

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.842.16:579.253]:577.21.088

Алексеева А.Е.<sup>1</sup>, Бруснигина Н.Ф.<sup>1</sup>, Солнцев Л.А.<sup>1</sup>, Гординская Н.А.<sup>2</sup>

### МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ПРОДУЦИРУЮЩИХ БЕТА-ЛАКТАМАЗЫ РАСШИРЕННОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ

<sup>1</sup>ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр» Минздрава РФ, 603950, Нижний Новгород, Россия

С целью молекулярного типирования исследованы карбапенемустойчивые изоляты *K. pneumoniae* (4 штамма), выделенные из раневого отделяемого пациентов ожогового отделения. Проведено полногеномное секвенирование на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Установлена принадлежность трех изолятов *K. pneumoniae* к сиквенс-типу 395 — серотипу K2. Показано, что один изолят имеет уникальное сочетание сиквенс-типа 23 — серотипа K57. Определены генетические детерминанты основных факторов патогенности и антимикробной резистентности и установлена их локализация. Все штаммы характеризовались наличием генов, детерминирующих проявление инвазивных свойств (фимбрии I-го и 3-го типов, белки-сидерофоры), обуславливающих быстрое размножение в тканях человека. Гены, ответственные за синтез инвазивных и токсических веществ, таких как  $\alpha$ -гемолизин, энтерогемолизин, шигаподобных энтеротоксинов, цитотоксического некротизирующего фактора, а также проявление гипермукоидного фенотипа не обнаружены. В составе хромосомы установлены гены, кодирующие синтез  $\beta$ -лактамаз группы SHV-1, гены устойчивости к хинолонам и фосфомицину. В структуре мобилома выявлен набор генов резистентности, включающий детерминанты бета-лактамаз расширенного спектра действия CTX-M-15 и сериновых карбапенемаз OXA-48 (изоляты ST395), у штамма ST23 — только CTX-M-55. Ранее продуценты CTX-M-55 цефалоспоринов среди российских изолятов *Klebsiella pneumoniae* не выявлялись. У всех штаммов присутствуют гены  $\beta$ -лактамаз OXA-1 и TEM-1, гены устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам, фениколам, сульфаниламидам и триметоприму. Дополнительно у одного изолята выявлены гены, детерминирующие устойчивость к макролидам. Полученные результаты дают дополнительную информацию о молекулярно-генетической характеристике БЛРС-продуцирующих штаммов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих на территории Российской Федерации.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*; полногеномное секвенирование; сиквенс-типы; детерминанты патогенности и антибиотикорезистентности; OXA-48 карбапенемаз;  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра; мобилом.

**Для цитирования:** Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А., Гординская Н.А. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62(11): 699-704. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704>

Alekseeva A.E.<sup>1</sup>, Brusnigina N.F.<sup>1</sup>, Solntsev L.A.<sup>1</sup>, Gordinskaya N.A.<sup>2</sup>

THE MOLECULAR TYPING OF CLINICAL ISOLATES *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PRODUCING BETA-LACTAMASES OF EXTENDED SPECTER OF ACTION

<sup>1</sup>The Federal budget institution of science "The I.N. Blokhina Nizhny Novgorod research institute of epidemiology and microbiology" of the Rospotrebnadzor, 603950, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup>The Federal state budget scientific institution "The Privolzhskiy federal medical research center" of Minzdrav of Russia, 603950 Nizhny Novgorod, Russia

The carbapenem resistant isolates of *K. pneumoniae* (4 strains) isolated from wound discharge of patients of burn department were analyzed with the purpose of molecular typing. The whole genome sequencing was implemented using highly productive sequenator MiSeq (Illumina, USA). Belonging of three isolates *K. pneumoniae* to sequence-type 395-serotype K2 is established. It is demonstrated that one isolate has a unique combination of sequence-type 23-serotype K57. The genetic determinants of main factors of pathogenicity and anti-microbial resistance are established and their localization is determined. All strains were characterized by availability of genes determining manifestation of invasive characteristics (fimbriae type I and III, proteins-siderophors), conditioning fast propagation in human tissues. The genes responsible for synthesis of invasins and toxic substances such as  $\alpha$ -hemolysin, enterohemolysin, shiga-like enterotoxins, cytotoxic necrotic factor, and hypermucoid phenotype regulator were not detected. In the structure of chromosome genes coding synthesis of  $\beta$ -lactamases of group SHV-1 and genes of resistance to quinolones and phosphomycin were detected. In the structure of mobilome a set of genes of resistance was detected including

*determinants of  $\beta$ -lactamases of larger specter of action CTX-M-15 and serin carbapenemases OXA-48 (ST395 isolates), in strain ST23 - only CTX-M-55. Previously, producers of CTX-M-55 of cephalosporinases among Russian isolates of Klebsiella pneumoniae were not detected. In all strains genes of  $\beta$ -lactamases OXA-1 and TEM-1, genes of resistance to aminoglycoside, fluoroquinolone, phenicol, sulfonamides and trimethoprim are present. Additionally, in one isolate were detected genes determining resistance to macrolid. The obtained results provide supplementary information about molecular genetic characteristic of carbapenem resistant strains of Klebsiella pneumoniae circulating in the Russian Federation.*

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae; whole genome sequencing, sequence-type, determinants of pathogenicity and antibiotic resistance, OXA-48 carbapenemases, extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, mobilom.*

**For citation:** Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Solntsev L.A., Gordinskaya N.A. The molecular typing of clinical isolates Klebsiella pneumoniae producing beta-lactamases of extended specter of action. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (11): 699-704. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704>

**For correspondence:** Alekseeva A.E., candidate of biological sciences, senior researcher of the laboratory of metagenomics and molecular indication of pathogens of the Federal budget institution of science "The I.N. Blokhina Nizhny Novgorod research institute of epidemiology and microbiology". e-mail: [a.e.alexeeva79@mail.ru](mailto:a.e.alexeeva79@mail.ru)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 07.07.2017  
Accepted 17.07.2017

**Введение.** В настоящее время в этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, ведущую роль занимают условно-патогенные микроорганизмы. Особое место принадлежит энтеробактериям, таким как *Klebsiella pneumoniae*, включенным ВОЗ в список наиболее приоритетных для изучения патогенов [1]. Представители данного семейства обладают высокой скоростью приобретения плазмидно-кодируемых детерминант антимикробной резистентности и в первую очередь  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС). Распространение полирезистентных госпитальных штаммов *K. pneumoniae* приобретает эпидемический характер, при этом отмечается региональная особенность доминирования определённых геновариантов, отличающихся по характеру фенотипических проявлений [2, 3]. Так, в ряде стационаров США, Франции, Англии, Италии и других стран пандемическое распространение получила генетическая линия *K. pneumoniae*, относящаяся к клональной группе 258 [4, 5]. Показано, что в странах Прибалтийского региона и в Санкт-Петербурге доминируют штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие NDM-1 металло- $\beta$ -лактамазу и относящиеся к сиквенс-типу 340 [3, 6]. Исследования, проведенные в крупных городах России (Москва, Нижний Новгород, Екатеринбург, Ижевск, Смоленск, Казань и др.) позволили обнаружить штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие бета-лактамазы групп SHV, CTX-M, TEM, OXA, OXA-48, KPC [2]. Следует отметить, что информация о циркуляции определенных генотипов (сиквенс-типов) в большинстве регионов России практически отсутствует. Также недостаточно сведений о детальной молекулярно-генетической характеристике БЛРС-продуцирующих штаммов, в частности *K. pneumoniae*, включающей описание факторов патогенности и резистентности, анализ структуры мобилома. Последний играет ключевую роль в распространении генов, кодирующих БЛРС.

Наиболее полную информацию о структуре генома микроорганизма можно получить с использованием полногеномного секвенирования на высокопроизводительных секвенаторах.

Цель работы — молекулярное типирование штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов ожогового отделения.

**Материал и методы.** В работе исследовались четыре изолята *K. pneumoniae*, выделенные из раневого отделя-

емого пациентов ожогового отделения ФГБУ «Приволжского федерального медицинского исследовательского центра». Штаммы культивировали на колумбийском агаре с 5% бараньей кровью (Sredoff, СПб). Видовую идентификацию проводили на масс-спектрометре Autoflex (Bruker Daltonics). Антибиотикорезистентность оценивалась с помощью SENSI-LAtest (Erba Mannheim), к отдельным препаратам — на анализаторе VITEC-2 (BioMereux, Франция) и диско-диффузионным методом на агаре Мюллера—Хинтона (Oxoid, Англия) с использованием сенси-дисков и анализатора ADAGIO (BioRad, США) (табл. 1).

Полногеномное секвенирование карбапенемрезистентных штаммов *K. pneumoniae* проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). ДНК чистых культур *K. pneumoniae* выделяли с помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ЦНИИЭ, Россия). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT Sample Preparation kit (Illumina, США), секвенирование проводили с использованием набора MiSeq reagent kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов.

Выравнивание и сборку полученных коротких чтений относительно референса осуществляли с использованием встроенного в секвенатор программного обеспечения. Референсом являлась нуклеотидная последовательность штамма *K. pneumoniae* HS11286 (номер GenBank CP003200.1). С целью поиска нуклеотидных последовательностей, принадлежащих мобильным элементам (плазмиды, транспозоны, интроны и т. д.), дополнительно проводили сборку полученных чтений *de novo* с помощью программного обеспечения SPAdes версия 3.9.1 (<http://spades.bioinf.spbau.ru/release3.9.1/manual.html>).

NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)) и сервер Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>) использовали для аннотации нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов *K. pneumoniae*.

Определение сиквенс-типов, поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности осуществляли с использованием специализированной для *K. pneumoniae* базы данных Klebsiella Sequence Typing (<http://bigsd.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) и сервера Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Наличие интронов и IS-элементов определяли дополни-

тельно с помощью web-сервисов Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>) и IS-finder (<https://www-is.biotoul.fr/>).

**Результаты.** Основные результаты полногеномного секвенирования и аннотирования клебсиелл представлены в табл. 2.

Молекулярно-генетическое типирование *K. pneumoniae* включает выявление генетических детерминант факторов патогенности и антибиотикорезистентности, определение сиквенс-типа по схеме мультилокусного секвенирования (MLST), анализ генетической структуры мобильных элементов.

При типировании штаммов по схеме MLST [7] установлено, что штамм *K. pneumoniae* KP254 относится к сиквенс-типу (ST) 23, остальные три штамма — к сиквенс-типу 395. Серотиповую принадлежность проводили на основании анализа структуры гена *wzi*, входящего в состав кластера генов, кодирующих капсульные полисахариды К-антигенов [8]. Штамм *K. pneumoniae* KP254 принадлежит серотипу K57 (аллельный вариант гена *wzi-77*), другие три штамма — серотипу K2 (аллельный вариант гена *wzi-2*).

Известно, что штаммы, принадлежащие серотипам K2 и K57, проявляют инвазивные свойства [9, 10]. У всех исследуемых штаммов *K. pneumoniae* в структуре хромосомы обнаружены гены, ответственные за синтез фимбриальных адгезинов 1-го и 3-го типов (*fimA* и кластер генов *mrk* соответственно). Выявлены также гены *irp1* (штамм KP254), *irp2* (штаммы KP59, KP314, KP 1083), *fyuA* и группа генов *ybt*, контролирующая синтез, транспорт и регуляцию белка-сидерофора иерсинеобактина. Штамм *K. pneumoniae* KP254 обладает дополнительной системой транспорта железа в виде белка-сидерофора аэробактина (ген *iutA* и кластер генов *iuc*).

По данным литературы многие штаммы *K. pneumoniae* серотипов K2 и K57 имеют в структуре генома гены *rmpA* и *magA*, отвечающие за проявление гипермукоидного фенотипа [9, 10]. Однако эти гены у исследуемых нами штаммов не обнаружены ни в составе основного генома, ни мобилома. Не установлено наличие генов, ответственных за синтез инвазинов и токсических веществ, таких как  $\alpha$ -гемолизин, энтерогемолизин, шига-подобных энтеротоксинов, цитотоксического некротизирующего фактора.

Анализ резистома исследуемых штаммов показал, что в составе хромосом трех штаммов *K. pneumoniae* присутствует ген *bla<sub>SHV-II</sub>*, а у штамма KP254 — *bla<sub>SHV-I</sub>*. Оба аллельных варианта гена кодируют сериновые  $\beta$ -лактамазы, относящиеся согласно классификации Bush (2010) к функциональной группе 2b и обеспечивающие устойчивость к пенициллинам и некоторым цефалоспорином. У всех штаммов выявлены также гены устойчивости к хинолонам — гены эффлюксных насосов *oqxA*, *oqxB* и ген *fosA*, обуславливающий проявление устойчивости к фосфомицину.

В структуре ДНК мобильных элементов исследуемых штаммов выявлено значительное количество различных детерминант антибиотикорезистентности (табл. 3).

При типировании мобилома *in silico* с помощью сервера Plasmid Finder [10] выявлено наличие плазмид различных групп несовместимости. У штаммов *K. pneumoniae* KP59, KP314 и KP1083 обнаружены плазмиды групп несовместимости IncR и IncL/M. Штамм KP1083 дополнительно несёт плазмиды групп IncFIB, IncHI1B. У штамма KP254 выявлены плазмиды групп

IncFII и IncFIA(HI1) + IncFII(K). Наличие комбинированных плазмид, принадлежащих одновременно нескольким группам несовместимости, является характерной особенностью клинических изолятов [11].

Установлено, что детерминанты ОХА-48 карбапенемаз у всех этих штаммов *K. pneumoniae* ассоциированы с плазмидами группы несовместимости IncL/M.

Важным фактором, способствующим распространению антибиотикорезистентности, являются интегроны — генетические структуры, улавливающие и встраивающие гены, обеспечивающие их активное функционирование [11]. Из исследуемых нами культур только штамм KP1083 имеет интегрон первого класса, несущий генные кассеты, детерминирующие устойчивость к триметоприму и аминогликозидам.

С помощью сервера IS-finder выявлены последовательности инсерционных IS-элементов, относящихся к различным семействам. Так, в структуре хромосом определено 6 (3 штамма) и 5 (KP314) IS-элементов, а в мобиломе обнаружены 11 (KP314, KP59), 13 (KP254) и 22 (KP1083) инсерционные структуры. Установлено, что гены, кодирующие СТХ-М цефалоспорины, находятся в составе IS семейства Tn3, а ген *bla<sub>оха-48</sub>* карбапенемазы ассоциирован с мобильным элементом, относящимся к семейству IS4.

**Обсуждение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что три штамма имеют схожие значения длин основного генома, в структуре которого обнаружены последовательности двух профагов. У штамма *K. pneumoniae* KP254 последовательности профага отсутствуют, что объясняет более короткую длину генома. Существенные различия у исследуемых изолятов выявлены в размере мобилома: так, у двух штаммов он составил около 138 тыс. п.н., у штамма KP254 — более 300 тыс. п.н. и у штамма KP1083 — более 400 тыс. п.н.

Таблица 1

Антибиотикочувствительность штаммов *K. pneumoniae*

Антибиотик	Штамм <i>K. pneumoniae</i>			
	KP59	KP254	KP314	KP1083
Дорипенем	R	R	R	R
Имипенем	I	R	R	S
Меропенем	I	R	R	I
Эртапенем	R	R	R	S
Нетилмицин	S	I	S	S
Тигециклин	S	I	S	I
Тикарциллин/клавулановая кислота	R	S	R	R
Цефепим	R	S	R	R
Цефокситин	R	R	R	R
Цефоперазон/сульбактам	R	R	R	R
Цефотаксим	R	R	R	R
Цефтазидим	R	R	R	R
Цефтриаксон	R	R	R	R
Цефуросксим	R	R	R	R
Ципрофлоксацин	R	R	R	R

Примечание. R — устойчив; I — умеренно устойчив; S — чувствителен.

Таблица 2

**Общие результаты полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae***

Характеристика	Штамм <i>K. pneumoniae</i>			
	КР59	КР254	КР314	КР1083
Размер генома, п.н.	5 141 870	4 874 354	5 139 919	5 176 368
ГЦ, %	57,8	58	57,8	57,8
Количество тРНК	84	84	85	84
Количество рРНК	25	25	25	25
Количество белок-кодирующих последовательностей	5 118	4 802	5 139	5 177
Количество профагов	2	Нет	2	2
Размер мобилома, п.н.	137 828	138 593	312 272	433 633

При определении сиквенс-типа и серотиповой принадлежности установлено, что штамм *K. pneumoniae* КР254 относится к ST23 и серотипу К57. Согласно источникам литературы генетические линии *K. pneumoniae*, относящиеся к ST23, характеризуются глобальным распространением, наиболее часто обнаруживаются у пациентов с абсцессом печени, реже с пневмонией, и относятся к серотипу К1 [4, 5]. Штаммы *K. pneumoniae* серотипа К57 (определение сиквенс-типа не проводилось) впервые были выявлены у больных с абсцессом печени в Тайване [12]; описан случай обнаружения клебсиелл такого же серотипа и сиквенс-типа 185 у коров в США

[5]. Таким образом, мы описываем первый случай обнаружения *K. pneumoniae* ST23 серотипа К57.

Спектр выявленных детерминант патогенности обусловливает проявление исследуемыми штаммами исключительно инвазивных свойств, что является отличительным признаком от описанных ранее представителей серотипов К2 и К57.

Следует отметить сходство аллельного профиля детерминант антибиотикорезистентности трёх исследуемых штаммов *K. pneumoniae* (КР59, КР314, КР1083). Гены *bla<sub>OXA-1</sub>* и *bla<sub>TEM-1</sub>* кодируют бета-лактамазы широкого спектра и относятся к функциональной группе 2b. Такие гены, как *bla<sub>CTX-M-15</sub>* и *bla<sub>OXA-48</sub>*, кодируют СТХ-М-15 цефалоспорины (группа 2be) и ОХА-48-тип карбапенемазы (группа 2d) соответственно, которые относятся к бета-лактамазам расширенного спектра [12]. Аллотип *bla<sub>CTX-M-15</sub>* относится к эволюционной группе СТХ-М-1 цефалоспоринов, имеет глобальное распространение и является наиболее эпидемически значимым (выявляется в 87% случаев) [13, 14]. Исследования, проведённые российскими учеными, показали, что продуцентами ОХА-48 карбапенемаз на территории Российской Федерации являются штаммы клебсиелл, относящиеся к сиквенс-типам 395 и 147 [15, 16].

У штамма КР254 выявлены гены, кодирующие продукцию бета-лактамаз широкого спектра ОХА-1, LAP-2 (аналог TEM-1) и одного типа БЛРС — СТХ-М-55 цефалоспорины. Данные о циркуляции аллотипа *bla<sub>CTX-M-55</sub>* относящегося к группе СТХ-М-9, среди российских изолятов *K. pneumoniae* отсутствуют [13, 14, 17].

У всех исследуемых штаммов выявлены детерминанты резистентности к фторхинолонам: гены *qnrS* (обеспечивает защиту мишени) и *aac(6')-Ib-cr*, кодирующий аминогликозидацетилтрансферазу. Последняя

Таблица 3

**Детерминанты резистентности штаммов *K. pneumoniae*, локализованные на мобильных элементах**

Антибактериальные препараты	Детерминанты антибиотикорезистентности штаммов <i>K. pneumoniae</i>			
	КР59	КР254	КР314	КР1083
β-Лактамные				
цефалоспорины	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M-55</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>
оксациллины	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>
карбапенемы	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>		<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>
пенициллины и некоторые цефалоспорины	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>bla<sub>LAP-2</sub></i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>
Хинолоны/фторхинолоны	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Аминогликозиды	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
				<i>ant(2'')-Ia</i>
				<i>ant(3'')-Ia</i>
				<i>armA</i>
Тетрациклин	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	<i>tetA</i>
Фениколы	<i>catA1c</i>	<i>catA1</i>	<i>catA1</i>	<i>catA1</i>
	<i>atB3</i>	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>
Сульфониламиды	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
Триметоприм	<i>dfrA1</i>		<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i>
Макролиды				<i>msrE</i>
				<i>mphE</i>

является бифункциональным ферментом, модифицирующим также аминокликозидные антибиотики. У штамма *K.pneumoniae* KP1083 установлены дополнительные гены *ant(2»)-Ia* и *ant(3»)-Ia* -аминокликозидмодифицирующих ферментов аденилилтрансфераз, а также ген *armA*, кодирующий метилазу 16S рРНК.

Все изоляты обладали генами устойчивости к тетрациклину, фениколам и сульфаниламидам, у трёх выявлены гены резистентности к триметоприму, а у штамма *K.pneumoniae* KP1083 обнаружены также гены эффлюксного транспорта макролидов.

В целом набор маркёров антибиотикорезистентности представителей ST395 в нашем исследовании практически полностью совпадает с таковыми, описанными В.А. Агеевцем (2016), для штамма клебсиелл ST395, выделенного в Москве.

Следует отметить, что штамм *K.pneumoniae* KP1083, обладающий наибольшим набором детерминант устойчивости к различным классам антибиотиков, характеризуется высокой чувствительностью. Так, при наличии у него гена *bla<sub>OXA-48</sub>* наблюдается чувствительность к таким карбапенемам, как имипенем и эртапенем в отличие от штаммов KP59 и KP314. Несмотря на присутствие трёх детерминант устойчивости к аминокликозидам, штамм *K.pneumoniae* KP1083 сохраняет чувствительность к нетилмицину, как и другие три штамма, обладающие только одним геном резистентности. С другой стороны, штамм *K.pneumoniae* KP254, не имеющий гены карбапенемаз, является устойчивым к дорипенему и эртапенему. Таким образом, наличие (или отсутствие) генетических детерминант антимикробной резистентности не всегда соответствует фенотипическим свойствам патогена, обусловленным функционированием других механизмов, связанных с регуляцией экспрессии генов резистентности, наличием эффлюксных систем или снижением уровня проницаемости мембраны клеток бактерий [18].

**Заключение.** Впервые в Нижнем Новгороде проведено полногеномное секвенирование клинических изолятов БЛРС-продуцирующих штаммов *K.pneumoniae*, что позволило осуществить молекулярное типирование по широкому спектру маркеров.

Получены новые данные о представителях *K.pneumoniae*, относящихся к ST395 серотипа 2 и ST23 серотипа K57, отличающихся от известных ранее по патогенным свойствам. Установлено, что все исследуемые штаммы не являются высокопатогенными, поскольку у них отсутствуют гены, ответственные за синтез токсинов и проявление гипермукоидного фенотипа. Однако наличие генов, контролирующих синтез фимбриальных адгезинов, белка иерсинеобактина и аэробактина (*K.pneumoniae* KP254), обуславливает проявление инвазивных свойств штаммов клебсиелл, способствуя быстрому размножению в тканях человека. Впервые описан представитель *Klebsiella pneumoniae* ST23, принадлежащий серотипу K57.

У всех штаммов выявлены детерминанты множественной антибиотикоустойчивости, основной вклад в формирование резистентности вносят генетические структуры, находящиеся на мобильных элементах.

Все изоляты являются продуцентами бета-лактамаз групп SHV-1, TEM-1, OXA-1, CTX-M. У трёх изолятов, относящихся к ST395, выявлены гены *OXA-48* карбапенемаз.

Подобные исследования позволяют оценивать попу-

ляционную структуру БЛРС-продуцирующих патогенов на локальном и глобальном уровнях, способствуют пониманию механизмов распространения экстремально- и панрезистентных штаммов и осуществлению эффективного контроля за ними.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

---

#### ЛИТЕРАТУРА (пп.1, 4—13, 15, 16 см. REFERENCES)

2. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., исследовательская группа «МАРАФОН». Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011—2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16(4): 254—65.
3. Баранцевич Е.П., Баранцевич Н.Е., Шлякто Е.В. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K.pneumoniae* в Санкт-Петербурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016; 18(3): 196—200.
4. Фурсова Н.К., Прячук С.Д., Абаев И.В., Ковалев Ю.Н., Шишкова Н.А., Печерских Э.И. и др. Генетическое окружение генов *bla<sub>CTX-M</sub>*, локализованных на конъюгативных плаزمидов нозокомиальных изолятов *Enterobacteriaceae*, выделенных в России в 2003—2007 гг. *Антибиотики и химиотерапия*. 2010; 55: 3—10
17. Агеев В.А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных в Санкт-Петербурге. Дисс. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2016.
18. Егорова С.А., Кафтырева Л.А., Липская Л.В., Коноваленко И.Б., Пясетская М.Ф., Курчикова Т.С. и др. Штаммы энтеробактерий, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра и металло-β-лактамазу NDM-1, выделенные в стационарах в странах Балтийского региона. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(1): 29—36.
19. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии*. 2004; 44: 263—306.

---

#### REFERENCES

1. Tacconelli E., Magrini N. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Available at: [http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf) (accessed February 2017)
2. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Shek E.A., Dekhnic A.V. et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial Enterobacteriaceae Isolates in Russia: Results of National Multicenter Surveillance Study «MARATHON» 2011—2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16(4):254—65. (in Russian)
3. Barantsevich E.P., Barantsevich N.E., Shlyakhto E.V. Production of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Saint-Petersburg. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2016; 18(3):196—200. (in Russian)
4. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(11): 1812—20.
5. Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(27): 3574—81.
6. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzina Y.V.,

- Shlyapnikov S.A. et al. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2014; 44: 152—5.
7. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4178—82.
  8. Brisse S., Passet V., Haugaard A.B., Babosan, Kassis-Chikhani N., Struve C. et al. wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular typing for *Klebsiella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(12): 4073—8.
  9. Brisse S., Fevre C., Passet V., Issenhuth-Jeanjean S., Tournebize R. et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS ONE*. 2009; 4(3). Available at: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004982> (accessed 18 May 2017).
  10. Hsu C.R., Liao C.H., Lin T.L., Yang H.R., Yang F.L., Hsieh P.F. et al. Identification of a capsular variant and characterization of capsular acetylation in *Klebsiella pneumoniae* PLA-associated type K57. *Sci. Rep.* 2016; 6:31946. Available at: <https://www.nature.com/articles/srep31946> (accessed 15 May 2017).
  11. Bush K., Jacoby G.A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 969—76.
  12. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., Voldby Larsen M., Lund O., Villa L. et al. PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014; 58(7): 3895—903.
  13. Yu W.L., Ko W.L., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62: 1—6.
  14. Fursova N.K., Pryamchuk S.D., Abaev I.V., Kovalev Yu.N., Shishkova N.A., Pecherskikh E.I. et al. Genetic Environments of bla<sub>CTX-M</sub> Genes Located on Conjugative Plasmids of *Enterobacteriaceae* Nosocomial Isolates Collected in Russia within 2003—2007. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2010; 55: 3—10. (in Russian).
  15. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3724—32.
  16. Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N. et al. The spread of bla<sub>OXA-48</sub> and bla<sub>OXA-244</sub> carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2015; 14: 46. Available at: <https://annclinmicrob.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12941-015-0108-y> (accessed 15 May 2017).
  17. Ageevets V.A. Molecular characteristics of carbapenemases producers of the *Enterobacteriaceae* family isolated in St. Petersburg [Molekulyarnaya kharakteristika producentov karbapenemaz semejstva *Enterobacteriaceae*, vydelennyh v Sankt-Peterburge]. Diss. St. Petersburg; 2016. (in Russian)
  18. Egorova S.A., Kaftyreva L.A., Lipskaya L.V., Konovalenko I.B., Pyasetskaya M.F., Kurchikova T.S. et al. Enterobacteriaceae, producing ESBLs and metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1, isolated in hospitals of Baltic region countries. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3(1): 29—36. (in Russian)
  19. Sidorenko S.V., Tishkov V.I. Molecular basis of antibiotic resistance. *Uspekhi biologicheskoi khimii*. 2004; 44: 263—306. (in Russian)

Поступила 07.07.17

Принята к печати 17.07.17

## Уважаемые читатели!

На сайте Научной Электронной Библиотеки  
**www.elibrary.ru** можно подписаться на электронную версию  
нашего журнала и других журналов издательства «Медицина» на 2018 год.

Архив журналов Издательства «Медицина»  
находится в открытом (бесплатном) доступе на сайтах  
Научной электронной библиотеки **www.elibrary.ru**  
и Киберленинки **www.cyberleninka.ru**