iroBCDN* и *fecIRA* штаммов KPI261, KPB4010 и KPM9 были идентичны более чем на 99 % таковым последовательностям на плаزمидах pLVPK и pK2044. Гены регуляторов гипермукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2* были выявлены также только в геномах высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* KPI261, KPB4010 и KPM9, и были гомологичны на 100 и 99 % таковым генам плазмид pLVPK и pK2044.

Хромосомный фактор вирулентности – 22 – т.п.н. регион аллантаинового регулона (*all* регион) выявлен в штамме KPI261, а оперон *kfi*, кодирующий систему утилизации железа - в штаммах KPI261 и KPM9. В литературе отмечено наличие данных структур у штаммов клонального комплекса CC23 и их отсутствие почти во всех штаммах других генетических линий [174].

Данные генетические детерминанты вирулентности *K. pneumoniae* не были обнаружены в высоковирулентном штамме КРВ4010 и авирулентных штаммах *K. pneumoniae* КРВ417/16 и КРВ1470/16.

Таким образом, анализ полных геномов высоковирулентных и мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* позволил выявить дополнительные детерминанты антибиотикорезистентности и вирулентности, по сравнению с детекцией методом ПЦР, расширил спектр характеристик для сравнительного анализа двух эволюционных групп клебсиелл.

5.5 Выявление последовательности профага в мультирезистентном штамме

K. pneumoniae КРВ1470/16 сиквенс-типа ST147

Как было описано в разделе 3.8, штаммы *K. pneumoniae* КРВ417/16 и КРВ1470/16 были первыми штаммами, содержащими ген эпидемически значимой металло-бета-лактамазы NDM-1, детектированными нами в нейрореанимации г. Москвы в марте и сентябре 2016 г., впервые за период наблюдения с декабря 2012 г. Отмечена высокая степень гомологии (99,99 %) полногеномных последовательностей этих штаммов. Они принадлежат к ST147, характерному для множественно резистентных штаммов. Отличие состоит в наличии дополнительной плазмиды группы несовместимости IncL/M, несущей ген карбапенемазы *bla*_{OXA-48} в штамме КРВ417/16, а также в наличии генов *strAB*, *qnrS1*, *aac(3)-IIa*, *sul2* и *catA2* в штамме КРВ1470/16, локализация которых не определена.

Сравнительный анализ хромосомных последовательностей штаммов КРВ417/16 и КРВ1470/16 показал наличие в штамме КРВ1470/16 дополнительного участка ДНК размером 45 т.п.н. (рисунок 5.3). Данная нуклеотидная последовательность была аннотирована с помощью web-ресурса Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) v.2.0 как последовательность вируса (профага). Она характеризовалась GC составом 53,0 %, в отличие от 57,0 % генома штамма КРВ1470/16, включала в себя 73 кодирующих последовательности, в том числе гены белков бактериофага (рисунок 5.3). Нуклеотидная последовательность профага имела 99 % идентичности (с покрытием 85 %) с участком полного генома штамма *K. pneumoniae* TGH13 ST147 (GenBank CP012745.1), выделенного в Греции от пациента с бактериальной инфекцией в 2014 г.

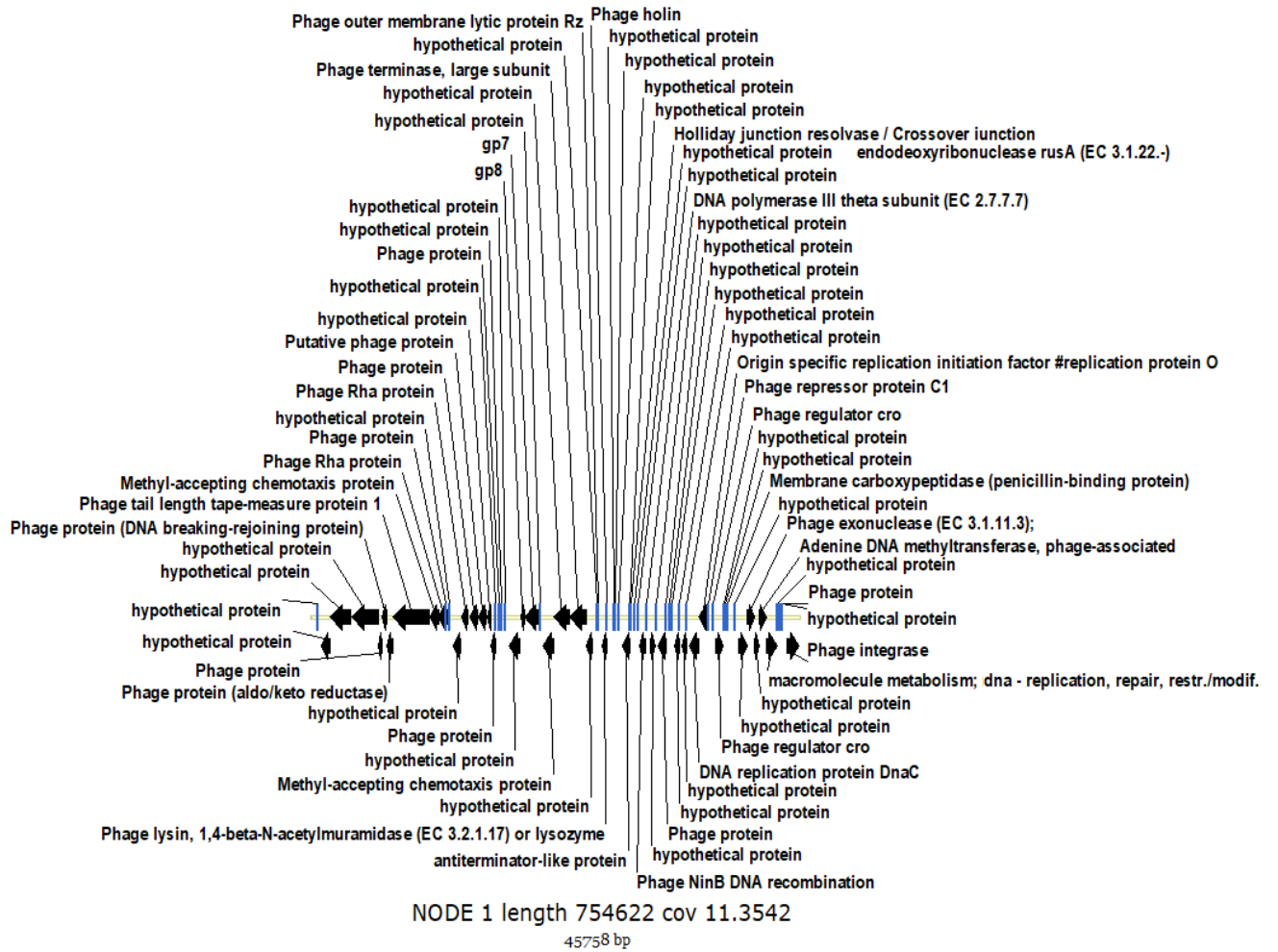


Рисунок 5.3 – Карта нуклеотидной последовательности профага штамма КРВ1470/16 в программе Vector NTI

Интересно, что, помимо фаговых белков, в профаге идентифицированы три последовательности 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.

5.7 Заключение по Главе 5

Полногеномное секвенирование пяти штаммов *K. pneumoniae* – трех высоковирулентных для мышей гипермукоидных штаммов KPI261, KPB4010 и KPM9 и двух авирулентных для мышей NDM-1-продуцирующих штаммов KPB417/16 и KPB1470/16, подтвердило их принадлежность к сиквенс-типам ST23, ST2280, ST1544 и ST147 и к капсульным серотипам K1, K2 K20 и K64.

Определено филогенетическое родство геномов изучаемых штаммов с геномами *K. pneumoniae*, представленными в международной базе данных GenBank. Показана кластеризация вирулентных для мышей штаммов со штаммами клональных комплексов CC23 и неидентифицированных, выделенными в Азиатско-Тихоокеанском регионе в 2002-2016 гг., а NDM-1-продуцирующих штаммов – с KPC-2-продуцирующим штаммом клонального комплекса CC147, выделенным в США в 2013 г. Геномы авирулентных штаммов *K. pneumoniae* KPB417/16 и KPB1470/16 отличались резистомами, большими по количеству генов устойчивости к АБП (6-7 генов бета-лактамаз и 12-17 генов устойчивости к АБП других функциональных классов), по сравнению с таковыми у высоковирулентных для мышей штаммов KPI261, KPB4010 и KPM9 (1-2 гена бета-лактамаз и 2-6 генов устойчивости к другим классам АБП).

Выявлены нуклеотидные последовательности репликонов плазмид *K. pneumoniae* – у всех штаммов присутствовал репликон группы несовместимости IncHI1B, в штаммах KPB417/16 и KPB1470/16 – репликоны FIA, IncFIB и IncFII; у штамма KPI261 – репликон IncA/C2, у штамма KPB417/16 – репликон IncL/M. У высоковирулентных для мышей штаммов выявлены гомологи pLVPK-подобных плазмид вирулентности.

Помимо плазмидных детерминант вирулентности, у штаммов KPI261 и KPM9 выявлен хромосомный оперон *kfu*, кодирующий систему утилизации железа, а также (у штамма KPI261) - хромосомный 22-kb регион аллантаинового регулона.

Сравнительный анализ хромосомных последовательностей штаммов KPB417/16 и KPB1470/16 показал наличие в хромосоме штамма KPB1470/16 последовательности профага размером 45 т.п.н., включающей в себя 73 гена, 85 % которой на 99 % идентична с участком полного генома штамма *K. pneumoniae* TGH13 сиквенс-типа ST147, выделенного в Греции в 2014 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования описаны 406 изолятов *K. pneumoniae*. Было показано, что *K. pneumoniae* являлась доминирующим патогеном в этиологической структуре госпитальных инфекций среди грамотрицательных бактерий нейрореанимации г. Москвы в 2013-2016 гг. Для госпитальных изолятов отмечено большое разнообразие генотипов – идентифицированы 44 RAPD-генотипа с четырьмя доминирующими в разные периоды времени генотипами и 14 сиквенс-типов, в том числе 11 ранее описанных (ST5, ST11, ST20, ST23, ST48, ST65, ST86, ST147, ST218, ST395, ST833) и три новых (ST1544, ST2280 и ST2174). Среди изучаемых *K. pneumoniae* идентифицированы штаммы, принадлежащие к эпидемическим клональным комплексам CC11, CC23 и CC65.

Большинство клинических штаммов *K. pneumoniae* (94 %) коллекции обладали МЛУ-фенотипом. Устойчивость к бета-лактамам была ассоциирована с наличием генов бета-лактамаз: *bla*_{SHV} были выявлены у 93 % штаммов, *bla*_{CTX-M} – у 77 %, *bla*_{TEM} – у 53 %, *bla*_{OXA-48-like} – у 41 % и *bla*_{NDM} – у 2 %. Устойчивость к другим функциональным классам АБП коррелировала с наличием интегронов 1 класса (35 % штаммов). Гены мажорного поринового белка клебсиелл *ompK36* были идентифицированы у 98 % изучаемых штаммов. На основании сочетаний генетических детерминант устойчивости к АБП в штаммах *K. pneumoniae* в коллекции определен 31 генотип резистентности (R-генотип), наиболее распространенными среди которых были генотипы с комбинациями трех и четырех генов бета-лактамаз.

В ходе исследования идентифицированы два варианта гена *bla*_{OXA-48-like}: широко распространенный в мире аллель *bla*_{OXA-48} и впервые описанный в России аллель *bla*_{OXA-244}, доказана их локализация на конъюгативных плазмидах группы несовместимости IncL/M. Показано, что *K. pneumoniae* являлись источником распространения генов карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like} среди изолятов энтеробактерий в нейрореанимации г. Москвы в 2013-2014 гг. В 2016 г. впервые в изучаемых лечебных учреждениях было зафиксировано появление NDM-1-позитивных госпитальных штаммов *K. pneumoniae*.

Впервые описаны генетические события интеграции *IS1R*- и *IS10R*-элементов в позициях 86 п.н. и 41 п.н. последовательностей гена мажорного поринового белка

клебсиелл *ompK36* в двух штаммах *K. pneumoniae*, которые привели к утрате продукции белка *OmpK36* и уменьшению чувствительности штаммов к имипенему. Восстановление продукции белка *OmpK36* приводило к увеличению чувствительности к имипенему. Полученные данные подтверждают роль *IS*-элементов как одного из механизмов, регулирующих формирование лекарственной устойчивости у клебсиелл.

Проведена оценка вирулентности для лабораторных животных клинических штаммов *K. pneumoniae*. Выделены три группы по степени вирулентности для белых аутбредных мышей: авирулентные с $LD_{50} > 1 \times 10^6$ КОЕ, средневирулентные с $LD_{50} = 1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$ КОЕ и высоковирулентные штаммы с $LD_{50} < 500$ КОЕ. Наиболее вирулентные для мышей штаммы *K. pneumoniae* характеризовались гипермукоидным фенотипом, принадлежностью к капсульным типам K1, K2, K20 и K57 и сиквенс-типам ST23, ST65, ST86, ST218, ST2174 и ST2280. На основании детекции 7 генов, ассоциированных с вирулентностью *K. pneumoniae* (*wabG* и *uge*, детерминирующих полисахаридную капсулу и ЛПС; *fimH*, кодирующего белок фимбрий I типа; *kfi* и *aer*, контролирующих утилизацию трехвалентного железа; *rmpA*, регулятора гипермукоидного фенотипа; *allR*, регулятора аллантаинового регулона). Идентифицированы 14 Vir-генотипов – сочетаний изучаемых генов вирулентности. Вирулентные для мышей штаммы характеризовались наличием у них 5-7 генов вирулентности, а авирулентные – 0-5 генов. Детектирована ранее неописанная точечная мутация в гене регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA* у авирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* КРВ584 с генотипом, характерным для вирулентных штаммов, что подтвердило важность гена *rmpA* для формирования гипермукоидного фенотипа и реализации вирулентных свойств *K. pneumoniae*. Отмечена корреляция вариантов гена *wabG* с сиквенс-типами и К-типами штаммов. Для гипермукоидных вирулентных штаммов *K. pneumoniae* клонального комплекса CC23^{K1} отмечена идентичность нуклеотидных последовательностей генов *wabG* и *uge* с аналогичными генами гипервирулентного штамма *K. pneumoniae* ED23, выделенного в Китае в 2006 г.

Отмечено формирование вирулентных МЛУ *K. pneumoniae* на основе штаммов ST23^{K1}, характеризующихся устойчивостью к АБП 5-7 функциональных классов (бета-лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, тетрациклинам, фениколам, сульфаниламидам, нитрофуранам) и вирулентностью для мышей с $LD_{50} < 500$ КОЕ. Впервые в мире описаны штаммы клонального комплекса CC23, несущие гены двух

эпидемических бета-лактамаз – цефалоспориказы СТХ-М-15 и карбапенмазы ОХА-48 одновременно. Штаммы *K. pneumoniae* этой группы были выделены от пациентов с тяжелыми формами клебсиеллезной инфекции: менингоэнцефалит со множественными абсцессами головного мозга, вентилятор-ассоциированная пневмония с абсцессами в легких и инфекция мочевыводящих путей с выраженной лейкоцитурией. Принципиальная возможность приобретения плазмид резистентности вирулентными штаммами клебсиелл продемонстрирована экспериментально на примере передачи плазмид, несущих гены бета-лактамаз $bla_{СТХ-М-15}$, bla_{TEM-1} , $bla_{ОХА-244}$ и bla_{NDM-1} в высоковирулентный для мышей штамм *K. pneumoniae* КРМ9. При этом вирулентность рекомбинантных штаммов существенно не снижалась.

Определено филогенетическое родство геномов трех изучаемых гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* генотипов ST23^{K1}, ST2280^{K2} и ST1544^{K20} с геномами штаммов, выделенных в Азиатско-Тихоокеанском регионе в 2002-2016 гг., представленными в международной базе данных GenBank. У всех трех высоковирулентных *K. pneumoniae* присутствовал гомолог высокомолекулярной плазмиды pLVPK, ассоциированной с вирулентностью клебсиелл. Показано филогенетическое родство двух NDM-1-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* генотипа ST147^{K64} с КРС-2-продуцирующим штаммом клонального комплекса CC147, выделенным в США в 2013 г. Эти штаммы содержали большее количество репликонов плазмид по сравнению с высоковирулентными штаммами: 4-5 против 1-2. Резистомы этих штаммов содержали большее количество генов антибиотикорезистентности по сравнению с высоковирулентными для мышей штаммами. Различие геномов двух NDM-1-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, принадлежащих к одному сиквенс-типу ST147, состоит в наличии в хромосоме одного из них нового профага, а у другого – дополнительной плазмиды группы несовместимости IncL/M.

В ходе исследования разработаны методические рекомендации для детекции генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности у *K. pneumoniae* методом ПЦР. Они предназначены для молекулярно-генетического анализа штаммов *K. pneumoniae*, внутривидового типирования изолятов *K. pneumoniae*, проведения эпидемиологического анализа, в том числе ретроспективного, оценки эпидемиологической ситуации по клебсиеллезным инфекциям в разных географических регионах и в разные периоды времени.

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 бета-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 ST147, 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* KPB367K/15, и IS10R-элемента в позиции 41 п.н. в штамме *K. pneumoniae* KPB2304K/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 $LD_{50} < 500$ КОЕ, средневирулентные с $LD_{50} = 10^3 - 10^4$ КОЕ и авирулентные с $LD_{50} > 10^6$ КОЕ. С проявлением вирулентности для мышей ассоциированы генотипы ST23^{K1}, ST65^{K2}, ST86^{K2}, ST218⁵⁷, ST2280^{K2}.

6. Молекулярным механизмом «дефектного» негипермукоидного фенотипа у *rmpA*-позитивного авирулентного для мышей штамма *K. pneumoniae* KPB584 является наличие неописанной ранее точечной делеции G в положении 286 в гене регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA*.

7. Впервые в высоковирулентных штаммах *K. pneumoniae* сиквенс-типа ST23 с капсульным типом K1 детектированы одновременно два гена эпидемических бета-лактамаз *bla*_{СТХ-М-15} и *bla*_{ОХА-48}.

8. Полные геномы трех гипермукоидных высоковирулентных для мышей штаммов *K. pneumoniae* КР1261, КРВ4010 и КРМ9 генотипов ST23^{К1}, ST2280^{К2} и ST1544^{К20}, 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*_{ОХА-48}, в штамме КРВ417/16 и присутствием неидентифицированного профага в хромосоме штамма КРВ1470/16.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ
И ТЕРМИНОВ

| | |
|-------------|--|
| АБП | - антибактериальные препараты |
| БЛРС | - бета-лактамаза расширенного спектра |
| ГКПМ | - Государственная коллекция патогенных микроорганизмов |
| ГПВ | - гипервирулентность |
| ДНК | - дезоксирибонуклеиновая кислота |
| ИВЛ | - искусственная вентиляция легких |
| кДа | - килодальтон |
| КОЕ | - колониеобразующая единица |
| МАКМАХ | - Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии |
| МБЛ | - металло-бета-лактамаза |
| МЛУ | - множественная лекарственная устойчивость |
| МПК | - минимальная подавляющая концентрация |
| НИИАХ | - Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии |
| ОТ | - обратная транскрипция |
| ОТ-ПЦР | - полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией |
| п.н. | - пара нуклеотидов |
| ПААГ | - полиакриламидный гель |
| ПЦР | - полимеразная цепная реакция |
| РНК | - рибонуклеиновая кислота |
| т.п.н. | - тысяча пар нуклеотидов |
| ЭДТА | - этилендиаминтетраацетат |
| <i>aer</i> | - ген аэробактина |
| <i>allR</i> | - регулятор аллантаинового регулона |
| <i>bla</i> | - ген бета-лактамазы |
| СС | - клональный комплекс |
| <i>fimH</i> | - ген белка фимбрий 1 типа |
| <i>insI</i> | - генетические кассеты интегрона класса 1 |

| | |
|------------------|---|
| <i>ins2</i> | - генетические кассеты интегрона класса 2 |
| <i>int1</i> | - ген интегразы 1 класса |
| <i>int2</i> | - ген интегразы 2 класса |
| IS | - инсерционная последовательность |
| <i>kfu</i> | - ген ABC-системы утилизации трехвалентного железа |
| LD ₅₀ | - полумлетальная доза |
| <i>ompK36</i> | - ген поринового белка клебсиелл OmpK36 |
| RAPD | - <u>R</u> andom <u>A</u> mplified <u>P</u> olymorphic <u>D</u> NA, метод случайно амплифицируемых полиморфных фрагментов ДНК |
| <i>rmpA</i> | - ген регулятора гипермукоидного фенотипа |
| R-генотип | - генотип антибиотикорезистентности |
| SAP | - креветочная щелочная фосфатаза |
| SDS | - додецилсульфат натрия |
| ST | - сиквенс-тип |
| <i>uge</i> | - ген уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпиразы |
| Vir- генотип | - генотип вирулентности |
| <i>wabG</i> | - ген глюкозилтрансферазы |

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ашмарин, И.П., Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. Л.: Наука, 1962. - 180 с
2. Григоренко, Е.В. Клонирование, экспрессия гена металло- β -лактамазы NDM-1 и изучение каталитических свойств рекомбинантного фермента / В.Г. Григоренко, М.Ю. Рубцова, Е.В. Филатова и др. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. — 2016. — Т. 57, № 2. — С. 9–15.
3. Дубоделов, Д.В. Генетические детерминанты резистентности к β -лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных / Генетика. – 2016. – Т. 52. - № 9. – С. 1097-1102.
4. Егорова, С.А. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло- β -лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона / С.А. Егорова, Л.А. Кафтырева, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко, М.Ф. Пясетская, Т.С. Курчикова, Н.Б. Ведерникова, О.Т. Морозова, М.В. Смирнова, Л.Н. Попенко, М.И. Любушкина, Ю.А. Савочкина, М.А. Макарова, Л.В. Сужаева, Ю.В. Останкова, М.Н. Иванова, А.М. Павелкович, П. Наабер, Э. Сепп, С. Кыльялг, И. Мицюлявичене, А. Балоде // Инфекция и иммунитет. – 2013. – №1. – С. 29-36.
5. Егорова, С.А. Карбапенемазы, продуцируемые штаммами *K. pneumoniae* - возбудителями ИСМП в стационарах Санкт-Петербурга / С.А. Егорова, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко, Е.В. Оксема, М.В. Смирнова, Н.Б. Ведерникова, М.Ф. Пясецкая, О.Т. Морозова, О.В. Полухина, Л.А. Кафтырева // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 22.
6. Ильина, В.Н. К вопросу резистентности *Klebsiella pneumoniae* у детей раннего возраста с врожденными пороками сердца / В.Н. Ильина, О.В. Струнин, О.Н. Соловьев, Л.М. Самойлова, Ю.Н. Горбатов // ПКК. – 2012. - №1. - С. 57-60.
7. Книрель Ю.А. и Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грамтрицательных бактерий. I. Общая характеристика липополисахаридов и структура липида А. // Биохимия. – 1993. – Т. 58. - № 2. – С. 166-168.
8. Книрель Ю.А. и Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов

грамотрицательных бактерий. II. Структура кора // Биохимия. – 1993. – Т. 58. - № 2. – С. 182-201.

9. Коган, Г.Ю. Летальная госпитальная инфекция, ассоциированная с полирезистентной к антибактериальным препаратам *Klebsiella pneumoniae* / Г.Ю. Коган, И.С. Гымнинова, О.Г. Карноухова, А.Д. Ботвинкин, Ю.В. Решетникова, В.В. Свистунов, А.Ю. Фалиева // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2010. - №8. - С. 156-158.

10. Крыжановская О.А. Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Москва., 2016 – 25с.

11. Остерман Л. А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). М.: Наука, 1981. - 288 с.

12. Панин, А.Л. Цианобактериальные маты как объекты мониторинга антарктических экосистем / А.Л. Панин, Е.А. Богумильчик, А.Н. Шаров, Д.Ю. Власов, М.С. Зеленская, А.В. Толстикова, Ш.Б. Тешебаев, Г.Я. Ценева, Л.А. Краева, В.Б. Сбойчаков, В.Н. Болехан Вестник СПбГУ. Серия 3. Биология. – 2013. – №2. – С. 3-11.

13. Поздеев, О.К., Федоров Р.В. Энтеробактерии: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007 – 720 с.

14. Поздеев, О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий / О.К. Поздеев / ПМ. - 2010. - №41. – С. 84-88.

15. Покудина, И.О., Коваленко, К.А. Распространенность и вклад в антибиотикоустойчивость β -лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae* / И.О. Пакудина, К.А. Коваленко // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 12-2. – С. 295-298

16. Прямчук, С.Д. Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам в нозокомиальных штаммах *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp., выделенных в России в 2003-2007 гг. / С.Д. Прямчук, Н.К. Фурсова, И.В. Абаев, Ю.Н. Ковалев, Н.А. Шишкова, Э.И. Печерских, О.В. Коробова, Е.И. Асташкин, Д.М. Пачкунов, А.Н. Круглов, Д.В. Иванов, С.В. Сидоренко, Э.А. Светоч, И.А. Дятлов // Антибиот. Химиотер. – 2010. – Т. 55, № 9-10. – С. 3-10.

17. Решедько Г.К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России / Г.К. Решедько, Е.Л. Рябкова, О.И. Кречикова, М.В. Сухорукова, О.В. Шевченко, М.В. Эйдельштейн, Р.С. Козлов, исследовательская группа РОСНЕТ // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2008. – т. 10. - № 2. – С. 96 – 112.

18. Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение Редакция 1.0 [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/eucast-guideline-on-detection-of-resistance-mechanisms-1.0-rus.pdf>

19. Рябкова, Е.Л. Оптимизация антибиотикотерапии нозокомиальных инфекций, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, в стационарах России: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Смоленск., 2006. – 23с.

20. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). – Введ. 29.08.2014

21. Сидоренко, С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2004. – т. 44. – С. 263-306.

22. Сидоренко, С.В. Этиология тяжёлых госпитальных инфекций в отделениях реанимации и антибиотикорезистентность среди их возбудителей / С.В. Сидоренко, С.П. Резван, Л.В. Еремина, С.В. Поликарпова, В.И. Карабак, Е.Д. Меньшикова, В.И. Тишков, Е.А. Черкашин, В.Б. Белобородов // Антибиотики и химиотерапия. – 2005. т. 50. – № 2-3. - С. 33-41.

23. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2011-2012 гг. / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов, Д.А. Попов, М.А. Астанина, О.А. Жданова, Г.С. Большева, Р.И. Новикова, И.Р. Валиуллина, Т.С. Кокарева, А.Н. Частоедова, А.А. Рог, С.В. Поликарпова, Н.А. Гординская, Е.С. Некаева, Н.В. Абрамова, О.В. Доманская, О.А. Землянская, Л.А. Горюнова, С.В. С Кальский, Е.В. Елохина, Л.Д. Попова, С.А. Божкова, Ю.М. Гомон, О.И. Кречикова, В.М. Мищенко, С.А. Рачина, Ю.А. Стреж, Л.В. Гудкова, И.П.

Колосова, Т.М. Вунукайнен, Э.А. Ортенберг, Р.М. Хохлявина, У.С. Портнягина, С.Х. Шамаева, А.С. Матвеев, Ш.Х. Палютин, А.В. Власова, М.Г. Ершова, М.С. Лебедева, Л.В. Феоктистова, С.А. Гордеева, В.В. Долинина, Ю.Л. Чернявская, В.А. Багин, С.М. Розанова, Е.Ю. Перевалова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017.-№ 1. - С. 57-62.

24. Фурсова, Н.К. Генетическое окружение генов *bla*_{CTX-M}, локализованных на конъюгативных плаزمидях нозокомиальных изолятов *Enterobacteriaceae*, выделенных в России в 2003-2007 гг. / Н.К. Фурсова, С.Д. Прячук, И.В. Абаев, Ю.Н. Ковалев, Н.А. Шишкова, Э.И. Печерских, О.В. Коробова, Е.И. Асташкин, Д.М. Пачкунов, Э.А. Светоч, С.В. Сидоренко // Антибиот. химиотер. – 2010. – Т. 55, № 11-12. – С. 3-10.

25. Фурсова, Н.К. Лекарственная устойчивость микроорганизмов. Учебное пособие / Н.К. Фурсова. – МО, Щелково : Издатель Мархотин П.Ю., 2012. – 248 с.

26. Шабанова, В.В. Первый случай выявления в России *Klebsiella pneumoniae* ST147, продуцирующей NDM-1 карбапенемазу, в травматолого-ортопедическом стационаре / В.В. Шабанова, М.В. Краснова, С.А. Божкова, В.А. Агеевец, И.В. Лазарева, А.Н. Рукина, С.В. Сидоренко //Травматология и ортопедия России. – 2015. – №2. – С. 90-98.

27. Эйдельштейн, М.В. β-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования / М.В. Эйдельштейн // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2001. - №3. – С. 223-242.

28. Abd, H. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii* / H. Abd, T. Johansson, I. Golovliov, G. Sandström, M. Forsman // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – No. 1. – P. 600-606.

29. Adams, M.D. Quantitative assessment of insertion sequence impact on bacterial genome architecture / M.D. Adams, B. Bishop, M.S. Wright // Microb. Genom. – 2016. – Vol. 2. – No. 7. – P. e000062.

30. Ageevets, V. Genetic Environment of the *bla*_{KPC-2} Gene in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate That May Have Been Imported to Russia from Southeast Asia / V. Ageevets, J. Sopova, I. Lazareva, M. Malakhova, E. Ilina, E. Kostyukova, V. Babenko, A. Carattoli, Y. Lobzin, A. Uskov, S. Sidorenko // Antimicrob. Agents and Chemother. –

2017. – Vol. 61. No. 2. – P. e01856–16.

31. Ageevets, V.A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V.A. Ageevets, I.V. Partina, E.S. Lisitsyna, E.N. Ilina, Y.V. Lobzin, S.A. Shlyapnikov, S.V. Sidorenko // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2014. – Vol. 44. – No. 2. – P. 152-155.

32. Ah, Y.M. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* / Y.M. Ah, A.J. Kim, J.Y. Lee // *Int. J. Antimicrob. Agents.* – 2014. – Vol. 44. – No. 1. – P. 8-15.

33. Al-Marzooq, F. Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Determinants and Plasmids in Malaysian Isolates of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* / F. Al-Marzooq, M.Y. Mohd Yusof, S.T. Tay // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10. – No. 7. – P. e0133654.

34. Anandan, S. / S. Anandan, S. Damodaran, R. Gopi, Y.D. Bakthavatchalam, B. Veeraraghavan // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2015. – Vol. 9. – No. 9. – P. DM01-3.

35. Angiuoli, S.V. Toward an online repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (meta)genomic annotation / S.V. Angiuoli, A. Gussman, W. Klimke, G. Cochrane, D. Field, G. Garrity, C.D. Kodira, N. Kyrpides, R. Madupu, V. Markowitz, T. Tatusova, N. Thomson, O. White // *OMICS.* – 2008. – Vol. 12. – No. 2. – P. 137-141.

36. Arhoune, B. Rectal carriage of extended-spectrum β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among hospitalised neonates in a neonatal intensive care unit in Fez, Morocco / B. Arhoune, B. Oumokhtar, F. Hmami, A. Barguigua, M. Timinouni, S. El Fakir, F. Chami, A. Bouharrou // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* – 2017. – Vol. 8. – P. 90-96.

37. Aziz, R.K. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology / R.K. Aziz, D. Bartels, A.A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R.A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E.M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G.J. Olsen, R. Olson, A.L. Osterman, R.A. Overbeek, L.K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G.D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, O. Zagnitko // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 75.

38. Bach, S. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae* / S. Bach, A. de Almeida, E. Carniel // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2000. – Vol. 183. – No. 2. – P. 289-294.

39. Bachman, M.A. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract

infection through evasion of lipocalin 2 / M.A. Bachman, J.E. Oyler, S.H. Burns, M. Caza, F. Lépine, C.M. Dozois, J.N. Weiser // *Infect. Immun.* – 2011. – Vol. 79. – No. 8. – P. 3309-3316.

40. Bachman, M.A. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin / M.A. Bachman, V.L. Miller, J.N. Weiser // *PLoS Pathog.* – 2009. – Vol. 5. – No. 10. P. 1000622.

41. Bado, I. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay / I. Bado, C. Gutiérrez, V. García-Fulgueiras, N.F. Cordeiro, L. Araújo Pirez, V. Seija, C. Bazet, G. Rieppi, R. Vignoli // *J. Glob. Antimicrob. Resist.* – 2016. – Vol.6. P. – 5-9.

42. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyskin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA // *J. Comput. Biol.* – 2012. – Vol. 19. – No. 5. – P. 455-477.

43. Barantsevich, E.P. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia // E.P. Barantsevich, I.V. Churkina, N.E. Barantsevich, J. Pelkonen, E.V. Schlyakhto, N. Woodford / *J. Antimicrob. Chemother.* – 2013. – Vol. 68. – No. 5. – P. 1204-1206.

44. Bialek-Davenet, S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups / S. Bialek-Davenet, A. Criscuolo, F. Ailloud, V. Passet, L. Jones, A.S. Delannoy-Vieillard, B. Garin, S. Le Hello, G. Arlet, M.H. Nicolas-Chanoine, D. Decré, S. Brisse // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20. – No. 11. – P. 1812-1820.

45. Bonnedahl, J. Extended-spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Gulls, Alaska, USA / J. Bonnedahl, J. Hernandez, J. Stedt, J. Waldenström, B. Olsen, M. Drobni // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20. – No. 5. – P. 897-899.

46. Branger, J. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice / J. Branger, S. Knapp, S. Weijer, J.C. Leemans, J.M. Pater, P. Speelman, S. Florquin, T. van der Poll // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – No. 2. – P.

788-794.

47. Bratu, S. Correlation of antimicrobial resistance with beta-lactamases, the OmpA-like porin, and efflux pumps in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* endemic to New York City / S. Bratu, D. Landman, D.A. Martin, C. Georgescu, J. Quale // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – No. 9. – P. 2999-3005.

48. Brisse, S. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization / S. Brisse, C. Fevre, V. Passet, S. Issenhuth-Jeanjean, R. Tournebize, L. Diancourt, P. Grimont // *PLoS One.* – 2009. – Vol. 4. – No. 3. – P. e4982.

49. Brisse, S. *wzi* Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella strains* / S. Brisse, V. Passet, A.B. Haugaard, A. Babosan, N. Kassis-Chikhani, C. Struve, D. Decré // *J. Clin. Microbiol.* – 2013. – Vol. 51. – No. 12. – P. 4073-4078.

50. Bush, K. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure / K. Bush, G.A. Jacoby, A.A. Medeiros // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1995. – Vol. 39. – No. 6. – P. 1211-33.

51. Bushell, S.R. Wzi is an outer membrane lectin that underpins group 1 capsule assembly in *Escherichia coli* / S.R. Bushell, I.L. Mainprize, M.A. Wear, H. Lou, C. Whitfield, J.H. Naismith // *Structure.* – 2013. – Vol. 21. – No. 5. – P. 844-853.

52. Cao, V. ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-17 / V. Cao, T. Lambert, P. Courvalin // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2002. – Vol. 46. – No. 5. – P. 1212-1217.

53. Carattoli, A. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing / A. Carattoli, A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K.L. Hopkins, E.J. Threlfall // *J. Microbiol. Methods.* – 2005. – Vol. 63. – No.3. – P. 219-228.

54. Carattoli, A. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing / A. Carattoli, E. Zankari, A. García-Fernández, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L1, Møller Aarestrup F, Hasman H // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2014 – Vol. 58. – No. 7. – P. 3895-3903.

55. Carlone, G.M. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species / G.M. Carlone, M.L. Thomas, H.S. Rumschlag, F.O. Sottnek // *J. Clin. Microbiol.* – 1986. – Vol. 24. – No. 3. – P. – 330-332.

56. Catalán-Nájera, J.C. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? / J.C. Catalán-Nájera, U. Garza-Ramos, H. Barrios-Camacho // *Virulence*. – 2017. – Vol. 12. – P. 1-13.
57. CDC Report Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013 – [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/index.html>
58. Cejas, D. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas / D. Cejas, L.F. Canigia, G.R. A.C. Elena, I.X. Maldonado, G.O. Gutkind, M.A. Radice // *J. Clin. Microbiol.* – 2014. – Vol. 52. – No. 9. – P. 3483-3485.
59. Cerqueira, G.C. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks / G.C. G.C. Cerqueira, A.M. Earl, C.M. Ernst, Y.H. Grad, J.P. Dekker, M. Feldgarden, S.B. Chapman, J.L. Reis-Cunha, T.P. Shea, S. Young, Q. Zeng, M.L. Delaney, D. Kim, E.M. Peterson, T. O'Brien, M. Ferraro, D.C. Hooper, S.S. Huang, J.E. Kirby, A.B. Onderdonk, B.W. Birren, D.T. Hung, L.A. Cosimi, J.R. Wortman, C.I. Murphy, W.P. Hanage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2017. – Vol. 114. – No. 5. – P. 1135-1140.
60. Chatoui, S. Endogenous endophthalmitis complicating *Klebsiella pneumoniae* liver abscess / S. Chatoui, El Asri F., A. Elkhoyaali, T. Bergach, R. Zerrouk, K. Reda, A. Oubaaz // *J. Fr. Ophthalmol.* – 2016. – Vol. 39. – No. 6. – P. e161- e162.
61. Chaudhary, P. Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Urinary Tract Infected Patients. / P. Chaudhary, D. Bhandari, K. Thapa, P. Thapa, D. Shrestha, H.K. Chaudhary, A. Shrestha, H. Parajuli, B.P. Gupta // *J. Nepal Health Res. Counc.* – 2016. – Vol. 14. – No. 33. – P. 111-115.
62. Chen, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding / L. Chen, B. Mathema, K.D. Chavda, F.R. DeLeo, R.A. Bonomo, B.N. Kreiswirth // *Trends Microbiol.* – 2014. – Vol. 22. – No. 12. – P. 686–696.
63. Chen, Y.T. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43 / Y.T. Chen, H.Y. Chang, Y.C. Lai, C.C. Pan, S.F. Tsai, H.L. Peng // *Gene*. – 2004. – Vol. 337. – P. 189-198.
64. Cheng, N.C. Recent trend of necrotizing fasciitis in Taiwan: focus on monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis / N.C. Cheng, Y.C. Yu, H.C. Tai, P.R. Hsueh, S.C. Chang, S.Y. Lai, W.C. Yi, C.T. Fang // *Clin. Infect. Dis.* – 2012. –

Vol. 55. – No. 7. – P. 930-939.

65. Cheong, H.S. Emergence of an extended-spectrum β -lactamase-producing serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strain from Asian countries / H.S. Cheong, D.R. Chung, M. Park, S.H. Kim, K.S. Ko, Y.E. Ha, C.I. Kang, K.R. Peck, J.H. Song // *Epidemiol. Infect.* – 2017. – Vol. 145. – No. 5. – P. 990-994.

66. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Anal. Biochem.* – 1987 – Vol. 162. – No. 1. – P. 156–159.

67. Chou, H.C. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection / H.C. Chou, C.Z. Lee, L.C. Ma, C.T. Fang, S.C. Chang, J.T. Wang // *Infect. Immun.* – 2004. – No 72. – P. 3783-3792.

68. Chung, P.Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation / P.Y.Chung // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – Vol. 363. – No. 20. – P. fnw219.

69. Cizmeci, Z. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48- endemic area / Z. Cizmeci, E. Aktas, B. Otlu, O. Acikgoz, S. Ordekci // *J Chemother.* – 2017. – Vol. 29. – No. 6. – P. 344-350.

70. Cortés, G. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia / G. Cortés, N. Borrell, B. de Astorza, C. Gómez, J. Sauleda, S. Albertí // *Infect. Immun.* – 2002. – Vol. 70. – No. 5. – P. 2583-2590.

71. Darling, A.E. progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement / A.E. Darling, B. Mau, N.T. Perna // *PLoS One.* – 2010. – Vol. 5. No. 6. P. e11147.

72. Davies, Y.M. Virulence and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from passerine and psittacine birds / Y.M. Davies, M.P. Cunha, M.G. Oliveira, M.C. Oliveira, N. Philadelpho, D.C. Romero, L. Milanelo, M.B. Guimarães, A.J. Ferreira, A.M. Moreno, L.R. Sá, T. Knöbl // *Avian. Pathol.* – 2016. – Vol. 45. – No. 2. – P. 194-201.

73. Decré, D. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France / D. Decré, C. Verdet, A. Emirian, T. Le Gourrierec, J.C. Petit, G. Offenstadt, E. Maury, S. Brisse, G. Arlet // *J. Clin. Microbiol.* – 2011. – Vol. 49. –

No. 8. – P. 3012-3024.

74. Delgado-Gardea, M.C. Multidrug-Resistant Bacteria Isolated from Surface Water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico / M.C. Delgado-Gardea, P. Tamez-Guerra, R. Gomez-Flores, F.J. Zavala-Díaz de la Serna, G. Eroza-de la Vega, G.V. Nevárez-Moorillón, M.C. Pérez-Recoder, B. Sánchez-Ramírez, C. González-Horta Mdel, R. Infante-Ramírez // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2016. – Vol. 13. – No. 6. – P. pii: E597.

75. Dharmapalan, D. High Reported Rates of Antimicrobial Resistance in Indian Neonatal and Pediatric Blood Stream Infections // D. Dharmapalan, A. Shet, V. Yewale, M. Sharland // *J. Pediatric Infect. Dis. Soc.* – 2017. – Vol. 6. – No. 3. – P. e62-e68.

76. Diancourt, L. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates / L. Diancourt, V. Passet, J. Verhoef, P.A. Grimont, S. Brisse / *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – No. 8. – P. 4178-4182.

77. Doud, M.S. A K2A-positive *Klebsiella pneumoniae* causes liver and brain abscess in a Saint Kitt's man / M.S. Doud, R. Grimes-Zeppego, E. Molina, N. Miller, D. Balachandar, L. Schneper, R. Poppiti, K. Mathee // *Int. J. Med. Sci.* – 2009. – Vol. 6. No. 6. – P. 301-304.

78. Edelstein, M. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals / M. Edelstein, M. Pimkin, I. Palagin, I. Edelstein, L. Stratchounski // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – No. 12. – P. 3724–3732.

79. Elisha, I.L. Potency and selectivity indices of acetone leaf extracts of nine selected South African trees against six opportunistic *Enterobacteriaceae* isolates from commercial chicken eggs // I.L. Elisha, A.R. Jambalang, F.S. Botha, E.M. Buys, L.J. McGaw, J.N. Eloff // *BMC Complement. Altern. Med.* – 2017. – Vol. 17. – No. 1. – P. 90.

80. Enani, M.A. Community acquired *Klebsiella pneumoniae*, K1 serotype. Invasive liver abscess with bacteremia and endophthalmitis / M.A. Enani, N.A. El-Khizzi // *Saudi. Med. J.* – 2012. – Vol. 33. – No. 7. – P. 782-786.

81. Estabraghi, E. Molecular Identification of Extended-Spectrum β -lactamase and Integron Genes in *Klebsiella pneumoniae* / E. Estabraghi, T.Z. Salehi, K. Amini, M. Jamshidian // *JNMA J. Nepal Med. Assoc.* – 2016. – Vol. 54. – No. 202. – P. 72-78.

82. Evagelopoulou, P. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* mediastinitis safely and effectively treated with prolonged administration of tigecycline / P.

Evagelopoulou, P. Myrianthefs, A. Markogiannakis, G. Baltopoulos, A. Tsakris // Clin. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 46. – No. 12. – P. 1932-1933.

83. Evrard, B. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae* / B. Evrard, D. Balestrino, A. Dosgilbert, J.L. Bouya-Gachancard, N. Charbonnel, C. Forestier, A. Tridon // Infect. Immun. – 2010. – Vol. 78. – No. 1. – P. 210-219.

84. Ewers, C. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses / C. Ewers, I. Stamm, Y. Pfeifer, L.H. Wieler, P.A. Kopp, K. Schønning, E. Prenger-Berninghoff, S. Scheufen, I. Stolle, S. Günther, A. Bethe // J. Antimicrob. Chemother. – 2014 – Vol. 69. – No. 10. – P. 2676-2680.

85. Fang, C.T. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess / C.T. Fang, S.Y. Lai, W.C. Yi, P.R. Hsueh, K.L. Liu, S.C. Chang // Clin. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 45. – P. 284-293.

86. Fazili, T. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess: An Emerging Disease / T. Fazili, C. Sharngoe, T. Endy, D. Kiska, W. Javaid, M. Polhemus // Am. J. Med. Sci. – 2016. – Vol. 351. – No. 3. – P. 297-304.

87. Feil, E.J. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data / E.J. Feil, B.C. Li, D.M. Aanensen, W.P. Hanage, B.G. Spratt // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – No. 5. – P. 1518–1530.

88. Fierer, J., Walls L, Chu P. Recurring *Klebsiella pneumoniae* pyogenic liver abscesses in a resident of San Diego, California, due to a K1 strain carrying the virulence plasmid / J. Fierer, L. Walls, P. Chu // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 4371-4373.

89. Follador, R. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides / R. Follador, E. Heinz, K.L. Wyres, M.J. Ellington, M. Kowarik, K.E. Holt, N.R. Thomson // Microb. Genom. – 2016. – Vol. – 2. – No. 8. – P. e000073.

90. Friedlander, C. Uber die scizomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie / C. Friedlander, // Arch Pathol Anat Physiol Klin Med – 1882. – Vol. 87. – P. 319–324.

91. Gu, D. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella*

pneumoniae in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study / D. Gu, N. Dong, Z. Zheng, D. Lin, M. Huang, L. Wang, E.W. Chan, L. Shu, J. Yu, R. Zhang, S. Chen // Lancet. Infect. Dis. – 2017. – P. S1473-3099(17)30489-9.

92. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. ISBN-13: 978-0-309-15400-0 ISBN-10: 0-309-15400-6.

93. Hadjadj, L. Study of *mcr-1* Gene-Mediated Colistin Resistance in *Enterobacteriaceae* Isolated from Humans and Animals in Different Countries / L. Hadjadj, T. Riziki, Y. Zhu, J. Li, S.M. Diene, J.M. Rolain // Genes (Basel). – 2017. – Vol. 8. – No. 12. – P. pii: E394.

94. Hennequin, C. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* / C. Hennequin, F. Robin // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 35. – No. 3. – P. 333-341.

95. Hernández-Allés, S. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes // S. Hernández-Allés, V.J. Benedí, L. Martínez-Martínez, A. Pascual, A. Aguilar, J.M. Tomás, S. Albertí // Antimicrob Agents Chemother. – 1999. – Vol. 43. – No. 4. – P. 937-939.

96. Hitchcock, P.J. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels / P.J. Hitchcock, T.M. Brown // J. Bacteriol. – 1983. – Vol. 154. – No. 1. – P. 269-277.

97. Hsu, C.R. The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited / CR Hsu, TL Lin, YC Chen, HC Chou, JT Wang // Microbiology. – 2011. – Vol. 157. – No. 12. – P. 3446-3457.

98. Hui, D.S. A multicentre surveillance study on the characteristics, bacterial aetiologies and *in vitro* antibiotic susceptibilities in patients with acute exacerbations of chronic bronchitis / DS Hui, M Ip, T Ling, SC Chang, CH Liao, CG Yoo, DK Kim, HI Yoon, V Udompanich, S Mogmeud, R Muttalif, AM Salleh, C Roa, M Mendoza, C Fajardo-Ang, P Soepandi, F Isbaniah, E Burhan, P Sudarmono, H Mangunegoro, HH Liu // Respiriology. – 2011. – Vol. 16. – No. 3. – P. 532-539.

99. Hujer, K.M. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed

Army Medical Center / K.M. Hujer, A.M. Hujer, E.A. Hulten, S. Bajaksouzian, J.M. Adams, C.J. Donskey, D.J. Ecker, C. Massire, M.W. Eshoo, R. Sampath, J.M. Thomson, P.N. Rather, D.W. Craft, J.T. Fishbain, A.J. Ewell, M.R. Jacobs, D.L. Paterson, R.A. Bonomo // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – Vol. 50. – No. 12. – P. 4114-4123.

100. Huson, D.H. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies / Huson, D. Bryant // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 23. – No. 2. – P. 254-267.

101. Izquierdo, L. The *Klebsiella pneumoniae wabG* Gene: Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence / L. Izquierdo, N. Coderch, N. Piqué, E. Bedini, M.M. Corsaro, S. Merino, S. Fresno, J.M. Tomás, M. Regué // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 7213-7221.

102. Jacoby, G.A. The new beta-lactamases / Jacoby GA, Munoz-Price LS // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352. – No. 4. – P. 380-391.

103. Jayol, A. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014 / A. Jayol, L. Poirel, L. Dortet, P. Nordmann // *Euro Surveill.* – 2016. – Vol. 21. – No. 37. – P. pii=30339.

104. Kashani, A. H. The emergence of *Klebsiella pneumoniae* endogenous endophthalmitis in the USA: basic and clinical advances / A.H. Kashani, D. Elliott // *J. Ophthalmic Inflamm. Infect.* – 2013 – Vol. 3. – P. 28.

105. Keynan, Y. Pyogenic liver abscess caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* / Y. Keynan, J.A. Karlowsky, T. Walus, E. Rubinstein // *Scand. J. Infect. Dis.* – 2007. – Vol. 39. – No. 9. – P. 828-830.

106. Khaertynov, K.S. Case of Meningitis in a Neonate Caused by an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / K.S. Khaertynov, V.A. Anokhin, Y.N. Davidyuk, I.V. Nicolaeva, S.V. Khalioullina, D.R. Semyanova, E.Y. Alatyrev, N.N. Skvortsova, L.G. Abrahamyan // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1576.

107. Khan, A.U. Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health / A.U. Khan, L. Maryam, R. Zarrilli // *BMC Microbiol.* – 2017. – Vol. 17. – P. 101.

108. Kim, S.J. Metastatic endophthalmitis and thyroid abscess complicating *Klebsiella pneumoniae* liver abscess / S.J. Kim, S.T. Chu, K.S. Lee, S.W. Nam, J.K. Choi, J.W.

Chung, H.C. Kwon // Clin. Mol. Hepatol. – 2017. Epub ahead of print Jun 28.

109. Kong, H. Clinical and microbiological characteristics of pyogenic liver abscess in a tertiary hospital in East China / H. Kong, F. Yu, W. Zhang, X. Li // Medicine (Baltimore). – 2017. – Vol. 96. – No. 37. – P. e8050.

110. Ku, Y.H. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance / Y.H. Ku, Y.C. Chuang, C.C. Chen, M.F. Lee, Y.C. Yang, H.J. Tang, W.L. Yu // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – No. 1. – P. 6634.

111. Kumabe, A. String test of hypervirulent *Klebsiella pneumonia* / A. Kumabe, T. Kenzaka // Int. J. Med. – 2014. – Vol. 107. – No 12. – P. 1053.

112. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. – 227. P. 680-685.

113. Le, T.M. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in commensal members of the *Enterobacteriaceae* in Ho Chi Minh City, Vietnam / T.M. Le, S. Baker, T.P. Le, T.P. Le, T.T. Cao, T.T. Tran, V.M. Nguyen, J.I. Campbell, M.Y. Lam, T.H. Nguyen, V.V. Nguyen, J. Farrar, C. Schultsz // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – No. 12. – P. 1585-1592.

114. Legese, M.H. Weldearegay GM, Asrat D. Extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among Ethiopian children / M.H. Legese, G.M. Weldearegay, D. Asrat // Infect. Drug. Resist. – 2017. – Vol. 10. – P. 27-34.

115. Li, B. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* / B. Li, Y. Zhao, C. Liu, Z. Chen, D. Zhou // Future Microbiol. – 2014. - №9. – P. 1071-1081.

116. Lin, H.H. Two Genome Sequences of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Sequence Type 23 and Capsular Serotype K1 / H.H. Lin, Y.S. Chen, H.W. Hsiao, P.T. Hsueh, W.F. Ni, Y.L. Chen // Genome Announc. – 2016. – Vol. 4. – No. 5. – P. e01097-e01216.

117. Lin, Y.-T. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: Clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008 / Y.-T. Lin, Y.-Y. Jeng, T.-L. Chen, C.-P. Fung // BMC Inf. Dis. – 2010. – No 10. – P. 307.

118. Liu, P. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum / P. Liu, P. Li, X. Jiang, D. Bi, Y. Xie, C. Tai, Z. Deng, K. Rajakumar, H.Y. Ou // J. Bacteriol. – 2012. – Vol. 194. – No. 7. – P. 1841-1842.

119. Liu, Y.Y. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study / Y.Y. Liu, Y. Wang, T.R. Walsh, L.X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.H. Liu, J. Shen / *Lancet. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 16. – No. 2. – P. 161-168.
120. Lob, S.H. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam against Gram-Negative ESKAPE Pathogens Isolated by Clinical Laboratories in the United States in 2015 (Results from the SMART Global Surveillance Program) / SH Lob, MA Hackel, KM Kazmierczak, K Young, MR Motyl, JA Karlowsky, DF Sahn // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2017. – Vol. 61. – No. 6. P. e02209-16.
121. Ma, L.C. , Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection / L.C. Ma, C.T. Fang, C.Z. Lee, C.T. Shun, J.T. Wang // *J. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 192. – P. 117-128.
122. Malik, A. Necrotizing fasciitis in patients with head and neck cancer / A. Malik, S. Chakrabarty, S. Nair, D. Nair, P. Chaturvedi // *Am. J. Infect. Control.* – 2015. – Vol. 43. –No. 4. – P. 404-405.
123. Markovska, R. Dissemination of successful international clone ST15 and clonal complex 17 among Bulgarian CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates / R. Markovska, T. Stoeva, L. Boyanova, P. Stankova, D. Pencheva, E. Keuleyan, M. Murjeva, M. Sredkova, D. Ivanova, G. Lazarova, G. Nedelcheva, R. Kaneva, I. Mitov // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 89. – No. 4. – P. 310-313.
124. Marti, R. Draft Genome Sequence of *Klebsiella pneumoniae* 704SK6, an OXA-48- and CTX-M-15-Encoding Wastewater Isolate / R. Marti, R. Stephan, J. Klumpp, M. Nüesch-Inderbinen, J. Hummerjohann, C. Bagutti, K. Zurfluh // *Genome Announc.* – 2017. – Vol. 5. – No. 33. – P. 831-817.
125. McLaughlin, M.M. Quantifying the clinical virulence of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase *Klebsiella pneumoniae* with a *Galleria mellonella* model and a pilot study to translate to patient outcomes / M.M. McLaughlin, M.R. Advincula, M. Malczynski, G. Barajas, C. Qi, M.H. Scheetz // *BMC Infect Dis.* – 2014. – Vol. 14. – P. 14-31.
126. Merino, S. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-

mediated killing / S. Merino, S. Camprubí, S. Albertí, V.J. Benedí, J.M. Tomás // *Infect. Immun.* – 1992. – Vol. 60. – No. 6. – P. 2529-2535.

127. Merkel, L.K. Clinicopathologic and Microbiologic Findings Associated with Emphysematous Cystitis in 27 Dogs / L.K. Merkel, J. Lulich, D. Polzin, C. Ober, J. Westropp, J. Sykes // *J. Am Anim. Hosp. Assoc.* – 2017. – Vol. 53. No. 6. – P. 313-320.

128. Merrick, M.J. A rapid and efficient method for plasmid transformation of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* / M.J. Merrick, J.R. Gibbins, J.R. Postgate // *J. Gen. Microbiol.* – 1987. – Vol. 133. – No. 8. – P. 2053-2057.

129. Monié, M. *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis of the leg in an elderly French woman // M. Monié, L. Drieux, B. Nzili, M. Dicko, C. Goursot, S. Greffard, Décré D, A. Mézière // *Clin. Interv. Aging.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1171-1174.

130. Naas, T. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene / T. Naas, G. Cuzon, M.V. Villegas, M.F. Lartigue, J.P. Quinn, P. Nordmann // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – No. 4. – P. 1257-63.

131. Nassif, X. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin / X. Nassif, P.J. Sansonetti // *Infect. Immun.* – 1989. Vol. 54 – P. 603-608.

132. Navon-Venezia S. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance / S. Navon-Venezia, K. Kondratyeva, A. Carattoli // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2017. – Vol. 41. – No. 3. – P. 252-275.

133. Ng, D. Necrotizing fasciitis caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* in a Filipino female in North America / D. Ng, B. Frazee // *West J. Emerg. Med.* – 2015. – Vol. 16. – No. 1. – P. 165-168.

134. Ocampo, A.M. Molecular characterization of an outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Medellín, Colombia / A.M. Ocampo, C.A. Vargas, P.M. Sierra, A.V. Cienfuegos, J.N. Jiménez // *Biomedica.* – 2015. – Vol. 35. – No. 4. – P. 496-504.

135. Odouard, C. Rising trends of endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis in Australia / C. Odouard, D. Ong, P.R. Shah, T. Gin, P.J. Allen, J Downie, L.L. Lim, P. McCluskey // *Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 45. – No. 2. – P. 135-142.

136. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov, UGENE team // *Bioinformatics.* – 2012. – Vol.

28. – No. 8. – P. 1166-1167.

137. Osei Sekyere, J. Colistin and tigecycline resistance in carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: emerging resistance mechanisms and detection methods / J. Osei Sekyere, U. Govinden, L.A. Bester, S.Y. Essack // *J. Appl. Microbiol.* – 2016. – Vol. 121. – No. 3. – P. 601-617.

138. Oteo, J. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain / J. Oteo, J.M. Hernández, M. Espasa, A. Fleites, D. Sáez, V. Bautista, M. Pérez-Vázquez, M.D. Fernández-García, A. Delgado-Iribarren, I. Sánchez-Romero, L. García-Picazo, M.D. Miguel, S. Solís, E. Aznar, G. Trujillo, C. Mediavilla, D. Fontanals, S. Rojo, A. Vindel, J. Campos // *J Antimicrob Chemother.* – 2013. – Vol. 68. – No. 2. – P. 317-321.

139. Paczosa, M.K. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense / M.K. Paczosa, J. Meccas // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2016. – Vol. 80. – No. 3. – P. 629-661.

140. Pan, Y.J. Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae* / Y.J. Pan, T.L. Lin, C.R. Hsu, J.T. Wang // *Infect. Immun.* – 2011. – Vol. 79. – No. 3. – P. 997-1006.

141. Partina, I. Surveillance of antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* pathogens isolated from intensive care units and surgical units in Russia / I. Partina, O. Kalinogorskaya, S. Kojima, V. Gostev, M. Volkova, V. Ageevets, Y. Lobzin, S. Sidorenko // *Jpn J Antibiot.* – 2016. – Vol. 69. – No. 1. P. 41-51.

142. Pichler, C. First report of invasive liver abscess syndrome with endophthalmitis caused by a K2 serotype ST2398 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Germany, 2016 / C. Pichler, M. Büchsel, J.W. Rossen, M. Vavra, S. Reuter, W.V. Kern, R. Thimme, A. Mischnik // *New Microbes New Infect.* – 2017. – Vol. 17. – P. 77-80.

143. Pinsky, B.A. Bartholin's abscess caused by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* / B.A. Pinsky, E.J. Baron, J.M. Janda, N. Banaei // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58. – No. 5. – P. 671-673.

144. Pinto-Almeida, T. Exuberant cutaneous ulcers on the buttocks caused by multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* / T. Pinto-Almeida, A. Rosmaninho, I. Lobo, R. Alves, M. Selores // *Dermatol. Online. J.* – 2012. – Vol. 18. – No. 8. – P. 15.

145. Pitout, J.D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen

set for global nosocomial dominance / J.D. Pitout, P. Nordmann, L. Poirel // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2015. – Vol. 59. – P. 5873-5884.

146. Podschun, R. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors // R. Podschun, U. Ullmann // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1998. – Vol. 11. – No. 4. – P. 589–603.

147. Poirel, L. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48 / L Poirel, RA Bonnin, P Nordmann // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2012. – Vol. 56. – No. 1. – P. 559-562.

148. Potron, A. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48 / A. Potron, L. Poirel, P. Nordmann // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – No. 1. – P. – 467-471.

149. Ramirez, M.S. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm / M.S. Ramirez, G.M. Traglia, D.L. Lin, T.Tran, M.E. Tolmasky // *Microbiol. Spectr.* – 2014. – Vol. 2. – No. 5. P. 1–15.

150. Rasheed, J.K. Evolution of extended-spectrum beta-lactam resistance (SHV-8) in a strain of *Escherichia coli* during multiple episodes of bacteremia. / J.K. Rasheed, C. Jay, B. Metchock, F. Berkowitz, L. Weigel, J. Crellin, C. Steward, B. Hill, A.A. Medeiros, F.C. Tenover // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1997. – Vol. 41. – No 3. – P. 647-653.

151. Raza, S. First Report of *bla* CTX-M-15-Type ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Wild Migratory Birds in Pakistan / Raza S, Mohsin M, Madni WA, Sarwar F, Saqib M, Aslam B / *Ecohealth.* – 2017. – Vol. 14. – No. 1. – P. 182-186.

152. Razmyar, J. An outbreak of yolk sac infection and dead-in-shell mortality in common canary (*Serinus canaria*) caused by *Klebsiella pneumoniae* / J. Razmyar, A.H. Zamani // *Iran J. Vet. Res.* – 2016. – Vol. 17. – No. 2. – P. 141-143.

153. Regué, M. A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence / M. Regué, B. Hita, N. Piqué, L. Izquierdo, S. Merino, S. Fresno, V.J. Benedí, J.M. Tomás // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 54-61.

154. Restrepo, F.A.D. Molecular characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in a Public Hospital in Caracas, Venezuela // A.D.F. Restrepo, M.A.V. Nieves, H. Takiff // *Enferm Infecc Microbiol Clin.* – 2017. – Vol. – 35. – No. 7. – P. 411-416.

155. Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in

nosocomial pathogens: no ESKAPE / L.B. Rice // *J. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 197. – No. 8. – P. 1079-1081.

156. Riley, M.A. Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae* / M.A. Riley T. Pinou, J.E. Wertz, Y. Tan, C.M Valletta // *Plasmid.* – 2001. – Vol. 45. – P. 209–221.

157. Rimoldi, S.G. Whole genome sequencing for the molecular characterization of carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the Italian ASST Fatebenefratelli Sacco Hospital, 2012–2014 / S.G. Rimoldi, B. Gentile, C. Pagani, A. Di Gregorio, A. Anselmo, A.M. Palozzi, A. Fortunato, V. Pittiglio, A.L. Ridolfo, M.R. Gismondo, G. Rizzardini, F. Lista // *BMC Infectious Diseases* – 2017. – Vol. – 17. – P. 666.

158. Rock, C. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment / C. Rock, KA Thom, M Masnick, JK Johnson, AD Harris, DJ Morgan // *Infect.Control. Hosp. Epidemiol.* – 2014. – Vol. 35. No. 4. – P. 426-429.

159. Rosen, D.A. *Klebsiella pneumoniae* FimK Promotes Virulence in Murine Pneumonia / D.A. Rosen, J.K Hilliard, K.M. Tiemann, E.M Todd, S.C. Morley, D.A. Hunstad // *J. Infect Dis.* – 2016. – Vol/ 213. – No. 4. – P. 649-658.

160. Rosenthal, V.D. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module / V.D. Rosenthal, H.M. Al-Abdely, A.A. El-Kholy, S.A. AlKhawaja, H. Leblebicioglu, Y. Mehta, V. Rai, N.V. Hung, S.S. Kanj, M.F. Salama, E. Salgado-Yepez, N. Elahi, M.R. Otero, A. Apisarnthanarak, B.M. De Carvalho, B.E. Ider, D. Fisher, M.C. Buenaflor, M.M. Petrov, A.M. Quesada-Mora, F. Zand, V. Gurskis, T. Anguseva, A. Ikram, A.D. de Moros, W. Duszynska, N. Mejia, F.G. Horhat, V. Belskiy, V. Mijljevic, G. Di Silvestre, K. Furova, G.Y. Ramos-Ortiz, M.O. Gamar Elanbya, H.I. Satari, U. Gupta, T. Dendane, L. Raka, H. Guanche-Garcell, B. Hu, D. Padgett, K. Jayatilleke, B.N. Jaballah, E. Apostolopoulou, P.W.E. Leon, A. Sepulveda-Chavez, H.M. Telechea, A. Trotter, C. Alvarez-Moreno, L. Kushner-Davalos // *Am. J. Infect. Control.* – 2016. – Vol.44. – No. 12. – P. 1495-1504.

161. Sader, H.S. Antimicrobial Activity of Ceftazidime-Avibactam against Gram-Negative Bacteria Isolated from Patients Hospitalized with Pneumonia in U.S. Medical Centers, 2011 to 2015 // H.S. Sader, M. Castanheira, R.K. Flamm // *Antimicrob Agents*

Chemother. – 2017. – Vol. 61. – No. 4. – P. e02083-16.

162. Sahly, H. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* / H. Sahly, R. Podschun, T.A. Oelschlaeger, M. Greiwe, H. Parolis, D. Hasty, J. Kekow, U. Ullmann, I. Ofek, S. Sela // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68. – No. 12. – P. 6744-6749.

163. Santajit, S. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / S. Santajit, N. Indrawattana // BioMed Res. Int. – 2016. – Vol. 2016. – P. 2475067.

164. Sarno, R. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1 / R. Sarno, G. McGillivray, D.J. Sherratt, L.A. Actis, M.E. Tolmasky // Antimicrob. Agents. Chemother. – 2002. – Vol. 46. – No. 11. – P. 3422-3427.

165. Schembri, M.A. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae* / M.A. Schembri, J. Blom, K.A. Krogfelt, P. Klemm // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. No. 8. – P. 4626–4633.

166. Shin, S.Y. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36 / S.Y. Shin, I.K. Bae, J. Kim, S.H. Jeong, D. Yong, J.M. Kim, K. Lee // J Med Microbiol. – 2012. – Vol. 61. – P. 239-245.

167. Shon, A.S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P. Bajwa, T.A. Russo // Virulence. – 2013. – Vol. 4 – No 2. – P. 107-118.

168. Shu, H.Y. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates / H.Y. Shu, C.P. Fung, Y.M. Liu, K.M. Wu, Y.T. Chen, L.H. Li, T.T. Liu, R. Kirby, S.F. Tsai // Microbiology. – 2009. – Vol. 155. – No. – 12. – P. 4170-4183.

169. Silva-Sánchez, J. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico / J. Silva-Sánchez, E. Cruz-Trujillo, H. Barrios, F. Reyna-Flores, A. Sánchez-Pérez; Bacterial Resistance Consortium, U. Garza-Ramos // PLoS One. – 2013. – Vol.8. – No. 10. – P. e77968.

170. Sobirk, S.K. Primary *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess with Metastatic Spread to Lung and Eye, a North-European Case Report of an Emerging Syndrome. / S.K.

Sobirk, C. Struve, S.G. Jacobsson // *Open. Microbiol. J.* – 2010. – Vol. 4. – P. 5-7.

171. Song, W. In vivo selection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by OmpK36 loss during meropenem treatment / W. Song, B. Suh, J.Y. Choi, S.H. Jeong, E.H. Jeon, Y.K. Lee, S.G. Hong, K. Lee // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 65. – No. 4. P. 447-449.

172. Stahlhut, S.G. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* / S.G. Stahlhut, V. Tchesnokova, C. Struve, S.J. Weissman, S. Chattopadhyay, O. Yakovenko, P. Aprikian, E.V. Sokurenko, K.A. Krogfelt // *J. Bacteriol.* – 2009. – Vol. 191. – No. 21. – P. 6592-6601.

173. Struve, C. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity / C. Struve, M. Bojer, K.A. Krogfelt // *Infect. Immun.* – 2009. – Vol. – 77. – No. 11. – P. 5016-5024.

174. Struve, C. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / C. Struve, C.C. Roe, M. Stegger, S.G. Stahlhut, D.S. Hansen, D.M. Engelthaler, P.S. Andersen, E.M. Driebe, P. Keim, K.A. Krogfelt // *MBio.* – 2015. – Vol. 6. – No. 4. – P. e00630.

175. Su, S.-C. Community-Acquired Liver Abscess Caused by Serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* with CTX-M-15-Type Extended-Spectrum β -Lactamase / S.-C. Su, L. K. Siu, L. Ma, K.-M. Yeh, C.-P. Fung, J.-C. Lin, F.-Y. Chang // *Antimicrobio Agentsso Chemother.* – 2008. – Vol. 52. – No. 2. – P. 804–805.

176. Surgers, L. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France / L. Surgers, A. Boyd, P.M. Girard, G. Arlet, D. Decré // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. – Vol. 22. – No. 9. – P. 1687-1688.

177. Tafoukt, R. Characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* isolated from river water in Algeria / R. Tafoukt, A. Touati, T. Leangapichart, S. Bakour, J.M. Rolain // *Water Res.* – 2017. – Vol. 120. – P. 185-189.

178. Talaat, M. National surveillance of health care-associated infections in Egypt: Developing a sustainable program in a resource-limited country / M. Talaat, M. El-Shokry, J. El-Kholy, G. Ismail, S. Kotb, S. Hafez, E. Attia, F.C. Lessa // *Am. J. Infect. Control.* – 2016. – Vol. 44. – No. 11. – P. 1296-1301.

179. Thomas, J.C. A Fast CTAB Method of Human DNA Isolation for Polymerase Chain Reaction Applications / J.C. Thomas, R. Khoury, C.K. Neeley, A.M. Akroush, E.C. Davies // *Biochemical Education*. – 1997. – Vol. 25. – No. 4. – P. 233-235.
180. Touati, A. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria / A. Touati, A. Mairi, Y. Baloul, R. Lalaoui, S. Bakour, L. Thighilt, A. Gharout, J.M. Rolain / *J. Glob. Antimicrob. Resist.* – 2017. – Vol. 9. – P. 17-18.
181. Tsai, C.M. A sensitive silverstain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels / C.M. Tsai, C.E. Frash / *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 119. – P. 115-119.
182. Tsai, Y.K. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence / Y.K. Tsai, C.P. Fung, J.C. Lin, J.H. Chen, F.Y. Chang, T.L. Chen, L.K. Siu // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2011. – Vol. 55. – No. 4. – P. 1485-1493.
183. Vasaikar, S. Molecular Characteristics and Antibiotic Resistance Profiles of *Klebsiella* Isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa / S. Vasaikar, L. Obi, I. Morobe, M. Bisi-Johnson // *Int. J. Microbiol.* – 2017. Vol. 2017. – P. 8486742.
184. Vila, A. Appearance of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome in Argentina: case report and review of molecular mechanisms of pathogenesis / A. Vila, A. Cassata, H. Pagella, C. Amadio, K.M. Yeh, F.Y. Chang, L.K. Siu // *Open. Microbiol. J.* – 2011. – Vol. 5. – P. 107-713.
185. Wang, J.H. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan / J.H. Wang, Y.C. Liu, S.S. Lee, M.Y. Yen, Y.S. Chen, J.H. Wang, S.R. Wann, H.H. Lin // *Clin Infect Dis.* – 1998. – Vol. 26. – No. 6. – P. 1434-1438.
186. Wang, Q. Genotypic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Beijing Hospital reveals high genetic diversity and clonal population structure of drug-resistant isolates / Q. Wang, B. Li, A.K. Tsang, Y. Yi, P.C. Woo, C.H. Liu // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8. – No. 2. – P. e57091.
187. World Health Organization Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>

188. Xiao, S.Z. The Resistance Phenotype and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in Bloodstream Infections in Shanghai, China, 2012-2015 / S.Z. Xiao, S. Wang, W.M. Wu, S.Y. Zhao, F.F. Gu, Y.X. Ni, X.K. Guo, J.M. Qu, L.Z. Han // Front. Microbiol. – 2017. Vol. 8. – P. 250.
189. Xie, L. Coexistence of blaOXA-48 and Truncated blaNDM-1 on Different Plasmids in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate in China. / L. Xie, Y. Dou, K. Zhou, Y. Chen, L. Han, X Guo, J. Sun // Front. Microbiol. – 2017.- Vol. 8. – P. 133.
190. Xu, L. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* / L. Xu, X. Sun, X. Ma // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2017. – Vol. 16. – No. 1. – P. 18.
191. Yan, Q. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated patients in China / Q. Yan, M. Zhou¹, M. Zou¹, W.-E. Liu // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 35. – P. 387-396.
192. Yang, J. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China / J. Yang, Y. Chen, X. Jia, Y. Luo, Q. Song, W. Zhao, Y. Wang, H. Liu, D. Zheng, Y. Xia, R. Yu, X. Han, G. Jiang, Y. Zhou, W. Zhou, X. Hu, L. Liang, L. Han // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – Vol. 18. – No. 12. P. E506-13.
193. Yang, S.J. *Klebsiella pneumoniae* orbital cellulitis with extensive vascular occlusions in a patient with type 2 diabetes // S.J. Yang, S.Y. Park, Y.J. Lee, H.Y. Kim, J.A. Seo, S.G. Kim, D.S. Choi // Korean. J. Intern. Med. – 2010. – Vol. 25. –No. 1. – P. 114-117.
194. Yao, B. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China / B. Yao, X. Xiao, F. Wang, L. Zhou, X. Zhang, J. Zhang // Int J Infect Dis. – 2015. – Vol. – 37. – P. 107-112.
195. Yu, W.L. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes / W.L. Yu, W.C. Ko, K.C. Cheng, C.C. Lee, C.C. Lai, Y.C. Chuang // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 62. – No. 1. – P. 1-6.
196. Yu, W.L. Intrapersonal mutation of *rmpA* and *rmpA2*: A reason for negative hypermucoviscosity phenotype and low virulence of *rmpA*-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates / W.L. Yu, M.F. Lee, M.C. Chang, Y.C. Chuang // J. Glob. Antimicrob. Resist. –

2015. – Vol. 3. – No. 2. – P. 137-141.

197. Zakharova, M.V. Characterization of pECL18 and pKPN2: a proposed pathway for the evolution of two plasmids that carry identical genes for a Type II restriction-modification system / M.V. Zakharova, I.V. Beletskaya, M.M. Denjmukhametov, T.V. Yurkova, L.M. Semenova, M.G. Shlyapnikov, A.S. Solonin / Mol. Genet. Genomics. – 2002. – Vol. 267. – P. 171–178

198. Zankari, E. Identification of acquired antimicrobial resistance genes / E. Zankari, H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F.M. Aarestrup, M.V. Larsen // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Vol. 67. – No. 11. – P. 2640-2644.

199. Zhang, R. Emergence of Carbapenem-Resistant Serotype K1 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strains in China / R. Zhang, D. Lin, E. W. Chan, D. Gu, G.-X. Chen, S. Chen // Antimicrob. Agents Chemother. – 2015. – Vol. 60. – No. 1. – P. 709-711.

200. Zhao, J. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China / J. Zhao, Chen J. , M. Zhao, X. Qiu, X. Chen, W. Zhang, R. Sun, J.O. Ogotu, F. Zhang // Jpn. J. Infect Dis. – 2016. – Vol. 69. – No. 5. – P. 357-360.

201. Zimmer, M. Detection of *Campylobacter jejuni* strains in the water lines of a commercial broiler house and their relationship to the strains that colonized the chickens / M. Zimmer, H. Barnhart, U. Idris, M.D. Lee // Avian. Dis. – 2003. – Vol. 47. – No. 1. – P. 101-107.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в 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.

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. Мякинина, 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 // 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 // Материалы VI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины». - 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. - 2015 г. – С. 193.
- 6 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 // 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» - 2015 г.
 - 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» - 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 // Клин. 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 // Клин. 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 // Клин. 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 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 // Клин. 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. Одновременные 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.

Примечание: Князева, Knyazeva – фамилия Лев А.И. до даты 31.10.2015 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Перечень праймеров, использованных в работе

| Ген | Название праймера | Олигонуклеотидная последовательность | Источник |
|---|-------------------|--------------------------------------|------------------------|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| Генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам | | | |
| <i>bla</i> _{SHV} | SHV-F | 5'-atgcgttatattcgctgtg-3' | Priamchuk et al., 2010 |
| | SHV-R | 5'-tgctttgttattcgggcca-3' | |
| <i>bla</i> _{TEM} | TEM dir | 5'-atgagtattcaacatttccg-3' | Rasheed et al., 1997 |
| | TEM rev | 5'-ctgacagttaccaatgctta-3' | |
| <i>bla</i> _{CTX-M} | CTX-M-Fext | 5'-tttgcgatgtgcagtagcagtaa-3' | Edelstein et al., 2003 |
| | CTX-M-R1 | 5'-ctccgctgcccgtttatc-3' | |
| <i>bla</i> _{OXA-48-like} | OXA-48A | 5'-ttggtggcatcgattatcg-3' | Poirel et al., 2012 |
| | OXA-48 | 5'-gagcacttctttgtgatggc-3' | |
| <i>bla</i> _{NDM} | NDM1-F | 5'-gaagctgagcaccgcattag-3' | Yang et al., 2012 |
| | NDM1-R | 5'-gggccgtatgagtattgc-3' | |
| <i>bla</i> _{KPC} | KPC-A-F | 5'-gtcactgtatcgccgc-3' | Rasheed et al., 2008 |
| | KPC-A-R | 5'-gtcagtgtctacagaaaacc-3' | |
| <i>bla</i> _{VIM} | VIM-F | 5'-tttggtcgcatatcgcaacg-3' | Hujer et al., 2006 |
| | VIM-R | 5'-ccattcagccagatcggcat-3' | |
| <i>bla</i> _{IMP} | IMP-F | 5'-gtttatgttcatacwtcg-3' | Hujer et al., 2006 |
| | IMP-R | 5'-ggtttaayaaaacaaccac-3' | |
| <i>bla</i> _{OXA SET A} | OXA set A-F | 5'-atgaaaaaatttatacttcc-3' | Hujer et al., 2006 |
| | OXA set A-R | 5'-ttaaattgattccaagatttc-3' | |
| <i>bla</i> _{OXA SET B} | OXA set B-F | 5'-tctggtgtacggttcagc-3' | Hujer et al., 2006 |
| | OXA set B-R | 5'-agtctttccaaaaatttg-3' | |
| <i>bla</i> _{OXA SET C} | OXA set C-F | 5'-acagaartatttaagtggg-3' | Hujer et al., 2006 |
| | OXA set C-R | 5'-ggtctacakccmwtcccca-3' | |
| <i>int1</i> | IntI1-F | 5'-ggtcaaggatctggatttcg-3' | Machado et al., 2005 |
| | IntI1-R | 5'-acatgctgtgaaatcatcgtc-3' | |
| <i>int1</i> | 5'CS | 5'-ggcatccaagcacaagc-3' | Jiang et al., 2005 |
| | 3'CS | 5'-aagcagacttgactgat-3' | |
| <i>int2</i> | IntI2-F | 5'-cacggatattcgacaaaaaggt-3' | Skurnik et al., 2005 |
| | IntI2-R | 5'-gtagcaaacgagtgacgaaat-3' | |
| <i>int2</i> | attI2-5' | 5'-gacggcatgcacgatttga-3' | Jiang et al., 2005 |
| | orfX-R | 5'-gatgccatcgcaagtacgag-3' | |
| <i>ompK36</i> | ompK36-F | 5'-gaagggtaacagtaagcagtggc-3' | Chen et al., 2010 |
| | ompK36-R | 5'-gcgtgcttagaactggtaaac-3' | |

Продолжение Приложения А

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|-------------|--|------------------------|
| <i>ompA</i> | ompA-F | 5'-agctcttgctggcttaaacg-3' | Bratu et al., 2008 |
| | ompA-R | 5'-gagcaactggagttggttca-3' | |
| Гены, ассоциированные с вирулентностью <i>K. pneumoniae</i> | | | |
| <i>rmpA</i> | rmpA-F | 5'-actgggctacctcttgcttca-3' | Nassif et al., 1989 |
| | rmpA-R | 5'-cttgcattgagccattttca-3' | |
| <i>aer</i> | aer1-F | 5'-gcatagggcgatacgaacat-3' | Nassif et al., 1989 |
| | aer1-R | 5'-cacagggcaattgcttacct-3' | |
| <i>aer</i> | aer2-F | 5'-ctgtcggcatcggttttatt-3' | Nassif et al., 1989 |
| | aer2-R | 5'-tggcgtgtcgattattacca-3' | |
| <i>uge</i> | uge-F | 5'-tcttcacgccttccttact-3' | Regué et al., 2004 |
| | uge-R | 5'-gatcatccggctctccctgta-3' | |
| <i>wag</i> | wabG-F | 5'-accatcggccatttgataga-3' | Izquierdo et al., 2003 |
| | wabG-R | 5'-cggactggcagatccatattc-3' | |
| <i>kfu</i> | kfuB-F1179 | 5'-gaagtgacgctgtttctggc-3' | Ma et al., 2005 |
| | kfuC-R649 | 5'-tttcgtgtggccagtgactc-3' | |
| <i>fimH</i> | fimH-F | 5'-tgctgctgggctggctgatg-3' | Yu et al., 2008 |
| | fimH-R | 5'-gggaggggtgacggtgacatc-3' | |
| <i>allR</i> | 10E4-2-5F | 5'-agtcggcctggggtttaagg-3' | Chou et al., 2004 |
| | 10E4-2-475R | 5'-cagtcacgtggcgattcgc-3' | |
| К-типирование <i>K. pneumoniae</i> | | | |
| <i>wzy_K1</i> | wzy_K1-F | 5'-ggtgctctttacatcattgc-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K1-R | 5'-gcaatggccatttgcttag-3' | |
| <i>wzy_K2</i> | wzy_K2-F | 5'-ggattatgacagcctctctc-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K2-R | 5'-cgacttggctccaacagttt-3' | |
| <i>wzy_K5</i> | wzy_K5-F | 5'-cagggaaactcctacgcagattt-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K5-R | 5'-gggtgataaggtatagctgacac-3' | |
| <i>wzy_K20</i> | wzy_K20-F | 5'-cggtgctacagtgatcatt-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K20-R | 5'-gttatacgtgctcagtcgc-3' | |
| <i>wzy_K54</i> | wzy_K54-F | 5'-gttacctcagagcgttgcat-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K54-R | 5'-cggacttaatagcagcaag-3' | |
| <i>wzy_K57</i> | wzy_K57-F | 5'-ctcagggctagaagtgtca-3' | Fang et al., 2007 |
| | wzy_K57-R | 5'-cactaaccagaaagtcgag-3' | |
| <i>wzi</i> | wzi_for2 | 5'-gtgccgcgagcgtttctatttcc-3' | Brisse et al., 2013 |
| | wzi_rev | 5'-gagagccactggtccagaa[c/t]tt[c/g]accgc-3' | |
| Мультилокусное секвенирование-типирование <i>K. pneumoniae</i> | | | |
| <i>gapA</i> | gapA173 | 5'-tgaatatgactccactcacgg-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | gapA181 | 5'-cttcagaagcggctttgatggctt-3' | |

Продолжение Приложения А

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------|-----------|----------------------------------|------------------------|
| <i>infB</i> | infB1F | 5'-ctcgctgctggactatattcg-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | infB1R | 5'-cgctttcagctcaagaacttc-3' | |
| <i>mdh</i> | mdh130 | 5'-cccaactcgcttcaggttcag-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | mdh867 | 5'-ccgttttccccagcagcag-3' | |
| <i>pgi</i> | pgi1F | 5'-gagaaaaacctgctgtactgctggc-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | pgi1R | 5'-cgcgccacgctttatagcggtaat-3' | |
| <i>phoE</i> | phoE604.1 | 5'-acctaccgcaacaccgacttcttcgg-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | phoE604.2 | 5'-tgatcagaactggtagtgat-3' | |
| <i>rpoB</i> | Vic3 | 5'-ggcgaaatggcgwagaacca-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | Vic2 | 5'-gagtcttcgaagttgtaacc-3' | |
| <i>tonB</i> | tonB1F | 5'-ctttatacctcggtacatcaggtt-3' | Diancourt et al., 2005 |
| | tonB2R | 5'-attcgccggctgrgcrgagag-3' | |

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Номера доступа нуклеотидных последовательностей генов *K. pneumoniae*, размещенных в базе данных GenBank

| Обозначение гена | Номер доступа |
|--|---|
| 1 | 2 |
| Гены, ассоциированные с антибиотикорезистентностью (n=194) | |
| <i>bla</i> _{CTX-M-15} (n=59) | KJ187476; KJ187477; KM058748; KM058751; KM058752; KJ469366; KJ363319; KJ363321; KJ469365; KJ481796; KM085432; KM871847; KP205559; KP205560; KP205561; KP205562; KP205563; KP214528; KP214529 – KP214537; KP902663; KP998758; KP998760; KP998762; KR093971 – KR186075; KT022224; KT022225; KU360115; KU360116; KU510255 – KU510258; KU510264; KU510272; KU510273; KU870992; KX906675; KX944737; KX944739; MF663001 – MF663008 |
| <i>bla</i> _{CTX-M-3} (n=5) | KP214538; KR093974; KR093975; KU510254; KU871000 |
| <i>bla</i> _{CTX-M-55} (n=1) | KU510263 |
| <i>bla</i> _{OXA-48} (n=62) | KJ481797; KJ481798; KM085437; KP100448; KP100449; KP198287 – KP198289; KP198290 – KP198294; KP205554 – KP205556; KP455671; KP713396; KP713397; KP739834; KP739836; KP739837; KP739838; KP789946; KP849466; KP849468; KP902668; KP902670; KP902671; KP995742; KP998753; KP998755 – KP998757; KR186069 – KR186071; KR610430; KR610431; KT175899; KT232258; KT232259; KU821683; KU821684; KU821686; KX906674; KY094971 – KY094977; KY785312 – KY785315; KY862014; MF447888; MF447889; MG748704; MG757589 |
| <i>bla</i> _{OXA-244} (n=10) | KJ187475; KJ481795; KJ481799; KM058746; KP739835; KP849467; KP995740; KT175898; KU821685; KU821687 |
| <i>bla</i> _{NDM-1} (n=9) | KX218441, KY751957-KY751963; MF447897 |
| <i>bla</i> _{SHV-11} (n=9) | KY026070; MF662987 – MF662990; MF662993, MF662995, MF662999, MF663000 |
| <i>bla</i> _{SHV-110} (n=2) | MF662997, MF662998 |
| <i>bla</i> _{SHV-190} (n=2) | MF662991, MF662996 |
| <i>bla</i> _{SHV-83} (n=1) | KX827598 |
| <i>bla</i> _{TEM-1} (n=16) | KY026071, KY785310, KY785311; MF662974 – MF662986 |
| <i>intl 1</i> (n=1) | KY785317 |
| <i>ins1: aadA1</i> (n=4) | KR028104; KR028105; KR028106; KY707940 |
| <i>ins1: aadB-aadA1</i> (n=5) | KU901703; KY885012; MF447894; MF447896; MF447898 |
| <i>ins1: dfrA12-orfF-aadA2</i> (n=15) | KJ363320; KM009101; KP902672; KU588957; KU860566; KU860570; KU870991; KU901702; KX906676; KY084251; KY084253; KY293687; KY707938; KY859153; KY862013 |

Продолжение Приложения Б

| 1 | 2 |
|---|--|
| <i>ins1: dfrA15-aadA1</i> (n=1) | KY658722 |
| <i>ins1: dfrA17-aadA5</i> (n=6) | KF952266; KM009102; KP713391; KY652166; KY652168; KY658723 |
| <i>ins1: dfrA1-orfC</i> (n=10) | KU860569; KX906677; KY084250; KY084252; KY658724; KY707941; KY859155; KY859156; MF170234; MF447895 |
| <i>ins1: dfrA7</i> (n=1) | KY053527 |
| <i>ins1:dfrA25</i> (n=1) | MG757586 |
| <i>ompK36/ompC</i> (n=27) | KJ579289, KJ579292, KR779865, KT175901, KX347524, KX232456, KY026069; MF668611; MF668612; MF668613; MG745149 - MG745165 |
| Гены, ассоциированные с вирулентностью (n=119) | |
| <i>rmpA</i> (n=24) | KJ469368, KJ481794, KP760051, KU738807, KU749588-KU749590, KX954826-KX954837, KY751971-KY751975 |
| <i>iroD</i> (n=7) | KJ481793, KP670320, KP751218, KU749591-KU749594 |
| <i>iroN</i> (n=7) | KJ481792, KP670321, KP751219, KY613635, KY613636-KY613638 |
| <i>uge</i> (n=30) | KJ633804, KP645168, KP645169, KP760052-KP760057, KX954838-KX954851, KY751976-KY751981 |
| <i>wabG</i> (n=38) | KJ579287, KJ579288, KP645170, KP645171, KP670314-KP670319, KP760050, KP995738, KP995739, KR610428, KX954852-KX954868, KY751964- KY751970 |
| <i>kfu</i> (n=1) | KM357269 |
| <i>fimH</i> (n=4) | KJ579294, KM357270, KP713398, KR610429 |
| <i>allR</i> (n=8) | KY613627, KY613628, KY613629, KY613630, KY613631, KY613632, KY613633, KY613634 |
| Гены, ассоциированные с капсульным серотипом (n=32) | |
| <i>wzy_K1</i> (n=2) | KU510265, KU510266 |
| <i>wzy_K2</i> (n=2) | KU510267, KU510268 |
| <i>wzy_K57</i> (n=2) | KU510270, KU510271 |
| <i>wzi</i> (n=26) | KY231912-KY231922, KY751982-KY751986 |

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Сиквенс-типы штаммов *K. pneumoniae*

| № | Штамм | Дата | Источник выделения | ID | ST | СС | Аллельный профиль генов «домашнего хозяйства», Номер доступа GenBank, n=98 | | | | | | |
|----|-------------|----------|--------------------|------|-----|-----|--|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| | | | | | | | <i>gapA</i> | <i>infB</i> | <i>mdh</i> | <i>pgi</i> | <i>phoE</i> | <i>rpoB</i> | <i>tonB</i> |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| 1 | KPPig* | 01.02.15 | Легкие | 4673 | 5 | 5 | 2 | 2 | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | KPB2304K/15 | 21.12.15 | Энд. аспират | 4806 | 11 | 11 | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 4 |
| 3 | KPB-591/15 | 25.02.15 | Люмб. ликвор | 4809 | 20 | 20 | 2 | 3 | 1 | 1 | 4 | 4 | 4 |
| 4 | KPB463K | 15.04.13 | Энд. аспират | 3600 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 5 | KPB1802K | 21.11.13 | Энд. аспират | 3601 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 6 | KPB475/14 | 25.03.14 | Моча | 3602 | 23 | 23 | 2 KT265284 | 1 KT265282 | 1 KT265285 | 1 KT265278 | 9 KT265283 | 4 KT265281 | 12 KT265280 |
| 7 | KPI261 | 02.06.14 | Мокрота | 3603 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 8 | KPB594/14 | 20.02.14 | Хирург. рана | 3681 | 23 | 23 | 2 KU527807 | 1 KU527808 | 1 KU527809 | 1 KU527810 | 9 KU527811 | 4 KU527812 | 12 KU527813 |
| 9 | KPB1493-1 | 01.10.13 | Энд. аспират | 3682 | 23 | 23 | 2 KU527814 | 1 KU527815 | 1 KU527816 | 1 KU527817 | 9 KU527818 | 4 KU527819 | 12 KU527820 |
| 10 | KPB-1103/14 | 15.07.14 | Моча | 3896 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 11 | KPS7 | 01.07.16 | Пат. материал | 4803 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 12 | KPB542/15 | 30.03.15 | Моча | 4804 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 13 | KPI1683 | 04.08.14 | Зев | 4807 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 14 | KPI112 | 01.12.14 | Нос | 4808 | 23 | 23 | 2 | 1 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 15 | KPB420/14 | 13.03.14 | Моча | 3893 | 48 | 48 | 2 | 5 | 2 | 2 | 7 | 1 | 10 |
| 16 | KPB1493-2 | 01.10.13 | Энд. аспират | 3898 | 48 | 48 | 2 | 5 | 2 | 2 | 7 | 1 | 10 |
| 17 | KPB367/15 | 02.03.15 | Энд. аспират | 4805 | 48 | 48 | 2 | 5 | 2 | 2 | 7 | 1 | 10 |
| 18 | KPI1748 | 14.08.14 | Зев | 3900 | 65 | 65 | 2 | 1 | 2 | 1 | 10 | 4 | 13 |
| 19 | KPI6208 | 11.03.14 | Зев | 3613 | 86 | 86 | 9 KT254193 | 4 KT254189 | 2 KT254187 | 1 KT254192 | 1 KT254188 | 1 KT254190 | 27 KT254191 |
| 20 | KPI1627 | 16.06.14 | Зев | 3614 | 86 | 86 | 9 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 27 |
| 21 | KPB492/16 | 08.04.16 | Рана | 4672 | 86 | 86 | 9 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 27 |
| 22 | KPB463/16 | 04.04.16 | Бр. лаваж | 4799 | 86 | 86 | 9 | 4 | 2 | 1 | 1 | 1 | 27 |
| 23 | KPB711/14 | 12.05.14 | Рана | 3610 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |

Продолжение

| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----|------------|----------|--------------|------|------|-----|-----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
| 24 | КРВ944/14 | 24.06.14 | Моча | 3611 | 147 | 147 | 3 КТ277284 | 4 КТ277224 | 6 КТ277227 | 1 КТ277225 | 7 КТ277228 | 4 КТ277229 | 38 КТ277226 |
| 25 | КРВ958/14 | 26.06.14 | Моча | 3612 | 147 | 147 | 3 КТ277210 | 4 КТ277212 | 6 КТ277216 | 1 КТ277215 | 7 КТ277211 | 4 КТ277213 | 38 КТ277214 |
| 26 | КРВ417/16 | 28.03.16 | Энд. аспират | 4670 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |
| 27 | КРВ418/16 | 28.03.16 | Моча | 4671 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |
| 28 | КРВ1470/16 | 05.09.16 | Энд. аспират | 4800 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |
| 29 | КРВ1570/16 | 20.09.16 | Энд. аспират | 4801 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |
| 30 | КРВ1617/16 | 26.09.16 | Энд. аспират | 4802 | 147 | 147 | 3 | 4 | 6 | 1 | 7 | 4 | 38 |
| 31 | КРВ500 | 24.04.13 | Энд. аспират | 2249 | 218 | 23 | 2 KJ667586 | 3 KJ667587 | 1 KJ667588 | 1 KJ667589 | 9 KJ667590 | 4 KJ696738 | 12 KJ696739 |
| 32 | КРВ757К | 13.06.13 | Моча | 3604 | 218 | 23 | 2 КТ270587 | 3 КТ270589 | 1 КТ277209 | 1 КТ270592 | 9 КТ270588 | 4 КТ270590 | 12 КТ270591 |
| 33 | КРВ811К | 16.07.13 | В/ч пазуха | 3605 | 218 | 23 | 2 КТ277223 | 3 КТ277217 | 1 КТ277220 | 1 КТ277218 | 9 КТ277221 | 4 КТ277222 | 12 КТ277219 |
| 34 | КРВ690/14К | 06.05.14 | Моча | 3606 | 218 | 23 | 2 | 3 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 35 | КРВ2580/14 | 21.07.14 | Моча | 3607 | 23 | 23 | 2 КТ254195 | 3 КТ254197 | 1 КТ254194 | 1 КТ265277 | 9 КТ254196 | 4 КТ254198 | 12 КТ265279 |
| 36 | КРВ584 | 13.05.13 | Моча | 3892 | 218 | 23 | 2 | 3 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 37 | КРВ550 | 21.05.13 | Моча | 3897 | 218 | 23 | 2 | 3 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 38 | КРВ612-1 | 21.05.13 | Энд. аспират | 3899 | 218 | 23 | 2 | 3 | 1 | 1 | 9 | 4 | 12 |
| 39 | КРВ24/14 | 09.01.14 | Моча | 3608 | 395 | 395 | 3 КТ284752 | 1 КТ284746 | 2 КТ284749 | 4 КТ284747 | 1 КТ284750 | 1 КТ284751 | 4 КТ284748 |
| 40 | КРВ1224 | 01.12.12 | Мокрота | 3894 | 395 | 395 | 3 | 1 | 2 | 4 | 1 | 1 | 4 |
| 41 | КРВ1667 | 31.10.13 | Моча | 3895 | 395 | 395 | 3 | 1 | 2 | 4 | 1 | 1 | 4 |
| 42 | В-941/14 | 24.06.14 | Энд. аспират | 3609 | 833 | 11 | 3 КТ284745 | 3 КТ277285 | 1 КТ281143 | 1 КТ277286 | 1 КТ284743 | 1 КТ284744 | 12 КТ281142 |
| 43 | КРМ9 | 01.09.11 | Вода | 2250 | 1544 | 420 | 2 KJ696734 | 93 KJ696735 | 65 KJ696736 | 2 KJ696737 | 5 KJ696740 | 1 KJ696741 | 36 KJ696742 |
| 44 | КРІ3014 | 30.06.14 | Мокрота | 3642 | 2174 | 14 | 125 KU510247 | 6 KU510248 | 1 KU510249 | 1 KU510250 | 1 KU510251 | 1 KU510252 | 1 KU510253 |
| 45 | КРВ4010 | 31.10.13 | Ликвор | 3891 | 2280 | 65 | 2 | 1 | 2 | 1 | 10 | 4 | 12 |
| 46 | КРВ54/14 | 16.01.14 | Моча | - | - | 15 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | 1 |

ID – номер доступа в базе данных MLST PASTEUR; ST – сиквенс-тип; CC – клональный комплекс; * - штамм выделен от животного

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Информация о штаммах, включенных в филогенетических анализ

| № п/п | Штамм | Номер доступа | Год выделения | Географический регион | Источник выделения | Диагноз | Образец | К-серотип | Сиквенс-тип | Ссылка |
|-------|-------------------------------|---------------------|---------------|-----------------------|--------------------|--|----------------|-----------|-------------|---|
| 1 | KPi261 (SCPM-O-B-7850) | MCNO00000000 | 2014 | Россия | Человек | Инфекция верхних дыхательных путей | мокрота | K1 | ST23 | Kislichkina AA et al., 2017 |
| 2 | 1084 | NC_018522 | 2002 | Тайвань | Человек | Диабет, абсцесс печени | НД | K1 | ST23 | Lin AC et al., 2012 |
| 3 | NTUH_K2044 | NZ_AB371288 | | Тайвань | Человек | Первичный абсцесс печени, метастатический менингит | кровь | K1 | ST23 | Wu et al., 2009; Brisse et al., 2009 |
| 4 | B3639 | MBQC01000000 | 2015 | Индия | Человек | Бактериemia | кровь | НД | НД | НД |
| 5 | B3789 | MBFY01000000 | 2015 | Индия | Человек | Бактериemia | кровь | НД | НД | НД |
| 6 | BA253 | LZYA01000000 | 2016 | Индия | Человек | Бактериemia | кровь | НД | НД | НД |
| 7 | BIDMC85 | LFAY00000000 | 2013 | НД | Человек | НД | НД | НД | НД | НД |
| 8 | BIDMC86 | LFAZ00000000 | 2014 | НД | Человек | НД | НД | НД | НД | НД |
| 9 | ED2 | NZ_CP016813 | 2006 | Тайвань | Человек | Бактериemia, абсцесс печени | кровь | K1 | ST23 | Lin HH et al., 2016 |
| 10 | ED23 | NZ_CP016814 | 2006 | Тайвань | Человек | Первичный абсцесс печени, метастатический менингит | кровь | K1 | ST23 | Lin HH et al., 2016 |
| 11 | MGH94 | LFAF00000000 | 2014 | НД | Человек | НД | НД | НД | НД | НД |
| 12 | PB270 | FLVO00000000 | 2015 | Таиланд | Человек | НД | кровь | НД | НД | НД |
| 13 | PB502 | FLVM00000000 | 2015 | Таиланд | Человек | НД | моча | НД | НД | НД |
| 14 | PB94 | FLWV00000000 | 2014 | Таиланд | Человек | НД | кровь | НД | НД | НД |
| 15 | RJF999 | NZ_CP014010 | 2015 | Китай | Человек | Ишемическая болезнь сердца | кровь | НД | НД | НД |

| № п/п | Штамм | Номер доступа | Год выделения | Географический регион | Источник выделения | Диагноз | Образец | К-серотип | Сиквенс-тип | Ссылка |
|-------|-----------------------------------|---------------------|---------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------|---------------|-------------------------------------|
| 16 | UTSW Atlanta 01 | LUFA00000000 | 2015 | США | Человек | Остеомиелит | femoral bone | K1 | ST23 | Prokesch et al., 2016 |
| 17 | KPM9 (SCPM-O-B-7749) | MCNM00000000 | 2012 | Россия | Окружающая среда | НД | пресная вода | K20 | ST1544 | Kislichkina AA et al., 2017 |
| 18 | B2834 | LZSB01000000 | 2015 | Индия | Человек | Бактериемия | кровь | K20 | STnew* | НД |
| 19 | B14343 | MBQB01000000 | 2015 | Индия | Человек | Бактериемия | кровь | K20 | STnew* | НД |
| 20 | KPB4010 (SCPM-O-B-7846) | MCNN00000000 | 2013 | Россия | Человек | Назальная ликворея | Цереброспинальная жидкость | K2 | ST2280 | Kislichkina AA et al., 2017 |
| 21 | 1158 | NZ_CP006722 | 2002 | Тайвань | Человек | Диабет | НД | K2 | ST65* | НД |
| 22 | T2-1-1 | JAQL00000000 | НД | Малайзия | Человек | НД | язык | K2* | ST65* | Yin et al., 2012; Chan et al., 2015 |
| 23 | T2-1-2 | JAQM00000000 | НД | Малайзия | Человек | НД | язык | K2* | ST65* | Yin et al., 2012 |
| 24 | KPM417-16 (SCPM-O-B-7954) | NPJW00000000 | 2016 | Россия | Человек | | Эндотрахеальный аспират | K64 | ST147 | Volozhantsev NV et al., 2017 |
| 25 | KPM1470-16 (SCPM-O-B-7954) | NPPI00000000 | 2016 | Россия | Человек | | Эндотрахеальный аспират | K64 | ST174 | Volozhantsev NV et al., 2017 |
| 26 | KPNIH31 | NZ_CP009876 | 2013 | США | Человек | НД | моча | K27* | ST392* | Conlan et al., 2014 |
| 28 | 291_EBAC | JVMR00000000 | НД | США | Человек | НД | мокрота | НД | НД | Roach et al., 2015 |
| 29 | 383_ECLO | JVJG00000000 | НД | США | Человек | НД | НД | НД | НД | Roach et al., 2015 |
| 30 | 325 | JQGN00000000 | 2013 | Малайзия | Человек | НД | кожа | НД | НД | НД |
| 31 | BWH62 | LEZW01000000 | 2014 | США | Человек | НД | НД | НД | НД | НД |
| 32 | CHS 43 | JMXQ01000000 | 2013 | США | Человек | НД | моча | НД | НД | НД |
| 29 | CHS 48 | JMXU01000000 | 2013 | США | Человек | НД | абсцесс | НД | НД | НД |

| № п/п | Штамм | Номер доступа | Год выделения | Географический регион | Источник выделения | Диагноз | Образец | К-серотип | Сиквенс-тип | Ссылка |
|-------|----------------------|---------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------------------------|--------------------------|-----------|-------------|--|
| 30 | DSM 2026 (=NCTC 418) | JYBC00000000 | НД | США | Нет данных | НД | НД | К2 | НД | НД |
| 31 | Ecl8 | NZ_HF536482 | НД | Великобритания | Нет данных | НД | НД | НД | ST375 | Fookes et al., 2013 |
| 32 | Kp52.145 | NZ_FO834906 | <1935 | Индонезия | Человек | НД | НД | К2 | ST66 | Brisse et al., 2009; Bialek-Davenet et al., 2014 |
| 33 | T69 | CBTV01 | 2010 | Франция | Человек | Абсцесс печени | печеночный гной | К2 | ST375 | Bialek-Davenet et al., 2013 |
| 34 | MGH 78578 | NC_009648 | 1994 | НД | Человек | НД | мокрота | К52 | ST38 | Brisse et al., 2009 |
| 35 | 234-12 | NZ_CP011313 | 2011 | Германия | Человек | НД | кровь | НД | НД | НД |
| 36 | 34618 | NZ_CP010392 | 2011 | США | Человек | Пневмония | бронхоальвеолярный лаваж | НД | ST258 | НД |
| 37 | ATCC 43816 KPPR1 | NZ_CP009208 | 2000 | США | НД | НД | НД | НД | НД | НД |
| 38 | CAV1344 | NZ_CP011624 | 2010 | США | Человек | Инфекция мочевыводящих путей | моча | НД | НД | НД |
| 39 | DMC1097 | NZ_CP011976 | НД | США | Человек | НД | кровь | НД | ST258 | Wright et al., 2014 |
| 40 | HK787 | NZ_CP006738 | НД | НД | НД | НД | НД | К2 | НД | НД |
| 41 | HS11286 | NC_016838 | 2011 | Китай | Человек | НД | мокрота | НД | ST11 | Liu et al., 2012 |
| 42 | J1 | NZ_CP013711 | 2014 | Китай | Окружающая среда | НД | сточные воды | НД | НД | НД |
| 43 | KP-1 | NZ_CP012883 | НД | Австралия | Окружающая среда | НД | НД | НД | НД | Lee et al., 2013 |
| 44 | Kp13 | NZ_CP003999 | 2009 | Бразилия | Человек | Диабет, черепно-мозговая травма | кровь | NT | ST442 | Ramos et al., 2012; 2014 |
| 45 | KP617 | NZ_CP012753 | 2013 | Корея | Человек | Пневмония | ожог | НД | НД | Kwon et al., 2016 |
| 46 | KpN01 | NZ_CP012987 | 2013 | Канада | Человек | НД | моча | НД | НД | НД |
| 47 | KPNH27 | NZ_CP007731 | 2012 | США | Человек | НД | пах | НД | НД | НД |

| № п/п | Штамм | Номер доступа | Год выделения | Географический регион | Источник выделения | Диагноз | Образец | К-серотип | Сиквенс-тип | Ссылка |
|-------|------------|---------------|---------------|-----------------------|--------------------|-------------------------|----------------------|-----------|-------------|------------------------|
| 48 | KPNIH29 | NZ_CP009863 | 2013 | США | Человек | НД | периректальный мазок | НД | НД | НД |
| 49 | PMK1 | NZ_CP008929 | 2011 | Непал | Человек | НД | кровь | НД | НД | Stoesser et al., 2014 |
| 50 | RJF293 | NZ_CP014008 | 2014 | Китай | Человек | Рак желудка | кровь | НД | НД | НД |
| 51 | TGH8 | NZ_CP012743 | 2011 | Греция | Человек | Бактериальная инфекция | венозный катетер | НД | ST383 | Sabirova et al., 2016 |
| 52 | W14 | NZ_CP015753 | 2014 | Китай | Человек | НД | фекалии | НД | НД | НД |
| 53 | XH209 | NZ_CP009461 | 2013 | Китай | Человек | Пневмония | кровь | НД | ST17 | Hua et al., 2014 |
| 54 | blaNDM-1 | NZ_CP009114 | 2012 | США | Человек | Коронарный трансплантат | моча | НД | НД | van Duin et al., 2014 |
| 55 | PittNDM01 | NZ_CP006798 | НД | США | НД | НД | моча | НД | НД | Doi et al., 2014 |
| 56 | PB425 | FLVE00000000 | 2015 | Таиланд | Человек | НД | кровь | НД | НД | НД |
| 57 | B1647 | MCFO00000000 | 2015 | Индия | Человек | Бактериemia | кровь | НД | НД | НД |
| 58 | ATCC 13883 | JOOW01000000 | НД | НД | НД | НД | НД | К3 | НД | Daligault et al., 2014 |

Примечание – НД – нет данных; полужирным шрифтом выделены изучаемые нами штаммы, одинаковым цветом обозначены штаммы, располагающиеся на одной ветви филогенетического дерева; * - данные, полученные нами в ходе анализа геномов с помощью базы данных MLST PASTEUR