

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ЗДОРОВЬЯ ДЕТЕЙ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Шамина Ольга Вячеславовна

**Молекулярная характеристика и механизмы устойчивости к колистину
карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae***

03.02.03 – Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
профессор РАН,
доктор медицинских наук
Маянский Н.А.

Москва - 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	18
Глава 1. Механизмы формирования устойчивости к антибиотикам и молекулярная эпидемиология <i>Klebsiella pneumoniae</i> (обзор литературы).....	18
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> : общие сведения.....	18
1.2. Резистентность к β -лактамным антибиотикам.....	21
1.3. Особенности формирования резистентности к колистину.....	24
1.3.1. Механизм действия колистина.....	24
1.3.2. Хромосомные мутации.....	25
1.3.3. Плазмидопосредствованная резистентность к колистину.....	28
1.3.4. Другие механизмы резистентности к колистину.....	28
1.4. Бактериальный фитнес.....	29
1.5. Роль мобильных генетических элементов.....	29
1.6. Роль поринов в формировании антибиотикорезистентности.....	31
1.7. Молекулярная эпидемиология <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	34
2.1. Изоляты микроорганизмов.....	34
2.2. Бактериологические методы.....	34
2.2.1. Видовая идентификация бактерий.....	34
2.2.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам...	35
2.2.3. Сравнение трех методов определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) колистина.....	35
2.2.4. Гетерорезистентность <i>Klebsiella pneumoniae</i> к колистину.....	37
2.3. Фитнес бактерий	38
2.4. Молекулярно-генетические методы исследования.....	40
2.4.1. Выделение ДНК.....	40

2.4.2. Мультилокусное секвенирование-типирование штаммов.....	40
2.4.3. Выявление генов резистентности к β -лактамным антибиотикам методом ПЦР с электрофоретической детекцией.....	41
2.4.4. Выявление генов резистентности к карбапенемным антибиотикам методом ПЦР в режиме реального времени.....	44
2.4.5. Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов резистентности к β -лактамным антибиотикам.....	45
2.4.6. Выявление механизмов резистентности к колистину.....	47
2.4.7. Анализ генов пориновых белков <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
2.5. Полногеномное секвенирование изолятов <i>Klebsiella pneumoniae</i> ...	51
2.6. Статистические методы.....	52
Глава 3. Молекулярная эпидемиология и механизмы устойчивости карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i> к β -лактамным антибиотикам.....	53
3.1. Профиль чувствительности к антибиотикам карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54
3.2. Молекулярная эпидемиология карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
3.3. Молекулярные механизмы резистентности карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i> к β -лактамным антибиотикам	56
Глава 4. Механизмы устойчивости к колистину карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
4.1. Сравнение лабораторных методов определения устойчивости к колистину	61
4.2 Молекулярные механизмы устойчивости к колистину карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i> : новый миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами MITEKpn1.....	63

4.3. Особенности геномов карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i> , устойчивых и чувствительных к колистину.....	67
4.4. Гетерорезистентность к колистину карбапенемрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i>	72
Глава 5. Бактериальный фитнес колистинрезистентных <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	81
ВЫВОДЫ.....	87
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	88
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	89
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91
Приложение А.....	113

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы диссертационного исследования

Klebsiella pneumoniae является грамотрицательной бактерией, принадлежащей семейству *Enterobacteriaceae*, которая колонизирует многие ниши организма человека, включая дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт и кожу. Медицинское значение *K. pneumoniae* обусловлено ее свойствами оппортунистического патогена, способного вызывать тяжелые инфекции у отдельных категорий пациентов, в первую очередь у иммунокомпрометированных лиц. К числу основных инфекционных процессов, ассоциированных с *K. pneumoniae*, относят инфекции мочевыводящих путей, мягких тканей и раневые процессы, а также пневмонию. *K. pneumoniae* является одной из наиболее частых причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в связи с чем она была включена в группу шести наиболее значимых и опасных госпитальных патогенов, объединенных термином ESKAPE, под буквой «К» [15, 16, 19, 131].

Особую обеспокоенность вызывает появление и глобальное распространение отдельных клонов *K. pneumoniae* высокого риска, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ); госпитальная циркуляция таких клонов может сопровождаться крупными вспышками жизнеугрожающих ИСМП с высокой летальностью [69]. В первую очередь это относится к карбапенемрезистентным (Карба-Р) *K. pneumoniae*, поскольку устойчивость к карбапенемам в большинстве случаев сочетается с резистентностью к другим антимикробным препаратам, что существенно ограничивает возможности терапии. Мультилокусное сиквенс-типирование (МЛСТ) показало, что карбапенемрезистентность может быть свойственна многим генотипам (т.е. сиквенс-типам - ST) *K. pneumoniae*, однако большинство Карба-Р изолятов принадлежит к узкому кругу успешных клонов, которые доминируют в структуре госпитальных популяций повсеместно [90, 156]. В этих

клонах устойчивость к карбапенемам обычно обеспечивается путем продукции различных вариантов ферментов, гидролизующих антибиотик (карбапенемаз), которые кодируются плазмидными генами. Долгое время основным Карба-Р клоном *K. pneumoniae* с МЛУ признавали ST258-клон, продуцирующий карбапенемазу KPC [41]. В настоящее время к числу глобально диссеминированных относятся и другие МЛУ-клоны, включая ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST395 [78, 92, 156], а также ST307, который приобрел значимость сравнительно недавно [155]. Для перечисленных клонов характерно носительство разнообразных карбапенемаз, в том числе KPC, OXA-48, NDM-1 и VIM-1 [156]. Кроме того, глобальный клон ST23 включает гипервирулентные изоляты *K. pneumoniae* [69].

Проблема Карба-Р *K. pneumoniae* остро стоит и в РФ. Так, по данным исследования «МАРАФОН» (2013-2014 гг.), до 14,5% госпитальных штаммов *K. pneumoniae* являются продуцентами карбапенемаз [16], среди которых описаны OXA-48, NDM-1 и KPC-2 [17, 21, 66, 89]. В то же время, популяционная структура Карба-Р *K. pneumoniae* в нашей стране остается изученной недостаточно.

МЛУ, свойственная Карба-Р *K. pneumoniae*, серьезно ограничивает возможности антимикробной терапии. Одним из препаратов, сохраняющих активность в отношении Карба-Р грамотрицательных организмов, является поликатионный антибиотик колистин (полимиксин Е), бактериостатический эффект которого связан с воздействием на липополисахарид (ЛПС) клеточной стенки бактерий [22, 125]. На протяжении многих лет колистин оставался препаратом резерва и широко не применялся из-за своей нефротоксичности и наличия более эффективных альтернативных препаратов, но в последние годы в связи с распространением устойчивости к карбапенемам он перешел в разряд препаратов «последней надежды» для лечения инфекций, вызванных Карба-Р бактериями [125]. Возросшее вслед за этим использование колистина в клинике привело к появлению и распространению колистинрезистентности [22, 90], которая может существенно снижать эффективность антимикробной терапии и

проявляться повышением смертности пациентов, инфицированных колистинрезистентными (Кол-Р) *K. pneumoniae* [133].

Устойчивость к колистину реализуется посредством нескольких механизмов. Во-первых, это внутренние (кодируемые хромосомой) повреждения двухкомпонентной системы модификации ЛПС PhoPQ/PmrAB и ее регулятора MgrB. Во-вторых, это плазмидзависимые механизмы изменения ЛПС при участии *mcr*-подобных генов [22, 125]. Хромосомные и плазмидные механизмы приводят к похожим изменениям структуры ЛПС-мишени колистина, снижая связывание антибиотика с клеточной стенкой бактерий [125]. Резистентность к колистину у Карба-Р *K. pneumoniae* чаще всего связывают с инактивацией гена *mgrB*, связанной с различными хромосомными перестройками [38, 124, 125]. К ним относят повреждение *mgrB* несколькими типами вставочных элементов (insertion sequence, IS), в первую очередь IS1- и IS5-подобными элементами (например, ISKpn14 и ISKpn26 соответственно), а также точечные мутации и делеции локуса *mgrB* разных размеров [31, 38, 115, 124, 125]. Исследования механизмов устойчивости к колистину Карба-Р *K. pneumoniae* в нашей стране не проводились.

Мутации, приводящие к развитию устойчивости, дают бактериям преимущество над чувствительными штаммами в присутствии антибиотика, однако формирование и поддержание резистентности может быть сопряжено с определенными биологическими затратами. Они могут выражаться в снижении темпов роста и уменьшении конкурентоспособности (т.е. уровня приспособленности к жизнедеятельности, который обозначается термином «бактериальный фитнес» [73, 126, 147]) по сравнению с чувствительными штаммами в отсутствие селективного давления антибиотика [30, 44]. С учетом того, что устойчивость к колистину связана с модификацией важнейшего компонента клеточной стенки бактерий – ЛПС, колистинрезистентность может быть сопряжена со снижением бактериального фитнеса, в связи с чем его оценка в популяции Кол-Р *K. pneumoniae* позволит углубить представления о влиянии резистентности на физиологию бактерий.

Лабораторное определение чувствительности к колистину имеет ряд сложностей, связанных с катионными свойствами молекулы и ее плохой диффузией в агар [125]. В связи с этим чувствительность к колистину рекомендуют тестировать эталонным методом микроразведений (ММР) в бульоне, определяя минимальную подавляющую концентрацию (МПК) [6, 56]. Однако из-за трудоемкости ММР в повседневной лабораторной практике нередко используют альтернативные методы, такие как диско-диффузионный, автоматизированный (бактериологические анализаторы) и эпсилOMETрический (Е-тесты), что может приводить к методологическим ошибкам при определении чувствительности к колистину и, как следствие, к назначению неадекватной антимикробной терапии. Назначение неадекватно низких концентраций колистина может индуцировать переход чувствительных субпопуляций бактерий в категорию резистентных [125]. В связи с этим валидация методов определения чувствительности к колистину является одной из актуальных задач клинической микробиологии [104, 128].

Таким образом, экспансия резистентных форм *K. pneumoniae* является серьезной проблемой современного здравоохранения. Мониторинг клональной структуры бактериальной популяции Карба-Р *K. pneumoniae*, получение новых данных о молекулярных механизмах антибиотикорезистентности и ее физиологических аспектах станут важным вкладом в формирование базы знаний для планирования стратегии сдерживания распространения антибиотикорезистентности и ее преодоления.

Степень разработанности темы диссертационного исследования

Возбудители ИСМП в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) с высокой интенсивностью формируют устойчивость к различным группам антибиотиков. Активное распространение мобильных детерминант резистентности (например, гены β -лактамаз, *mcr-1* и др.) или появление хромосомных мутаций увеличивает долю резистентных штаммов по всему миру,

и в основном они ассоциированы с глобально распространенными генетическими линиями, характерными для определенного региона.

Актуальность изучения *K. pneumoniae* подчеркивается большим числом публикаций, представленных на web-ресурсе PubMed. Ежегодно по этой теме публикуется более 1000 научных работ, в которых анализируется динамика устойчивости *K. pneumoniae* к антибиотикам, принадлежность к генетическим линиям, исследуются генетические детерминанты резистентности, вирулентности, а также изучается генетическое разнообразие изолятов *K. pneumoniae* с помощью секвенирования нового поколения.

В российской литературе описаны многоцентровые исследования по изучению *K. pneumoniae*, выделенных у взрослых пациентов [3, 15–17, 67], однако мало сведений о распространенности *K. pneumoniae* в педиатрических учреждениях, особенно в ОРИТ. Важность знаний об уровне резистентности, а также определение молекулярных механизмов резистентности для детских учреждений диктуется ограниченным спектром антимикробных препаратов, разрешенных для применения у данной категории пациентов.

Колистин является антибиотиком последней линии для лечения инфекций, вызванных Карба-Р *K. pneumoniae*. По всему миру вместе с ростом резистентности к данному антимикробному препарату растет и интерес к данной теме [15, 16, 22, 105]. На сегодняшний день в литературе описаны молекулярные механизмы, лежащие в основе появления устойчивости к колистину [37, 125]. Однако в России данные по молекулярной эпидемиологии резистентности к колистину ограничены. Также в российской литературе недостаточно сведений о влиянии различных молекулярных механизмов резистентности к колистину на кинетику роста и конкурентоспособность *K. pneumoniae*.

Цель исследования

Цель исследования – охарактеризовать популяционную структуру и молекулярно-генетические механизмы устойчивости *K. pneumoniae* к карбапенемам и колистину, а также оценить бактериальный фитнес колистинрезистентных форм бактерий.

Задачи исследования

1. Охарактеризовать популяционную структуру карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.
2. Расшифровать молекулярно-генетические механизмы устойчивости к карбапенемам в популяции карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.
3. Провести сравнение фенотипических методов определения минимальных подавляющих концентраций колистина и описать распространенность устойчивости к колистину среди карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.
4. Осуществить поиск механизмов формирования резистентности к колистину карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.
5. Оценить наличие взаимосвязи между устойчивостью к колистину и бактериальным фитнесом у карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.

Научная новизна

Получены новые данные о популяционной структуре карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*. Показано доминирование пяти глобальных клонов высокого эпидемического риска, относящихся к ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395 и обладающих высоким уровнем устойчивости к колистину (45%).

Впервые установлено, что группа ОХА-48-подобных карбапенемаз в популяции карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* представлена карбапенемазами типа ОХА-48 (89%) и ОХА-244 (11%).

Анализ механизмов устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* впервые показал, что наиболее характерным является повреждение гена *mcrB* вставочными элементами.

В геноме карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* описан новый, ранее неизвестный миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами *MITEKpn1*, который способен встраиваться различные участки бактериальной хромосомы.

Анализ геномов, проведенный при помощи секвенирования нового поколения, позволил выявить дополнительные детерминанты резистентности и вирулентности у карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.

Впервые проведена оценка влияния устойчивости к колистину на бактериальный фитнес карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* одного сиквенс-типа и продемонстрировано снижение конкурентоспособности резистентных изолятов по сравнению с чувствительными.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования позволили уточнить тип ряда карбапенемаз *K. pneumoniae*, включая ОХА-48, ОХА-244, NDM-1, KPC-3. Эти знания будут востребованы для определения потенциальных мишеней при разработке новых способов преодоления антибиотикорезистентности.

Полученные данные о молекулярной эпидемиологии *K. pneumoniae* формируют представления о доминировании определенных генетических линий в г. Москве и свидетельствуют о наличии генотип-ассоциированных механизмов устойчивости к карбапенемам.

Проведенное сравнение методов тестирования чувствительности к колистину доказало преимущества использования метода микроразведения в

бульоне для определения МПК колистина, что является важной информацией для лабораторной практики.

Получено представление о хромосомных мутациях в генах *mgrB*, *pmrA* и *pmrB*, влияющих на возникновение устойчивости к колистину *K. pneumoniae*. Определены вставочные элементы, повреждающие ген *mgrB*, и выявлены нуклеотидные позиции, в которых преимущественно осуществляется внедрение этих элементов. Эти данные улучшают понимание теоретических аспектов развития колистинрезистентности в бактериальной популяции.

Нуклеотидная последовательность нового вставочного элемента MITEKpn1, впервые обнаруженного в ходе исследования, была внесена в международную базу данных GenBank под номером MK241841 и в международную базу данных ISfinder под номером CP018364. Внесенная последовательность стала референсной для поиска аналогичных вставочных элементов.

Проведен генетический анализ карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* с использованием секвенирования нового поколения и охарактеризован спектр детерминант резистентности для широкой панели антимикробных препаратов. Описаны типичные для данной популяции *K. pneumoniae* факторы вирулентности.

Была выявлена взаимосвязь между устойчивостью к колистину и снижением конкурентоспособности колистинрезистентных *K. pneumoniae*. Полученные результаты дополняют базу знаний о физиологии бактерий и биологических затратах при формировании резистентности, которые могут быть использованы при разработке новых подходов к управлению устойчивостью к антимикробным препаратам.

Сформирована коллекция клинических штаммов *K. pneumoniae*, сведения о которой занесены в электронную базу данных, содержащую информацию о спектре антибиотикорезистентности, носительстве карбапенемаз, генотипе, наличии вставочных элементов. Банк ДНК данных штаммов может быть использован в дальнейших сравнительных исследованиях, посвященных эволюции карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*.

Результаты исследований и разработок внедрены в научно-исследовательскую работу лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии и лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, а также в учебной программе кафедры общей патологии медико-биологического факультета ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Методология и методы исследования

Методология спланирована в соответствии с целью диссертационного исследования. Объектами исследования являлись штаммы *K. pneumoniae*, резистентные к карбапенемам. Минимальные подавляющие концентрации карбапенемов определяли при помощи метода Е-тестов. Наличие генов карбапенемаз определяли полимеразной цепной реакции в реальном времени. Тип карбапенемаз определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера.

Гены поринов клеточной мембраны *K. pneumoniae* идентифицировали полимеразной цепной реакцией, мутации в генах определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера.

Минимальные подавляющие концентрации колистина определяли при помощи метода микроразведений в бульоне. Наличие генов *mcrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* определяли полимеразной цепной реакцией, мутации в генах определяли при помощи секвенирования по методу Сэнгера.

Статистическую обработку данных проводили при помощи программы SPSS 20.0 (SPSS Statistics) и Microsoft Excel.

Анализ научной литературы, посвященной проблеме, проведен на основе формально-логических методов исследования. Планирование и проведение исследований, направленных на решение поставленных задач, осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов.

Положения, выносимые на защиту

1. Карбапенемрезистентные *K. pneumoniae* представлены в основном глобальными клонами высокого эпидемического риска с МЛУ, относящимися к ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395.
2. Устойчивость к карбапенемам у карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* преимущественно обусловлена выработкой ОХА-48-подобных карбапенемаз ОХА-48 и ОХА-244.
3. Наиболее распространенным механизмом резистентности *K. pneumoniae* к колистину являются хромосомные мутации (наличие вставочных элементов) в гене *mcrB*.
4. У *K. pneumoniae*, резистентных к колистину, снижена конкурентоспособность по сравнению с чувствительными изолятами.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации, заключалось в проведении молекулярно-генетической части исследования (выделение ДНК, постановка ПЦР, учет и интерпретация результатов ПЦР, подготовка образцов для секвенирования, интерпретация результатов секвенирования).

Микробиологическая часть исследования (культуральный посев, идентификация микроорганизмов, определение резистентности антимикробных препаратов методом Е-тестов, с помощью бактериологического анализатора VITEK 2 Compact, ММР в бульоне) осуществлялась соискателем в лаборатории микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ совместно с к.м.н. Крыжановской О.А. и с зав. лабораторией микробиологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» д.м.н. Лазаревой А.В.

Мультилокусное сиквес-типирование культур *K. pneumoniae* и секвенирование генов по методу Сэнгера проводилось соискателем совместно с

к.б.н. Пушковым А.А. в лаборатории молекулярной генетики и клеточной биологии и к.м.н. Алябьевой Н.М. в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ.

Полногеномное секвенирование проводилось соискателем совместно с н.с. лаборатории к.б.н. Михайловой Ю.В. и заведующим отделом молекулярной диагностики и эпидемиологии к.б.н. Шагиным Д.А. (нынешняя должность – директор Российской детской клинической больницы ФГАУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России) в ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия.

Исследование бактериального фитнеса (построение кривых роста и изучение конкурентоспособности колистинрезистентных штаммов) осуществлялась соискателем совместно с д.м.н., профессором РАН заведующим центром лабораторной диагностики РДКБ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Маянским Н.А. и с к.м.н. Крыжановской О.А. в лаборатории микробиологии и в лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований внедрены в диагностическую работу подразделений ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России, «НИИ неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы, ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности результатов работы свидетельствует использование современных, сертифицированных методов исследования в соответствии с

международными рекомендациями, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью. Достаточный объем исследования позволил корректно провести статистический анализ данных. Комплексное молекулярно-генетическое исследование позволило получить сопоставимые результаты с традиционными микробиологическими методами, что свидетельствует о достоверности полученных результатов. Всё оборудование, на котором проводились исследования, регулярно проходило метрологическую поверку.

Диссертация апробирована на заседании лабораторного отдела Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол № 1 от «13 » марта 2020 года).

Материалы диссертации были представлены на 28-ом (Испания, Мадрид, 2018) и 29-ом (Нидерланды, Амстердам, 2019) Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (ECCMID); на XIX, XX и XXI Международных конгрессах по антимикробной терапии и клинической микробиологии МАКМАХ/ESCMID, Москва, 2017, 2018 и 2019; на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Осенние Филатовские чтения - важные вопросы детского здоровья" (Пенза, 2019); на семинаре для микробиологов «Антибиотикорезистентность: устойчивость к колистину» ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Лабораторный отдел НИИ СП им. Н.В. Склифосовского, Москва, 2019); на заседании Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Российская детская клиническая больница ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, 2019).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 03.02.03 – «микробиология», области исследований «Морфология, физиология, биохимия и генетика микроорганизмов».

Публикации

Основные результаты проведенного диссертационного исследования опубликованы в 4 оригинальных статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК, 3 из которых реферируются базой данных Scopus, один - базой данных Web of Science. Одна из статей опубликована в журнале, входящем в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору SJR.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и состоит из введения, основной части (обзора литературы, описания материалов и методов исследования и трех глав, отражающих результаты собственных исследований), заключения, выводов, практических рекомендаций, описания перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 20 таблицами и 12 рисунками. Библиографический указатель включает 159 источников литературы, в том числе 19 ссылок на отечественных авторов и 140 ссылок на зарубежных авторов. Диссертацию сопровождает одно приложение.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1. Механизмы формирования устойчивости к антибиотикам и молекулярная эпидемиология *Klebsiella pneumoniae* (обзор литературы)

1.1. *Klebsiella pneumoniae*: общие сведения

Впервые бактерии рода *Klebsiella* обнаружил немецкий исследователь Edwin Klebs в 1875 году, в честь которого они и получили свое название. *Klebsiella* представляют собой прямые неподвижные палочки неровной овальной формы размерами $0,6-6 \times 0,3-1$ мкм. В мазках бактериальные клетки расположены одиночно, парами или короткими цепочками [8]. Основную роль в патологии человека играет вид *K. pneumoniae*.

K. pneumoniae является условно-патогенным микроорганизмом сапрофитной флоры желудочно-кишечного тракта человека. Некоторые штаммы *K. pneumoniae* являются оппортунистическими патогенами, вызывающими тяжелые инфекционные процессы, такие как пневмония, инфекции мочевыводящих путей (ИМП) и инфекции кровотока, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом [121]. Недавнее появление и распространение гипервирулентных и антибиотикорезистентных штаммов расширило спектр людей, подверженных инфекции *K. pneumoniae*. Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* способны инфицировать здоровых людей, вызывая гнойный абсцесс печени, эндофтальмит, менингит и другие инфекционные процессы [103]. У антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae* в геноме могут быть включены гены резистентности, что делает их устойчивыми к этиотропной терапии [29].

Одним из наиболее значимых факторов вирулентности *K. pneumoniae* является капсула. Она представляет собой полисахаридный матрикс, защищающий бактериальную клетку от действия иммунной системы: она обладает антифагоцитарной активностью, защищает бактерию от взаимодействия с антителами, факторами комплемента. Бескапсульные штаммы *K. pneumoniae*

гораздо менее вирулентны, чем изогенные капсульные изоляты. Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие более толстую капсулу, относят к гипермукоидным. Такая капсула вносит значительный вклад в патогенность *K. pneumoniae* [116]. Полисахариды *K. pneumoniae* представлены О-антигенами (ЛПС) и К-антигенами (капсульный полисахарид) [64]. В настоящее время описано 9 вариантов О-антигена и 77 вариантов К-антигена [64, 116, 157].

ЛПС, или эндотоксин, является структурным компонентом клеточной стенки грамотрицательных бактерий, с воздействием которого связывают клинические проявления инфекционной интоксикации [5]. Молекула ЛПС обычно состоит из гидрофобного бифосфорилированного липида (липид А) и гидрофильного полисахарида. Полисахаридный компонент состоит из двух частей: олигосахаридного ядра и полисахаридных повторяющихся цепей, формирующих О-антиген. Ядро ковалентно связано с липидом А.

ЛПС обеспечивает структурную целостность бактериальной клетки и защищает мембрану от агрессивных воздействий окружающей среды. Отрицательный заряд ЛПС повышает общий отрицательный заряд бактерии и стабилизирует её мембрану. *K. pneumoniae* демонстрирует выраженную вариабельность в молекулярной структуре липида А. Его модификации возникают в результате хромосомных мутаций, например, в генах двухкомпонентной сигнальной системы PmrAB/PhoPQ, или плазмидопосредованных мутаций, например, в результате приобретения гена *mcr-1*. Поскольку действие многих антибактериальных препаратов, в частности, колистина, направлено на повреждение липида А, появление его модифицированного варианта может приводить к резистентности [5, 125].

К адгезивным структурам бактериальной клетки *K. pneumoniae* относятся фимбрии, или пили, 1 и 3 типа. Фимбрии обеспечивают наибольший вклад в адгезию бактерии к тканям человека и абиотическим поверхностям, а также способствуют образованию биопленок. Фимбрии типа 1 представляют собой тонкие нитевидные структуры на поверхности клетки. Они экспрессируются у 90% изолятов *K. pneumoniae* и состоят из основной большой субъединицы FimA,

адгезивной субъединицы FimH, минорных структурных единиц FimF и FimG, шаперона FimC, транспортного белка FimD и субъединицы FimI, необходимой для укладки белков фимбрий 1 типа. *K. pneumoniae* в составе кластера имеет ген *fimK*, точная функция которого пока неизвестна [134, 145].

Фимбрии типа 3 представляют собой спиралевидные структуры. У *K. pneumoniae* они кодируются кластером генов *mrkABCD*. Основная часть фимбрии MrkA имеет на конце адгезин MrkD. Субъединицы MrkB, MrkC и MrkE учувствуют в сборке и регуляции экспрессии фимбрий типа 3, а субъединица MrkF участвует в стабилизации их поверхностной структуры.

Фимбрии типа 1 и 3 играют важную роль в колонизации мочевыводящего тракта, поэтому экспрессируются большинством *K. pneumoniae*, инфицирующих мочевыделительную систему [45]. Фимбрии *K. pneumoniae* участвуют в формировании биопленки и прикреплению к абиотическим поверхностям, таким как катетеры. Бактерии в биопленках обычно становятся устойчивыми к антибиотикам за счет образования плотной тримерной структуры, что дает им возможность долгое время персистировать у пациентов [145].

У здоровых людей фимбрии *K. pneumoniae* частично могут взаимодействовать с клетками иммунной системы, в частности, связываться с фагоцитами. В результате запускается процесс фагоцитоза, который приводит к гибели бактериальной клетки [24, 68].

Сидерофоры также являются важным фактором вирулентности *K. pneumoniae*. Трехвалентное железо является необходимым ресурсом для метаболизма бактериальной клетки. Обычно в плазме крови содержится малое количество свободного железа, поскольку оно связано с молекулами-переносчиками, такими как трансферрин, в связи с этим сидерофоры, обладающие более высоким сродством к железу, чем белки-транспортировщики хозяина, служат важным механизмом, обеспечивающим потребность бактерий в железе. Высокая экспрессия сидерофоров бактериальной клеткой повышает ее колонизационный потенциал [25].

K. pneumoniae экспрессирует несколько сидерофоров: энтеробактин, иерсиниабактин, сальмохелин и аэробактин. Самое низкое сродство к железу имеет аэробактин, а самое высокое – энтеробактин [34, 120].

Энтеробактин синтезируется практически всеми классическими и гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*. Он нейтрализуется липокалином-2, продуцируемым многими клетками, в том числе нейтрофилами, во время инфекций. Липокалин-2 тормозит рост бактерии, нейтрализуя сидерофор и угнетая возможность связывать железо [85, 88].

Иерсиниабактин был первоначально обнаружен у представителей рода *Yersinia*, но с тех пор был обнаружен и у других бактерий. Иерсиниабактин экспрессируется у 18% классических и 90% гипервирулентных изолятов *K. pneumoniae*. В сочетании с энтеробактином он часто обнаруживается при инфекциях дыхательных путей, и его активность не ингибируется липокалином-2 [60].

Сальмохелин является гликозилированной формой энтеробактина. Эта модификация не позволяет липокалину-2 нейтрализовать сальмохелин [62, 63].

Аэробактин редко синтезируется классическими штаммами *K. pneumoniae*. В 93-100% случаев аэробактин синтезируется гипервирулентными изолятами, а его наличие всегда сочетается с гиперпродукцией капсулы [159].

1.2. Резистентность к β -лактамным антибиотикам

β -лактамные антибиотики (пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы) составляют основу этиотропной терапии большинства инфекционных болезней, вызванных *K. pneumoniae* [13, 102], однако формирование и распространение устойчивости ограничивает возможности их использования. Антимикробную активность этих препаратов определяет наличие β -лактамного кольца, соответственно одним из наиболее распространенных механизмов резистентности к β -лактамным антибиотикам является продукция

ферментов (β -лактамазы), разрушающих β -лактамное кольцо. Продукция β -лактамаз регулируется на генетическом уровне.

По молекулярной структуре первичной аминокислотной последовательности и структуре активного центра β -лактамазы можно разделить на четыре молекулярных класса – А, В, С и D (таблица 1.1) [35]. Ферменты классов А, С и D являются гидролазами серинового типа, в активном центре которых находится аминокислота серин, а ферменты класса В являются металлосодержащими гидролазами, в активном центре которых содержатся один или два атома цинка. Функциональная классификация основана на субстратной специфичности (способность к преимущественному гидролизу определенных β -лактамов) и чувствительности к действию ингибиторов. Выделяют 3 функциональные группы и 16 подгрупп β -лактамаз [35].

Таблица 1.1

Классификация β -лактамаз [23, 35]

Тип	Молекулярный класс	Функциональная группа	Примеры β -лактамаз
Сериновые β -лактамазы	А	2a, 2b, 2e, 2br, 2be, 2ber, 2f	TEM, SHV, CTX-M, KPC
	С	1	AmpC
	D	2d, 2de, 2df	OXA
Металлосодържащие β -лактамазы	В	3	VIM, IMP, NDM

Карбапенемаза КРС (*Klebsiella pneumoniae* Carbaenemase) относится к β -лактамазам класса А. КРС наиболее активно гидролизует пенициллины, цефалоспорины I-V поколений, карбапенемы, азтреонам, поэтому терапевтические возможности лечения инфекций, связанных с КРС-несущими возбудителями, очень ограничены. Впервые КРС-продуцирующая *K. pneumoniae* была обнаружена в США, штате Нью-Йорк [149]. До 2005 циркуляция *K.*

pneumoniae, продуцирующих КРС, была ограничена восточной частью США [46], но впоследствии КРС распространилась через международные границы [98].

β -лактамазы класса В – металло- β -лактамазы (МБЛ) – гидролизуют все β -лактамы, кроме азтреонама [112].

Карбапенемаза NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) впервые обнаружена в 2009 году [158]. Известно, что инфекционные заболевания, вызванные NDM-продуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, часто ассоциированы с поездками в эндемичные регионы и госпитализацией в них [32, 158].

K. pneumoniae, продуцирующая VIM (Verona integrin-encoded metallo- β -lactamase) впервые была обнаружена в США в 2010 году [110]. Эндемичными регионами являются Греция и Италия [32, 87]. *K. pneumoniae*, продуцирующая IMP (imipenemase), является эндемичной для Японии [93]. *bla*_{VIM} и *bla*_{IMP} переносятся на интегронах и могут быть либо внедрены в хромосому, либо ассоциироваться с плазмидами [52, 102].

К молекулярному классу С относятся ферменты типа AmpC. Также их называют цефалоспориназы за их активность в отношении цефалоспоринов [79].

Наиболее клинически значимыми и широко распространенными карбапенемазами у *K. pneumoniae* считаются β -лактамазы класса D семейства ОХА (oxacillinase). Карбапенемаза ОХА-48 встречаются в основном у энтеробактерий. Продуцирующая ОХА-48 *K. pneumoniae* впервые была обнаружена в Стамбуле, Турция. К 2009 году штаммы, содержащие данный фермент, появились на Ближнем Востоке, в Индии, Европе и Северной Африке [71], а к настоящему времени распространились повсеместно. ОХА-48-продуцирующие штаммы гидролизуют пенициллины, цефалоспорины, а также имеют высокую активность в отношении карбапенемов.

Большинство генов, кодирующих β -лактамазы, распространяются между разными видами грамотрицательных бактерий с помощью плазмид, что способствует быстрому развитию внехромосомной резистентности.

1.3. Особенности формирования резистентности к колистину

Колистин является одним из немногих противомикробных препаратов, сохраняющих активность в отношении Карба-Р *K. pneumoniae* [22, 125]. Однако активное использование колистина для лечения инфекций, вызванных устойчивыми к карбапенемам бактериями, привело к появлению и распространению резистентности к колистину [22, 90], [133]. В связи с этим изучение чувствительности патогенов к данной группе антибиотиков имеет большое значение для рациональной терапии инфекционных заболеваний, особенно для госпитализированных пациентов [1, 7].

1.3.1. Механизм действия колистина

Механизм действия колистина основан на нарушении структуры наружной клеточной мембраны грамотрицательных бактерий. В результате электростатического взаимодействия между остатком α, γ -аминомасляной кислоты положительно заряженного колистина и фосфатными группами отрицательно заряженного липида А двухвалентные катионы кальция и магния (Ca^{2+} и Mg^{2+}) вытесняются из отрицательно заряженной мембраны клетки. В результате происходит дестабилизация мембраны, повышение ее проницаемости, утечка цитоплазматического содержимого и, в конечном итоге, клеточная гибель [14, 51, 58, 125]. Благодаря такому же механизму колистин способен нейтрализовать активность эндотоксина грамотрицательных бактерий, представляющего собой липидную часть молекулы ЛПС [14]. Еще одним механизмом действия колистина является ингибирование жизненно важных респираторных ферментов (NADH-хиноноксидоредуктазы типа II) во внутренней бактериальной мембране [49].

1.3.2. Хромосомные мутации

Наиболее распространенным механизмом резистентности к колистину является модификация ЛПС посредством присоединения к нему катионных групп (4-амино-4-дезоксид-арабиноза, L-Ara4N и фосфоэтаноламин, pEtN), подобно модификациям ЛПС у бактерий с природной устойчивостью к полимиксинам [125].

В качественной модификации ЛПС принимает участие большая группа генов и оперонов. К ним относятся гены *pmrC* и *pmrE* и оперон *pmrHFJKLM*, которые кодируют ферменты, непосредственно участвующие в модификации ЛПС (т.е. ответственные за синтез катионных групп и/или их добавление к ЛПС), а также гены, кодирующие белки двухкомпонентных сигнальных систем PmrAB и PhoPQ, негативный регулятор системы PhoPQ - *mgrB* ген, и гены, кодирующие двухкомпонентную регуляторную систему CrrAB (регулятор системы PmrAB) (рисунок 1.1) [72, 125].

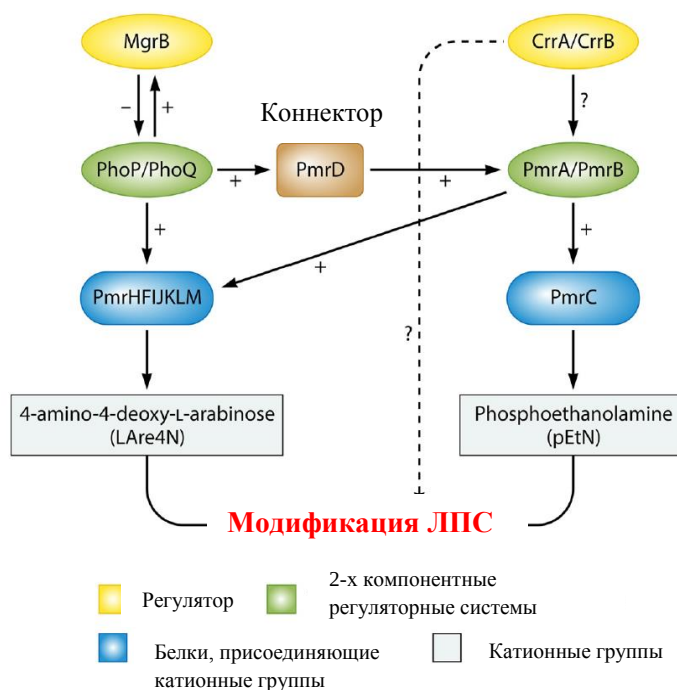


Рисунок 1.1. Регуляторные пути модификации липополисахарида (ЛПС) *K.pneumoniae* [125]

Ген *pmrC* кодирует белок фосфоэтаноламинфосфотрансферазу PmrC, который добавляет положительно заряженный фосфоэтаноламин (pEtN) к ЛПС (рисунок 1.1). Оперон *pmrHFIJKLM* кодирует 7 белков; ген *pmrE*, кодирует белок PmrE. Эти белки отвечают за синтез группы 4-амино-4-дезоксид-L-арабинозы (L-Ara4N) и ее присоединение к липиду А (рисунок 1.1). Гены *pmrA* и *pmrB* кодируют двухкомпонентную систему PmrAB. Факторы внешней среды, такие как фагосомы макрофагов, повышенное содержание железа (Fe^{3+}) и алюминия (Al^{3+}), низкий pH активируют периплазматический домен сенсорной протеинкиназы PmrB (известная как BasS). В свою очередь, PmrB активирует фосфорилированием регуляторный белок PmrA (известный как BasR). PmrA активирует транскрипцию гена *pmrE* и оперонов *pmrCAB* и *pmrHFIJKLM*, отвечающих за присоединение L-Ara4N к ЛПС (рисунок 1.1) [72, 125]. Гены *phoP* и *phoQ* кодируют двухкомпонентную систему PhoPQ. Факторы внешней среды, такие как фагосомы макрофагов, низкое содержание магния (Mg^{2+}), низкий pH активируют периплазматический домен сенсорной протеинкиназы PhoQ. Затем PhoQ путем фосфорилирования активирует регуляторный белок PhoP, который активирует транскрипцию оперона *pmrHFIJKLM*, участвующего в добавлении L-Ara4N к ЛПС. PhoP прямо или косвенно может активировать PmrA через соединительный белок PmrD, что приводит к добавлению pEtN к ЛПС. Активация двухкомпонентной системы PhoPQ приводит к экспрессии генов, кодирующих системы транспорта магния и ферменты, участвующие в модификации ЛПС, а также ферменты, которые снижают клеточный стресс, вызванный низким pH или некоторыми факторами вирулентности (рисунок 1.2) [70, 118, 125]. Ген *mgrB* кодирует небольшой трансмембранный белок MgrB (также известный как YobG) – негативный регулятор системы PhoPQ. При фосфорилировании регуляторного белка PhoP происходит транскрипция *mgrB*. Белок MgrB подавляет экспрессию гена, кодирующего PhoQ. Таким образом, двухкомпонентная система PhoPQ регулируется по типу отрицательной обратной связи. При инактивации *mgrB* происходит гиперактивация системы PhoPQ, что ведет к активации транскрипции *pmrHFIJKLM*-оперона и присоединению L-Ara4N к ЛПС [124]. Оперон *crrAB*

кодирует белки двухкомпонентной регуляторной системы CtrAB – регуляторный белок CtrA и сенсорную протеинкиназу CtrB. Вероятно, инактивация системы CtrAB приводит к гиперэкспрессии системы PmrAB, что вызывает активацию *pmrHFIJKLM*-оперона и генов *pmrC* и *pmrE*, отвечающих за присоединение L-Ara4N к ЛПС [125].

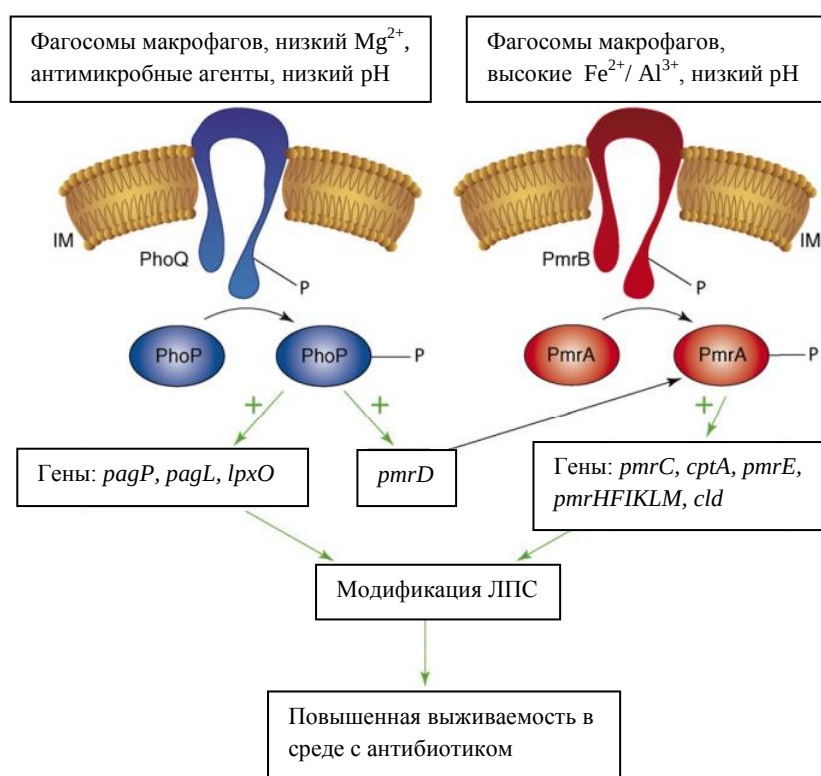


Рисунок 1.2. Активация и взаимодействие двухкомпонентных сигнальных систем PmrAB и PhoPQ [72]

Наиболее распространенными механизмами резистентности к колистину являются хромосомные мутации в перечисленных выше генах и оперонах. Сообщения об инактивации *mgrB* у *K. pneumoniae* встречаются в литературе чаще всего. Это миссенс- и нонсенс-мутации, инактивация в результате встраивания мобильных генетических элементов, делеции небольшого участка гена или полная делеция его локуса [37, 38, 114, 124]. Аминокислотные модификации белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ также приводят к модификации ЛПС: точечные мутации в последовательностях аминокислот или делеции небольших участков

[38, 114]. Такие мутации вероятнее всего приводят к присоединению катионных групп (L-Ara4N и pEtN) к ЛПС и возникновению колистинрезистентности у грамотрицательных бактерий.

1.3.3. Плазмидопосредствованная резистентность к колистину

К настоящему времени были обнаружены девять вариантов генов *mcr* (от *mcr-1* до *mcr-9*) в образцах, полученных от человека, животных и из окружающей среды. Вариант *mcr-1* является наиболее распространенным в мире [106, 153].

Ген *mcr-1*, ответственный за горизонтальный перенос резистентности к колистину, впервые был описан для изолята *Escherichia coli* (SHP45), выделенного от свиньи в Китае в период 2011-2014 гг [95]. Позже стали появляться сообщения об обнаружении *mcr-1* в штаммах грамотрицательных бактерий, полученных как от животных, так и от человека в разных точках земного шара. Плазмида, в составе которой переносится ген *mcr-1*, относится к группе Inc. В составе этой же плазмиды приносится ген CTX-M [94, 135].

Ген *mcr-1* кодирует белок Mcr-1, который относится к семейству ферментов фосфоэтаноламинтрансферазы. Его экспрессия приводит к добавлению фосфоэтаноламина (pEtN) к липиду A и модификации ЛПС [95].

1.3.4. Другие механизмы резистентности к колистину

Капсульный полисахарид является естественным защитным барьером против полимиксинов у *K. pneumoniae* [36]. Повышенная экспрессия генов капсульного биосинтеза препятствует взаимодействию полимиксинов с мембраной клетки, что может приводить к колистинрезистентности [125].

Роль эффлюксных насосов в реализации резистентности к колистину до конца не выяснена. В литературе описаны мутации в генах *kpnEF* и *acrAB*, кодирующих компоненты эффлюксных систем, что приводит к увеличению

выживаемости бактерий в присутствии низких концентраций полимиксинов [117, 143].

1.4. Бактериальный фитнес

Мутации, приводящие к развитию устойчивости, дают бактериям преимущество над чувствительными штаммами в присутствии антибиотика, однако формирование и поддержание резистентности может быть сопряжено с определенными затратами внутренних биологических ресурсов. Они могут выражаться в снижении темпов роста и уменьшении конкурентоспособности (т.е. уровня приспособленности к жизнедеятельности, который обозначается термином «бактериальный фитнес» [73, 126, 147]) по сравнению с чувствительными штаммами в отсутствие селективного давления антибиотика [30, 43]. С учетом того, что устойчивость к колистину связана с модификацией важнейшего компонента клеточной стенки бактерий – ЛПС, колистинрезистентность может быть сопряжена со снижением бактериального фитнеса.

1.5. Роль мобильных генетических элементов

Мобильные генетические элементы (МГЭ) представляют собой последовательности ДНК, способные к интеграции и перемещениям внутри генома хозяина [99, 142]. МГЭ играют важную роль в изменении структуры генома, функций и экспрессии генов, а также обеспечивают мобилизацию генов резистентности. МГЭ по типу транспозиции можно разделить на два класса: ретротранспозоны и ДНК-транспозоны [82, 154]. Ретротранспозоны перемещаются по геному по механизму «copy-and-paste» таким образом, что сначала с участка ретротранспозона происходит синтез РНК, далее происходит обратная транскрипция РНК в последовательность ДНК (образуется новый ретротранспозон), а затем вновь синтезированный ретротранспозон встраивается в новый участок генома. Экспансия ДНК-транспозонов осуществляется при

помощи комплекса ферментов транспозаз, которые вырезают ДНК-транспозон и встраивают его в новый участок генома.

Инсерционные последовательности (IS, IS-элемент, англ. Insertion sequence) – небольшие МГЭ, имеющие одну или две открытые рамки считывания, заканчивающиеся фланкирующими повторяющимися концевыми последовательностями. IS-элементы могут кодировать ферменты транспозазы, ответственные за встраивание IS в участок генома, а также регуляторные белки [40, 142]. IS-элементы при встраивании могут нарушать структуру и функцию гена, изменять его экспрессию.

Для классификации IS-элементов используют несколько критериев. К ним относятся генетическая организация, сходство первичной аминокислотной последовательности транспозазы, длина и последовательность концевых инвертированных повторов, конечный сайт встраивания и вариант переноса IS-элемента в ДНК-мишень. Однако основным принципом классификации IS-элементов является сходство первичной последовательности транспозаз.

С каждым годом список известных IS-элементов увеличивается. В 1977 году было идентифицировано только пять IS-элементов (IS1, IS2, IS3, IS4 и IS5) [77, 111]. К 1989 году их число возросло до 50 [99], а к 2002 году было открыто уже более 700 IS-элементов [40]. В настоящее время база данных вставочных элементов ISfinder включает более 4600 IS-элементов, классифицированных на 29 семейств [77, 141].

Еще одна группа МГЭ, способных изменять структуру, функцию и экспрессию гена, – это миниатюрные инвертированные повторяющиеся мобильные элементы (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements, MITEs). Впервые MITEs были идентифицированы в геноме растений [61]. MITEs имеют обычную для мобильных генетических элементов структуру: внутренняя последовательность и фланкирующие концевые повторяющиеся последовательности. Размер MITEs варьирует от 50 до 800 п.н. (рисунок 1.3). Вероятнее всего, MITEs формируются в результате внутренней делеции IS-элемента [61]. MITEs обычно не имеют открытых рамок считывания, поэтому

переносятся при участии транспозаз, закодированных автономными ДНК-транспозонами, то есть они являются неавтономными МГЭ. Из-за того, что MITEs имеют малый размер, их обнаружение и исследование затруднено.

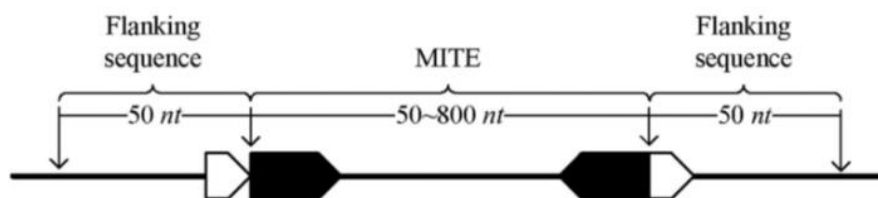


Рисунок 1.3. Структура миниатюрного инвертированного повторяющегося мобильного элемента (MITE)

1.6. Роль поринов в формировании антибиотикорезистентности

Мембрана грамотрицательных бактерий содержит порообразующие белки - порины, предназначенные для пассивной диффузии гидрофильных молекул. По физико-химическим свойствам порины относят к слабокислым белкам с большим количеством полярных аминокислот. Их основным структурным элементом является β -складчатый цилиндр. β -цепи в β -цилиндрах расположены в антипараллельной ориентации, они соединены участками полипептидной цепи белка с неупорядоченной и/или α -спиральной структурой [12]. Порины имеют структуру тримеров, которую стабилизируют гидрофобные взаимодействия, а также водородные и ионные связи [12, 136].

K. pneumoniae содержит три пориновых белка во внешней мембране: OmpK35, OmpK36 и OmpK37 [53, 75]. OmpK37 является небольшим порином, гомологичным порину OmpN *E. coli*. Два других классических тримерных порина, OmpK35 и OmpK36, гомологичны пориновым белкам OmpF и OmpC *E. coli* соответственно [146]. Они играют важную роль в проникновении антибиотика внутрь клетки. При нарушении структуры пориновых каналов или их полной утрате эффективность транспорта антибиотиков внутрь клетки резко снижается, в

результате формируется устойчивость к нескольким классам препаратов [13]. В литературе описаны случаи модификации пориновых белков за счет встраивания в кодирующие их гены МГЭ, а также делеций целого гена или его небольших участков [75, 81, 139].

Делеция гена порина OmpK35 играет важную роль в развитии антибиотикорезистентности [54]. Делеция гена порина OmpK36 у гипервирулентного штамма *K. pneumoniae* приводила к снижению его чувствительности к антибиотикам. Делеция сразу двух поринов OmpK35 и OmpK36 приводила к еще большей резистентности у *K. pneumoniae* [150].

1.7. Молекулярная эпидемиология *Klebsiella pneumoniae*

МЛСТ *K. pneumoniae* по схеме Pasteur базируется на генетической вариации нуклеотидных последовательностей семи генов домашнего хозяйства (*rpoB*, *gapA*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, и *tonB*). Их комбинация определяет сиквенс-тип каждого штамма [50]. Анализ, основанный на данных МЛСТ, позволяет объединить различные сиквенс-типы в клональные группы (Clonal Group, CG) и клональные комплексы (Clonal complex, CC) и выделить эпидемические клоны бактерий, отличающиеся высокой степенью вирулентности и/или антибиотикорезистентности.

Большинство Карба-Р изолятов *K. pneumoniae* принадлежит к ограниченному числу повсеместно распространенных генетических линий, доминирующих в популяционной структуре в клинических подразделениях, вызывая локальные вспышки инфекционных заболеваний. В таких генетических линиях резистентность к карбапенемам преимущественно связана с плазмидопосредованной продукцией карбапенемаз [90, 156].

На протяжении многих лет клон, принадлежащий к ST258 с фенотипом МЛУ и продуцирующий различные карбапенемазы, остается основной генетической линией Карба-Р *K. pneumoniae*, ассоциированных с внутрибольничными инфекциями [41]. Другие глобально распространившиеся

клоны относятся к ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST395 и ST307 [78, 92, 155, 156]. Данные генетические линии были ассоциированы с продукцией таких карбапенемаз, как KPC, OXA-48, NDM-1 и VIM-1 [156].

Большинство представителей *K. pneumoniae* клонального комплекса CC23 (сиквенс-типы ST23 и ST218) являются гипервирулентными и чаще всего имеют гены вирулентности *magA*, *g-rmpA*, *p-rmpA* и *p-rmpA2* [43]. Также высоко вирулентными штаммами *K. pneumoniae* являются ST86, ST65 [140, 144], ST375, ST380 [140].

Согласно эпидемиологическому исследованию нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* из 20 городов Российской Федерации, представители преобладающего вида *K. pneumoniae* относятся к 7 сиквенс-типам, включая ST395, ST147, ST15, ST11, ST437, ST45 и ST1160 [17].

Таким образом, на сегодняшний день актуальным объектом исследования остается Карба-Р *K. pneumoniae*. Выявление молекулярных механизмов резистентности к карбапенемным антибиотикам и их эпидемиологический мониторинг необходим для разработки новых направлений этиотропной терапии. Требуют дальнейшего изучения механизмы устойчивости *K. pneumoniae* к колистину, поскольку наблюдается тенденция к росту резистентности к данному антибиотику из группы резерва. Также недостаточно данных о бактериальном фитнесе Кол-Р *K. pneumoniae*, что требует дальнейшего развития данного направления исследований с целью объяснения причин сохранения и персистенции устойчивой популяции бактерий. Перечисленные задачи, а также сведения о доминирующих клональных линиях и ассоциированных с ними маркеров резистентности помогут оценить распространенность и циркуляцию данных жизнеугрожающих изолятов среди пациентов.

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Изоляты *Klebsiella pneumoniae*

За период 2012-2017 гг. была собрана коллекция Карба-Р изолятов *K. pneumoniae* от пациентов ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ГБУЗ «Научно-исследовательский институт неотложной детской хирургии и травматологии» Департамента здравоохранения города Москвы и ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О. М. Филатова» Департамента здравоохранения города Москвы. В коллекцию были включены только недублирующиеся изоляты, т.е. от одного пациента – один изолят *K. pneumoniae*, включая изоляты из стерильных локусов (кровь, моча, ликвор), из респираторного тракта (аспират, мокрота), стомы, раны, зева, ануса.

2.2. Бактериологические методы

2.2.1. Видовая идентификация бактерий

Культивирование микроорганизмов производили на питательных средах: кровяной агар (BioRad, США) и агар Uri-select (BioRad) в термостате при температуре 37°C в течение 24 - 48 ч. Образцы крови, инокулированные во флаконы для гемокультивирования, инкубировали в анализаторе для гемокультур BASTEC 9050 (Becton Dickinson, США). Видовую идентификацию полученных микроорганизмов проводили на масс-спектрометре MALDI-TOF-MS Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия) и в бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция).

2.2.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Определение чувствительности к аминогликозидам (гентамицин, нетилмицин, амикацин), ципрофлоксацину, фосфомицину, цефотаксиму, цефепиму, цефтазидиму проводили на автоматизированном бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux). Для определения МПК к меропенему, имипенему и тигециклину использовали метод Е-тестов (BioMerieux) на среде Мюллера-Хинтона (BioRad). МПК к колистину определяли с помощью ММР в бульоне в соответствии с [4] в круглодонных 96-луночных планшетах.

Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями (breakpoint) EUCAST [57], МУК 4.2.1890-04 [11] и клиническими рекомендациями [6]. В качестве контрольного штамма использовали *E. coli* ATCC 25922. Фенотип МЛУ определяли у изолятов, резистентных хотя бы к одному антибиотику из трех и более классов антимикробных препаратов [97].

2.2.3. Сравнение трех методов определения минимальной подавляющей концентрации колистина

Для проведения данного этапа исследования МПК колистина определяли методом Е-тестов на среде Мюллера-Хинтона, в бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact и с помощью эталонного ММР в бульоне, с которым сравнивали первые два способа.

Субстанцию колистина в форме порошка (Sigma Aldrich, Германия) использовали для определения МПК колистина с помощью ММР. Для приготовления стокового раствора колистин растворяли в деионизованной воде в концентрации 25 г/л; полученный раствор хранили при -25°C. Непосредственно перед исследованием готовили основные растворы с концентрациями колистина 2048, 128, 8 мг/л путём разбавления стокового раствора колистина в бульоне Мюллера-Хинтона, из которых готовили рабочие растворы колистина

(концентрации 2-2048 мг/л). Рабочие растворы (50 мкл) помещали в лунки 96-луночного планшета. Последние лунки в ряду, в которые помещали бульон без антибиотика, использовали для контроля бактериального роста.

Для приготовления инокулюма использовали суточную культуры *K. pneumoniae*, выращенную при 37°C на кровяном агаре (BioRad). Приготовленный инокулюм с оптической плотностью 0,5 по стандарту McFarland разводили бульоном в соотношении 1:100 до концентрации 1×10^6 КОЕ/мл и вносили по 50 мкл в лунки планшета, содержащего 50 мкл рабочего раствора колистина. В результате окончательная концентрация бактериальных клеток составляла 5×10^5 КОЕ/мл, а рабочие концентрации антибиотика находились в диапазоне от 1 до 1024 мг/л.

Приготовленные планшеты инкубировали при 37°C в течение 18 ч. Результаты учитывали при достаточном росте микроорганизма (явное пятно на дне лунки и помутнение бульона) в последних лунках в ряду (положительный контроль), используя камеру для визуального считывания результатов Sensititre Manual Viewer. Характер роста в тестируемых лунках сравнивали с характером роста в положительном контроле. Наиболее низкую концентрацию антибиотика, полностью подавляющую видимый рост бактерий, регистрировали как МПК. В качестве контроля использовали штамм *E. coli* ATCC 25922. Значения МПК, полученные с помощью ММР, считали референсными.

Для сравнения результатов определения МПК, полученных при помощи референсного ММР и метода Е-тестов и Vitek 2 Compact, рассчитывали следующие коэффициенты эффективности: (1) полное согласие (Essential agreement, EA), (2) категорийное согласие (Categorical agreement, CA), (3) очень существенная ошибка (Very major error, VME) и (4) существенная ошибка (Major error, ME) согласно [65]. Формулы расчёта данных коэффициентов представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Формулы расчета коэффициентов эффективности [65]

Коэффициент эффективности, %	Числитель	Знаменатель
Полное согласие (Essential agreement, EA)	Число изолятов с МПК, находящихся в пределах одного двукратного разведения от ММР	Всего изолятов
Категорийное согласие (Categorical agreement, CA)	Число изолятов с совпадающей интерпретацией результатов (совпадение резистентный с резистентным и чувствительный с чувствительным)	Всего изолятов
Существенная ошибка (Major error, ME)	Число изолятов, оцененных как резистентные тестируемым методом, но как чувствительные при помощи ММР	Число чувствительных штаммов, полученных с помощью ММР
Очень существенная ошибка (Very major error, VME)	Число изолятов, оцененных как чувствительные тестируемым методом, но как резистентные при помощи ММР	Число резистентных штаммов, полученных с помощью ММР

2.2.4. Гетерорезистентность *Klebsiella pneumoniae* к колистину

Гетерорезистентность выявляли в ходе определения МПК колистина с помощью ММР в бульоне. Считали, что изоляты (т.е. популяция в целом), демонстрирующие прерывистый характер роста (наличие, по меньшей мере, двух пропущенных лунок между лунками с концентрациями колистина в диапазоне чувствительных концентраций [<2 мг/л] и более высокой концентрацией в диапазоне резистентных [>2 мг/л]) (см. рисунок 4.4, ряд С), содержат Кол-Р субпопуляцию, придающую штамму свойство гетерорезистентности [55]. Кол-Р субпопуляцию гетерорезистентных изолятов собирали из лунок с самой высокой концентрацией колистина (см. рисунок 4.4, ряд С, лунка 5) и высевали на агар Uri-select. После 24-часовой инкубации при 37°C выращенные бактерии повторно

идентифицировали с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF-MS Biotyper MicroFlex. Из Кол-Р субпопуляций выделяли ДНК для дальнейшего выявления *mgrB* гена (см. п. 2.4. Молекулярно-генетические методы исследования).

2.3. Фитнес бактерий

Для исследования бактериального фитнеса были отобраны Кол-Ч изоляты *K. pneumoniae*, и Кол-Р изоляты *K. pneumoniae* с поврежденным *mgrB* и *mgrB* дикого типа. Использовали суточные культуры *K. pneumoniae*, чувствительные и резистентные к колистину, выращенные на агаре Лурия-Бертани (LB; HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Готовили взвесь из одной колонии в бульоне LB и инкубировали в орбитальном шейкер-инкубаторе ES-20 (BioSan, Латвия) при 37°C в течение 3 часов при постоянном перемешивании 250 об/мин. Концентрацию микроорганизмов измеряли на проточном цитометре Novocyte (ACEA Biosciences, США).

Для сравнительного анализа кривых роста колистинчувствительных (Кол-Ч) и Кол-Р бактерий суспензию доводили до концентрации бактериальных клеток 5×10^6 в 1 мл. Полученную бактериальную взвесь в объеме 250 мкл инкубировали в 96-луночных плоскодонных планшетах в трех повторах для каждого штамма в присутствии колистина в концентрации 0, 1, 4, 16, 64 мг/л. Инкубацию проводили в многофункциональном микропланшетном ридере Infinite 200 (Tecan, Австрия) в течение 15 часов при 37°C с параллельной оценкой оптической плотности на длине волны 600 нм (ОП₆₀₀) каждые 30 минут. Данные регистрировали при помощи программы Magellan 6.6 (Tecan). В качестве индикатора интенсивности роста использовали значение площади под кривой роста (ПКР), которую рассчитывали от начала экспоненциального роста до выхода кривой на плато (рисунок 2.1) и выражали в ОП₆₀₀ за 1 ч.

Для оценки конкурентоспособности Кол-Р и Кол-Ч изолятов *K. pneumoniae* рассчитывали индекс конкуренции (ИК). Для этого суспензию Кол-Р и Кол-Ч изолятов доводили до концентрации $1,5 \times 10^3$ в 1 мл и смешивали 1:1 ($1,5 \times 10^3$ КОЕ

каждого штамма). Смесь Кол-Р и Кол-Ч изолятов, а также суспензии Кол-Р и Кол-Ч изолятов по отдельности выращивали в бульоне LB при 37°C и 180 об/мин в течение 16-18 часов. По окончании инкубации бактериальные суспензии разводили в 10^5 раз и с помощью автомата для посева easySpiral (Interscience, Франция) наносили по 10 мкл на чашки Петри с агаром LB без колистина и с агаром LB, содержащим 10 мг/л колистина. Инкубацию проводили при 37°C в течение 16-18 часов. Подсчет КОЕ производили с помощью автоматического счетчика Scan 500 (Interscience). ИК рассчитывали как отношение числа КОЕ на чашке LB+колистин к числу КОЕ на чашке с LB без колистина. ИК <1 означал сниженную конкурентоспособность Кол-Р изолята по сравнению с Кол-Ч изолятом (см. рисунок 5.1). Эксперименты выполняли в трех повторах.

Значения ПКР и числа колоний представляли в виде медианы (P25; P75), значения ИК выражали в виде среднего (стандартное отклонение). Различия ПКР оценивали при помощи теста Краскела-Уоллиса, парные сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

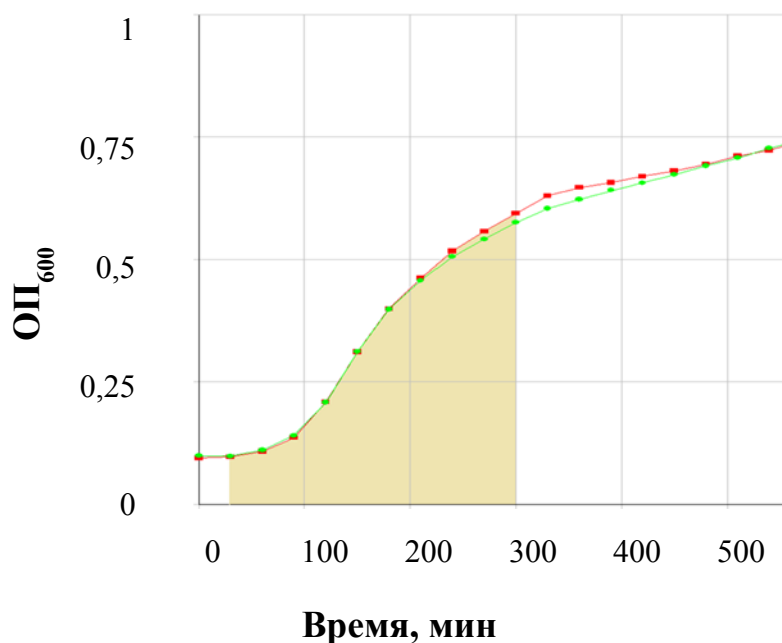


Рисунок 2.1. Типичные кривые роста изолятов *K. pneumoniae* в среде без колистина

Примечание. Заштрихованная область — значение площади под кривой (ПКР), ОП₆₀₀*час.

2.4. Молекулярно-генетические методы исследования

2.4.1. Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали суточную культуру, полученную при посеве на агар Uri-select. Экстракцию ДНК из бактериальных культур выполняли с помощью коммерческого набора реагентов DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы хранили до использования при температуре - 20°C.

2.4.2. Мультилокусное секвенирование-типирование (МЛСТ)

Для генотипирования штаммов *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ согласно схеме Pasteur [50]. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов домашнего хозяйства: *rpoB* (бета-субъединица РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа), *mdh* (малат-дегидрогеназа), *pgi* (фосфоглюкоза-изомераза), *phoE* (фосфорин Е), *infB* (фактор инициации трансляции 2), *tonB* (периплазматический энергетический трансдуцер). Праймеры для амплификации приведены в таблице 2.2.

Для очистки ПЦР-продуктов от избытка праймеров, димеров праймеров и дНТФ проводили ферментативное разрушение с помощью экзонуклеазы I и щелочной фосфатазы (SAP, Affymetrix, США) при температуре 37°C в течение 30 мин с последующей инактивацией при 85°C.

Секвенирование проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) в соответствии с методикой, описанной производителем. Нуклеотидные последовательности генов домашнего хозяйства, полученные в результате секвенирования, анализировали, используя программу SeqMan, и затем сравнивали с базой аллелей с помощью специализированной программы для обработки результатов МЛСТ. Сиквенс-тип определяли на основании комбинации аллелей.

Праймеры для амплификации генов домашнего хозяйства *K. pneumoniae*

Ген	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)
<i>rpoB</i>	Vic3	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	501
	Vic2	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	gapA173	TGAAATATGACTCCACTCACGG	450
	gapA181	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	mdh130	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	477
	mdh867	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	pgi1F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432
	pgi1R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	phoE604.1	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420
	phoE604.2	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	infB1F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318
	infB1R	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	tonB1F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414
	tonB2R	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	

2.4.3. Выявление генов резистентности к β -лактамным антибиотикам методом ПЦР с электрофоретической детекцией

Для выявления генов β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС), а именно гена *bla*_{CTX-M}, определяющего резистентность ко всем β -лактамным антибиотикам, за исключением карбапенемов, были использованы праймеры, предложенные [47] (таблица 2.3). Для определения принадлежности каждого CTX-M-положительного штамма к подтипам (CTX-M-1-type, CTX-M-2-type, CTX-M-8-type и CTX-M-9-type) были использованы праймеры, предложенные [20] (таблица 2.3). CTX-M-1-type включал: CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15, -28 и FEC-1; CTX-M-2-type включал: CTX-M-2, -4, -5, -6, -7, -20 и ТОНО-1; CTX-M-8-type включал: CTX-M-8; CTX-M-9 type включал: CTX-M-9, -13, -14, -16, -17, -19, -21, -24, -27 и ТОНО-2 [20]

(таблица 2.3). Компоненты реакционной смеси, последовательности праймеров, условия амплификации и размер продукта реакции (bp) представлены в таблице 2.3. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента. Результаты реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

**Праймеры, компоненты реакционной смеси и условия амплификации
для идентификации различных типов *bla*_{CTX-M}**

Ген	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)	Компоненты реакционной смеси	Условия амплификации
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M/F	TTTGCGATGTGCAGTACCAG	544	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 2 мкл; проба ДНК – 1 мкл.	1. Начальная денатурация - 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 20" Отжиг праймеров 58°C – 20" Элонгация 72°C – 45" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	CTX-M/R	GATATCGTTGGTGCCAT			
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M-1/F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	415	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 94°C – 5' 2. Денатурация 94°C – 25" Отжиг праймеров 52°C – 40" Элонгация 72°C – 50" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 6'
	CTX-M-1/R	AGCTTATTCATCGCCACGTT			
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M-2/F	CGACGCTACCCCTGCTAT	552	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 94°C – 5' 2. Денатурация 94°C – 25" Отжиг праймеров 52°C – 40" Элонгация 72°C – 50" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 6'
	CTX-M-2/R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG			
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M-8/F	ACGCTCAACACCGCGATC	490	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 94°C – 5' 2. Денатурация 94°C – 25" Отжиг праймеров 52°C – 40" Элонгация 72°C – 50" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 6'
	CTX-M-8/R	CGTGGGTTCTCGGGGATAA			
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M-9/F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	205	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 94°C – 5' 2. Денатурация 94°C – 25" Отжиг праймеров 52°C – 40" Элонгация 72°C – 50" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 6'
	CTX-M-9/R	ATTGGAAGCGTTCATCACC			

2.4.4. Выявление генов резистентности к карбапенемным антибиотикам методом ПЦР в режиме реального времени

Выявление генов, кодирующих продукцию карбапенемаз, проводили с использованием наборов реагентов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «АмплиСенс MDR MBL-FL» (*bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}), «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48-like}) производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.

Общий объём реакционной смеси составил 25 мкл, включая 15 мкл реакционной смеси и 10 мкл пробы ДНК. В качестве положительного и отрицательного контролей использовали образцы, входящие в состав набора. ПЦР проводили с помощью амплификатора CFX96 (BioRad). Условия амплификации указаны в таблице 2.4.

Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия пересечения графика флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне экспоненциального подъема сигнала. Результат считали положительным при значении $C_t \leq 32$. Результат считали отрицательными при пороговом значении $C_t > 32$.

Таблица 2.4

Программа амплификации генов, кодирующих продукцию карбапенемаз

Цикл	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95	15 мин	1
2	95	5 с	35
	60	30 с, детекция флуоресцентного сигнала	
	72	15 с	

2.4.5. Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов резистентности к β -лактамным антибиотикам

Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию генов *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{NDM} с использованием праймеров, предложенных [123], и гена *bla*_{KPC} с использованием праймеров, предложенных [83]. Праймеры, компоненты реакционной смеси и условия амплификации приведены в таблице 2.5.

Секвенирование генов проводили как было описано выше (см. п. 2.4.2. Мультилокусное секвенирование-типирование штаммов). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} обрабатывали с помощью программы SeqMan, затем сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank, NCBI.

Праймеры, компоненты реакционной смеси и условия амплификации для подготовки матриц для секвенирования генов карбапенемаз

Ген	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)	Компоненты реакционной смеси	Условия амплификации
bla_{OXA-48-like}	OXA-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 2 мкл; проба ДНК – 1 мкл.	1. Начальная денатурация – 94°C – 10' 2. Денатурация 94°C – 30" Отжиг праймеров 52°C – 40" Элонгация 72°C – 50" Количество температурных циклов 36 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	OXA-R	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
bla_{NDM}	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	621		
	NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC			
bla_{KPC}	KPC-F	GCTACACCTAGCTCCACC TTC	989	iQ Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация – 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 1' Отжиг праймеров 60°C – 1' Элонгация 72°C – 1' Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	KPC-R	ACAGTGGTTGGTAATCCATGC			

2.4.6. Выявление механизмов резистентности к колистину

Для выявления и секвенирования гена *mgrB* использовали праймеры (*mgrB-extF*, *mgrB-extR*), предложенные [124] (таблица 2.6). Для некоторых штаммов для выявления гена *mgrB* использовали дополнительные праймеры: праймеры, покрывающие большую часть локуса *mgrB* и праймеры, покрывающие внутренний регион гена *mgrB* [38] (таблица 2.6). Для выявления и секвенирования генов *pmrA*, *phoP* и *phoQ* использовали праймеры, предложенные [80], для выявления и секвенирования гена *pmrB* использовались праймеры, описанные [44] (таблица 2.6). Результаты ПЦР реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле.

Секвенирование генов проводили методом Сенгера, как описано выше (см. п. 2.4.2. Мультилокусное секвенирование-типирование штаммов). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов обрабатывали с помощью программы SeqMan, затем сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank, NCBI. Идентификацию IS-элементов проводили на основе базы данных ISfinder [77].

Аминокислотные последовательности белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ Кол-Р штаммов сравнивали с аминокислотными последовательностями чувствительных к колистину штаммов соответствующих сиквенс-типов.

**Праймеры, используемые для выявления и секвенирования генов,
мутации в которых обуславливают резистентность к колистину**

Ген	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)	Компоненты реакционной смеси	Условия амплификации
<i>mgrB</i>	<i>mgrB-extF</i>	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	253	iTaq Universal Probes Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 30" Отжиг праймеров 54°C – 30" Элонгация 72°C – 105" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	<i>mgrB-extR</i>	AAGGCGTTCATTCTACCACC			
<i>mgrB</i>	<i>EE_mgrB_F</i>	GGCTATGGCGAGGATAATGAG	1507	iQ Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 30" Отжиг праймеров 59°C – 30" Элонгация 72°C – 2' Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	<i>EE_mgrB_R</i>	GCTGTGATGTAAGCGTCTGGTG			
<i>mgrB</i>	<i>Int_mgrB_F</i>	CGGTGGGTTTTACTGATAGTCA	110	iQ Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 30" Отжиг праймеров 54°C – 30" Элонгация 72°C – 30" Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	<i>Int_mgrB_R</i>	ATAGTGCAAATGCCGCTGA			
<i>pmrA</i>	<i>pmrA ext F</i>	CATTTCCGCGCACTGTCTGC	851	iQ Supermix, BioRad – 5 мкл; по 1 мкл каждого из праймеров; деионизированная вода – 1 мкл; проба ДНК – 2 мкл.	1. Начальная денатурация - 95°C – 3' 2. Денатурация 95°C – 1' Отжиг праймеров 59°C – 1' Элонгация 72°C – 1' Количество температурных циклов 30 3. Пост ПЦР 72°C – 5'
	<i>pmrA ext R</i>	CAGCTTTCAGTTGCAAACAG			
<i>phoP</i>	<i>phoP ext F</i>	GAGCTTCAGACTACTATCGA	740		
	<i>phoP ext R</i>	GGGAAGATATGC CGCAACAG			
<i>phoQ</i>	<i>phoQ ext F</i>	ATACCCACAGGACGTCATCA	1591		
	<i>phoQ ext R</i>	CAG GTGTCTGACAGGGATTA			
<i>pmrB</i>	<i>pmrB-F</i>	GAGGATAGCGCCCATGCAAA	1310		
	<i>pmrB-R</i>	AACGAGCCGGCGACCAATAC			

Выявление гена *mcr-1* проводили в режиме реального времени с анализом кривых плавления. Использовали праймеры, предложенные [33] и универсальные праймеры 27F и 338R для амплификации гена 16S РНК [33], используемого как контроль. Размеры продуктов амплификации составили 120 и 350 бп, температуры плавления были 82,5 и 86,7°C соответственно (таблица 2.7).

ПЦР проводили с помощью амплификатора CFX96 (Bio-Rad, США). Общий объем реакционной смеси составил 20 мкл, включая 10 мкл реагента EvaGreen Supermix (Bio-Rad), по 1 мкл каждого из праймеров, 4 мкл воды и 2 мкл пробы ДНК. Условия амплификации указаны в таблице 2.7.

Результаты интерпретировали на основании наличия или отсутствия пика флуоресценции на кинетической кривой, соответствующего плавлению специфического продукта (*mcr-1*; 82,5 °C), а также обязательного наличия пика флуоресценции, соответствующего плавлению контрольного продукта амплификации (ген 16S РНК; 86,7 °C).

Результат считали положительным при наличии пиков флуоресценции, соответствующих плавлению продукта амплификации *mcr-1* и гена 16S РНК. Результат считали отрицательными при отсутствии пика флуоресценции, соответствующего плавлению продукта амплификации *mcr-1*, и при наличии пика флуоресценции, соответствующего плавлению продукта гена 16S РНК. В качестве контроля использовали *mcr-1*-положительный штамм *E. coli* (штамм предоставил НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России).

Программа амплификации гена *mcr-1*

Цикл	Температура, °С	Время	Количество циклов
1	95	2 мин	1
2	95	5 с	40
	60	20 с, детекция флуоресцентного сигнала	
	72	7 с	
3	72 - 95	Повышение температуры для анализа кривых плавления, непрерывная детекция флуоресцентного сигнала	1

2.4.7. Анализ генов пориновых белков *Klebsiella pneumoniae*

Для выявления и секвенирования генов пориновых белков *K. pneumoniae* (*ompK35* и *ompK36*) были использованы праймеры, предложенные [81] (таблица 2.8). Общий объем реакционной смеси содержал 5 мкл iQ Supermix, BioRad, по 1 мкл каждого из праймеров, 1 мкл деионизированной воды и 2 мкл пробы ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента.

Таблица 2.8

Праймеры для идентификации и секвенирования генов *ompK35* и *ompK36*

Ген	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)
<i>ompK35</i>	OmpK35 F	CAGACACCAACTCTCATCAATGG	1183
	OmpK35 R	AGAATTGGTAAACGATACCCACG	
<i>ompK36</i>	OmpK36 F	CAGCACAATGAATATAGCCGAC	1115
	OmpK36 R	GCTGTTGTCTGCCAGCAGGTTG	

Условия амплификации:

1. Начальная денатурация - 95°C – 3'
2. Денатурация 95°C – 1'
- Отжиг праймеров 59°C – 40"
- Элонгация 72°C – 1'
- Количество температурных циклов 30
3. Пост ПЦР 72°C – 1'

Результаты реакции оценивали путем проведения горизонтального электрофореза в 2% агарозном геле. Секвенирование генов и анализ нуклеотидных последовательностей проводили как было описано в п. 2.4.2 и п. 2.4.6, соответственно.

2.5. Полногеномное секвенирование изолятов *Klebsiella pneumoniae*

Подготовка образцов ДНК для полногеномного секвенирования осуществляли с использованием Illumina Nextera DNA Library Prep Kit (Illumina, Карлсбад, США) и Illumina Nextera Index Kit (Illumina, Карлсбад, США). Секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq1500 с использованием наборов Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 и Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Illumina, Карлсбад, США) согласно инструкциям производителя.

С помощью Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [28], RAST [129] и PATRIC [119] выполнялся поиск механизмов резистентности к колистину. Поиск детерминант антибиотикорезистентности проводили с помощью ресурсов ResFinder 3.0 [130] и BLAST [28]. Поиск плазмид выполняли с помощью ресурса PlasmidFinder 1.3 [122]. Поиск генов вирулентности выполняли с помощью ресурса VirulenceFinder 2.0 [151].

2.6. Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel.

Глава 3. Молекулярная эпидемиология и механизмы устойчивости карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae* к β -лактамным антибиотикам

В данном разделе мы изучили основные механизмы возникновения устойчивости к β -лактамным антибиотикам у *K. pneumoniae*. Совместно с детекцией основных детерминант резистентности к β -лактамам и карбапенемам мы проанализировали распространенность изменений структуры основных пориновых каналов *K. pneumoniae* и ассоциацию с выявленными генетическими линиями.

За период 2012-2017 гг. было собрано 159 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*, в том числе 30 (19%) изолятов из стерильных локусов (кровь, моча, ликвор). Из респираторного тракта (аспират, мокрота) было выделено 25 (16%) изолятов, из стомы/раны – 12 (8%), из ануса – 53 (33%), из зева 38 (24%) изолятов (рисунок 3.1).

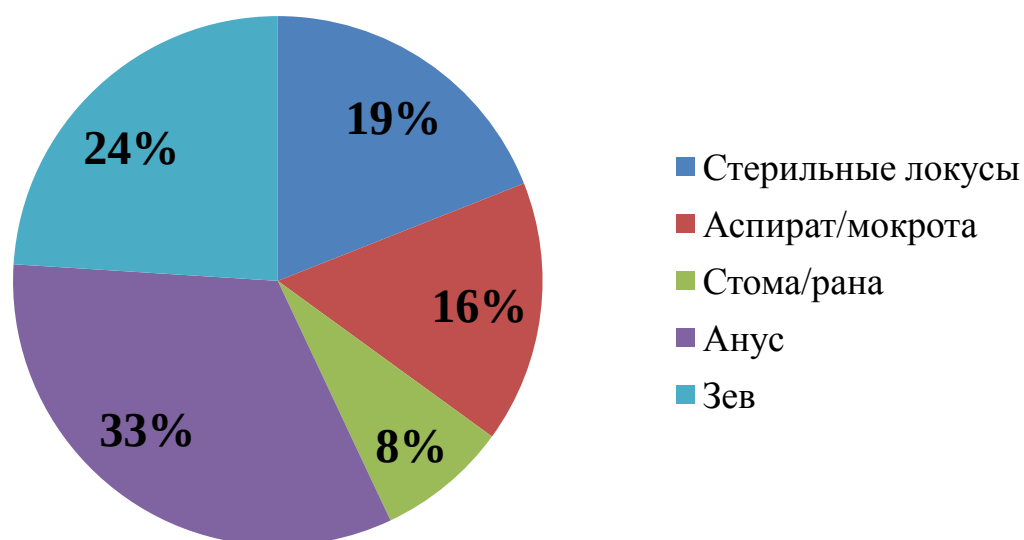


Рисунок 3.1. Локусы выделения карбапенемрезистентных изолятов *K. pneumoniae*

3.1. Профиль чувствительности к антибиотикам карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*

Все изоляты *K. pneumoniae* имели фенотип МЛУ: все изоляты были резистентными к карбапенемам (меропенем и/или имипенем) и к цефалоспорином 3-го и 4-го поколения, а также продемонстрировали высокий уровень резистентности к ципрофлоксацину (93%), фосфомицину (90%), нетилмицину (82%), гентамицину (84%), амикацину (50%) и к колистину (45%). Большинство штаммов *K. pneumoniae* были чувствительны к тигециклину: только 7% продемонстрировали резистентность (таблица 3.1).

Таблица 3.1

Спектр устойчивости к антибиотикам карбапенемрезистентных изолятов *K. pneumoniae*

Антимикробный препарат	МПК (мг/л) ^а		Число резистентных изолятов (% от исследованных изолятов)
	Ч ≤	Р >	
Меропенем	2	8	157 (98)
Имипенем	2	4	148 (93)
Цефотаксим	1	2	159 (100)
Цефипим	1	4	159 (100)
Цефтазидим	1	4	159 (100)
Ципрофлоксацин	0,25	0,5	147 (93)
Фосфомицин	32	32	128 (90)
Нетилмицин	2	4	129 (82)
Амикацин	8	16	79 (50)
Гентамицин	2	4	134 (84)
Колистин	2	2	71 (45) ^б
Тигециклин	1	2	8 (7)

Примечание.

Ч – чувствительный; Р – резистентный

^а в соответствии с EUCAST [57]

^б МПК₅₀ = 2 мг/л; МПК₉₀ = 512 мг/л

3.2. Молекулярная эпидемиология карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Принадлежность 159 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae* к сиквенс-типам была определена с помощью метода МЛСТ по схеме Pasteur. Всего было выявлено 18 сиквенс-типов. Большая часть коллекции (86%) относилась к пяти доминирующим сиквенс-типам: ST307 (n=46, 29%), ST395 (n=40, 25%), ST377 (n=17, 10%), ST48 (n=17, 10%) и ST23 (n=16, 10%) (таблица 3.2, приложение А). Девять сиквенс-типов, в том числе ST48, были представлены в одном из трех стационаров; четыре сиквенс-типа, в том числе ST307 и ST23, были обнаружены в двух из трех стационарах; два сиквенс-типа ST395 и ST377 были выявлены во всех трех стационарах. Редкие сиквенс-типы встречались чаще в стационаре 1 (С-1). Интересно, что доминирующий ST48 был представлен только в С-1 и мог быть эндемичным, в то время как ST23 был обнаружен только в С-2 и С-3, а ST307 - только в С-1 и С-2. В С-1 преобладал ST307 (38%), в С-2 – ST395 (54%), в С-3 – ST23 (55%) (таблица 3.2).

Популяционная структура карбапенемрезистентных изолятов

***K. pneumoniae* в трех стационарах г. Москвы**

ST	Число изолятов (%)	Стационар, число изолятов (%)		
		С-1	С-2	С-3
307	46 (29%)	41 (38%)	5 (14%)	0
395	40 (25%)	18 (17%)	20 (54%)	2 (13%)
377	17 (10%)	13 (12%)	3 (7%)	1 (6%)
48	17 (10%)	17 (16%)	0	0
23	16 (9%)	0	7 (19%)	9 (55%)
147	5 (3%)	3 (3%)	0	2 (13%)
13	3 (2%)	3 (3%)	0	0
336	2 (1%)	1 (1%)	1 (3%)	0
15	2 (1%)	2 (2%)	0	0
14	2 (1%)	2 (2%)	0	0
37	2 (1%)	2 (2%)	0	0
Другие ^а	7 (5%)	4 (4%)	1(3%)	2 (13%)
Всего	159 (100%)	106 (100%)	37 (100%)	16 (100%)

Примечание.

^а ST134, ST35, ST70, ST86, ST247, ST461, ST39

3.3. Молекулярные механизмы резистентности карбапенемрезистентных

Klebsiella pneumoniae к β-лактамам антибиотикам

Выработка ферментов, гидролизующих антибиотик, является ведущим механизмом формирования устойчивости к β-лактамам у *Enterobacteriaceae* [9]. Действительно, у всех 159 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*, исследованных нами, были выявлены гены различных β-лактамаз, в том числе гены БЛРС *bla*_{CTX-M} и карбапенемаз *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}. Ни в одном из тестируемых изолятов не было детектировано генов *bla*_{IMP} и *bla*_{VIM}.

Распространенность и спектр генов β -лактамаз представлены в таблице 3.3. Основной детерминантой резистентности к карбапенемным антибиотикам был ген *bla*_{OXA-48-like}, обнаруженный у 146 (92%) Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*. С помощью секвенирования ДНК в выборке из 62 изолятов, охватившей каждый сиквенс-тип, были идентифицированы варианты *bla*_{OXA-48} и *bla*_{OXA-244} у 55 и 7 штаммов соответственно. Ген *bla*_{OXA-244} был обнаружен у штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к ST377 и ST14. Интересно, что среди изолятов ST377 были обнаружены оба варианта генов OXA-48-подобных карбапенемаз (приложение А).

Ген *bla*_{NDM} был обнаружен у 11 (7%) изолятов трех лидирующих (ST307, ST395, ST377) и двух редких (ST147 и ST461) сиквенс-типов; во всех изолятах данный ген был представлен вариантом *bla*_{NDM-1} (таблица 3.3). Комбинация *bla*_{OXA-48-like} и *bla*_{NDM-1} была обнаружена у 4 изолятов ST307 (n=1), ST395 (n=2) и ST377 (n=1). У 2 (1%) изолятов, принадлежавших к ST15, был обнаружен ген *bla*_{KPC-3}. У 4 (3%) изолятов не было обнаружено исследованных генов карбапенемаз, но были обнаружены гены БЛРС *bla*_{CTX-M}.

У 152 (96%) штаммов было выявлено носительство гена *bla*_{CTX-M}. В 142 (93%) изолятах он относился к типу *bla*_{CTX-M-1}, а в 18 (12%) изолятах – к типу *bla*_{CTX-M-9}, причем 8 (5%) изолятов были носителями обоих типов *bla*_{CTX-M}.

Доминирующим сочетанием β -лактамаз у Карба-Р изолятов *K. pneumoniae* была комбинация генов *bla*_{CTX-M}/*bla*_{OXA-48-like}, обнаруженная у 136 (86%) изолятов. Также были выявлены следующие сочетания генов β -лактамаз: *bla*_{CTX-M}/*bla*_{OXA-48-like}/*bla*_{NDM-1} – у 4 (3%) изолятов, *bla*_{CTX-M}/*bla*_{NDM-1} – у 6 (4%) изолятов, *bla*_{CTX-M}/*bla*_{KPC-3} – у 2 (1%) изолятов (таблица 3.3, приложение А).

Таблица 3.3

**Гены карбапенемаз и их комбинации у карбапенемрезистентных
K. pneumoniae в зависимости от сиквенс-типа**

ST	n (%)	n	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	<i>bla</i> _{CTX-M}
ST307	46 (29%)	44	+	-	-	+
		1	+	+	-	+
		1	+	-	-	-
ST395	40 (25%)	31	+	-	-	+
		3	-	+	-	+
		3	+	-	-	-
		2	+	+	-	+
		1	-	-	-	+
ST48	17 (10%)	17	+	-	-	+
ST377	17 (10%)	15	+	-	-	+
		1	+	+	-	+
		1	-	+	-	+
ST23	16 (10%)	15	+	-	-	+
		1	+	-	-	-
ST13, 14, 35, 39, 70, 134, 336	11 (7%)	11	+	-	-	+
ST147	5 (3%)	3	+	-	-	+
		2	-	+	-	+
ST37, 247	3 (3%)	3	-	-	-	+
ST15	2 (1%)	2	-	-	+	+
ST86	1 (1%)	1	+	-	-	-
ST461	1 (1%)	1	-	+	-	-
Всего:	159 (100%)	159	146 (92%)	11 (7%)	2 (1%)	152 (96%)

Другим важным механизмом возникновения устойчивости к β -лактамам являются изменения структуры пориновых каналов, приводящие к нарушениям транспорта антибиотика внутрь бактериальной клетки [81, 139]. В настоящей работе мы исследовали гены пориновых белков OmpK35 и OmpK36 в коллекции Карба-Р *K. pneumoniae*. У 54 (34%) и 2 (1%) изолятов была выявлена полная делеция генов *ompK36* и *ompK35* соответственно, а еще у 2 (1%) изолятов были делетированы оба гена (приложение А). Во время электрофоретической детекции гена *ompK36* у трех изолятов было обнаружено увеличение размера продукта амплификации (рисунок 3.2, линии 3, 5, 6). Секвенирование данных ампликонов показало наличие в гене *ompK36* вставочного элемента MITEKpn1, который был впервые описан нами в гене *mgrB* (см. раздел 4.2). Все три изолята относились к ST307, в двух из них MITEKpn1 занимал позицию +97/+98, а в третьем – позицию +955/956 в гене *ompK36*.

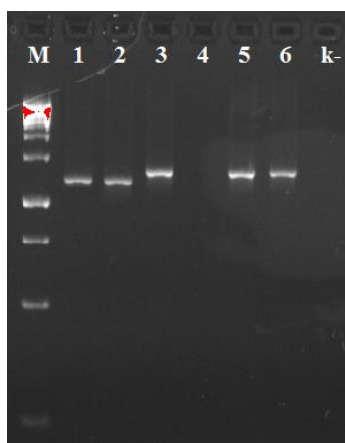


Рисунок 3.2. Результаты электрофореза продуктов амплификации гена *ompK36* *K. pneumoniae*

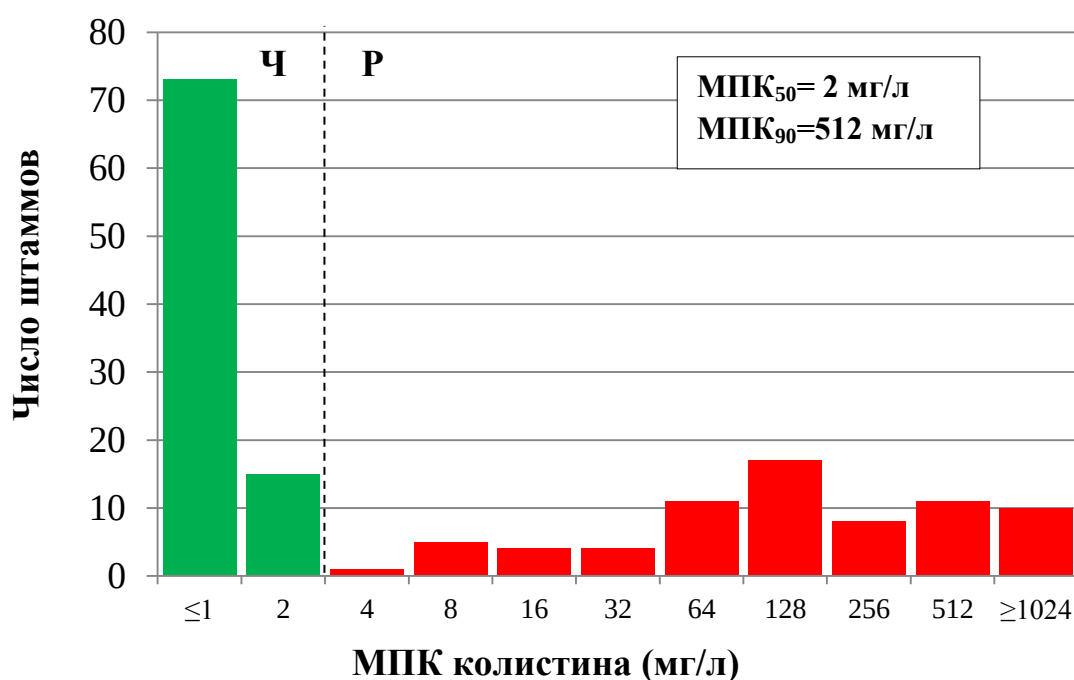
Примечание. М – молекулярный стандарт; штаммы *K. pneumoniae*: 1, 2 – неизмененный *ompK36*; 3, 5, 6 – MITEKpn1 в *ompK36*; 4 – делеция *ompK36*; k- – отрицательный контроль реакции.

Таким образом, ведущим механизмом формирования устойчивости к β -лактамам антибиотикам Карба-Р *K. pneumoniae* является сочетание СТХ-М/ОХА-48. Также важная роль принадлежит нарушению структуры основных пориновых каналов, а именно OmpK36. Выявлены наиболее распространенные генотипы Карба-Р *K. pneumoniae*: ST307, ST395, ST377, ST48 и ST23.

Глава 4. Механизмы устойчивости к колистину карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*

Колистин является одним из немногих антимикробных препаратов, сохраняющих активность в отношении Карба-Р *K. pneumoniae* [148]. В данном разделе мы продемонстрировали важность корректного определения МПК колистина при помощи ММР, проанализировали распространенность и основные механизмы резистентности к колистину и описали новый вставочный элемент, играющий важную роль в изменчивости бактериального генома.

Среди 159 Карба-Р *K. pneumoniae* 71 (45%) изолят продемонстрировал резистентность к колистину. МПК колистина находились в диапазоне от 4 до >1024 мг/л, при этом МПК₅₀=2 мг/л, МПК₉₀=512 мг/л. Спектр МПК колистина представлен на рисунке 4.1.



**Рисунок 4.1. Спектр МПК колистина карбапенемрезистентных
изолятов *K. pneumoniae***

Примечание. Ч – чувствительный; Р – резистентный.

4.1. Сравнение лабораторных методов определения устойчивости к колистину

Для проведения данного этапа работы были выбраны 119 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*. Чувствительность к колистину определяли методом Е-тестов, в бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact и с помощью эталонного ММР в бульоне. Согласно критериям EUCAST [57], пограничные значения МПК колистина для *K. pneumoniae* составляют: чувствительные ≤ 2 мг/л, резистентные > 2 мг/л.

Доля Кол-Р изолятов, полученная ММР, методом Е-тестов и с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact, составила 52% (n=62/119), 39% (n=46/119) и 35% (n=42/119) соответственно (таблица 4.1).

Для сравнения эффективности тестируемых методов с референсным ММР были сопоставлены МПК колистина, определенные методом Е-тестов и в бактериологическом анализаторе VITEK 2 Compact (рисунок 4.2), с МПК колистина, определенными ММР. На основании полученных распределений МПК были рассчитаны значения полного согласия (Essential agreement, EA), категорийного согласия (Categorical agreement, CA), очень существенной ошибки (Very major error, VME) и существенной ошибки (Major error, ME) (таблица 4.1).

По сравнению с референсным ММР частоты ошибок при определении МПК к колистину методом Е-тестов и с помощью Vitek 2 Compact были выше приемлемых (допустимые значения: EA $>89,9\%$, CA $>89,9\%$, VME $<1,5\%$ [при значении EA $<95\%$] или VME $<7,5\%$ [при значении EA $>95\%$], ME $< 3\%$) [65]. Оба тестируемых метода продемонстрировали значения EA и CA ниже 90%. Доля VME была высока как для Е-тестов (26%), так и для VITEK 2 Compact (34%). Для VITEK 2 Compact была выявлена единичная ME (2%).

Таким образом, оба тестируемых метода определения чувствительности к колистину существенно занижают истинную долю Кол-Р изолятов. Полученные результаты согласуются с данными, описанными в научной литературе: по данным [48] значение VME для Е-тестов составило 41,5%, а коэффициенты EA и

СА достигали 48,8% и 56,1% соответственно. Похожие результаты для Е-тестов были получены в исследовании [133], в котором значение VME составило 35%. Бактериологический анализатор VITEK 2 Compact зарубежные исследователи также не рекомендуют для определения значений МПК к колистину [42, 152].

Таблица 4.1

Значения коэффициентов эффективности использования методов тестирования чувствительности к колистину по сравнению с референсным методом микроразведений (ММР)

Метод	Число чувствительных изолятов, n (%)	Число резистентных изолятов, n (%)	EA ^а , n (%)	CA ^б , n (%)	ME ^в , n (%)	VMЕ ^г , n (%)
ММР	57 (48%)	62 (52%)				
Е-тесты	73 (61%)	46 (39%)	86 (72%)	103 (87%)	0	16 (26%)
Vitek 2 Compact	77 (65%)	42 (35%)	95 (80%)	97 (82%)	1 (2%)	21 (34%)

Примечание.

^а - EA (Essential agreement) - полное согласие;

^б - CA (Categorical agreement) - категорийное согласие;

^в - ME (Major error) - существенная ошибка;

^г - VME (Very major error) - очень существенная ошибка.

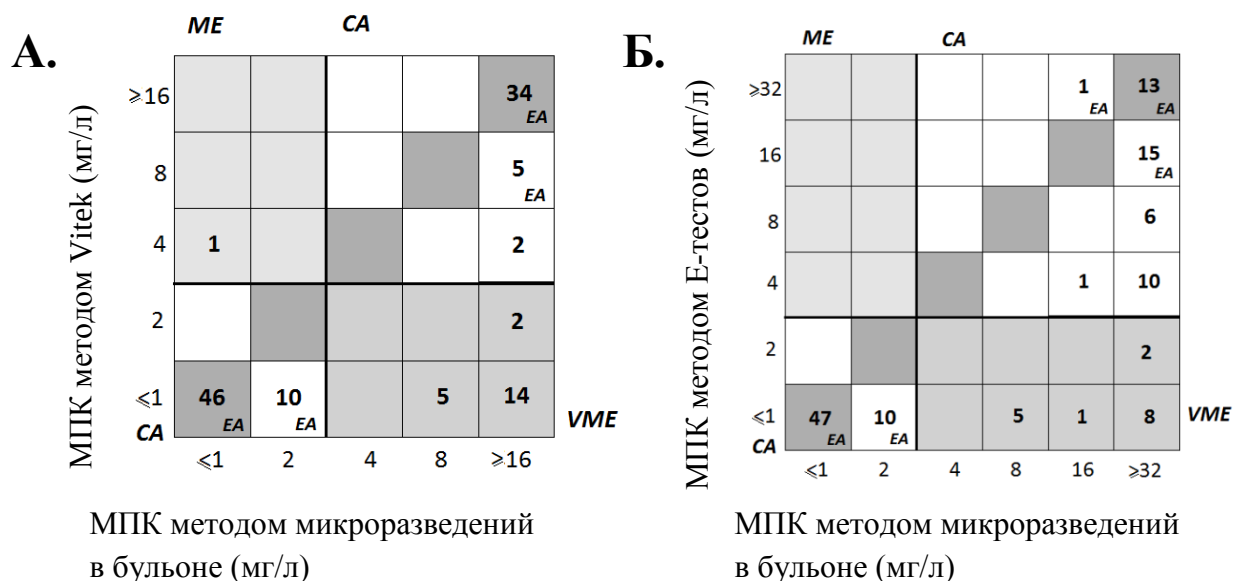


Рисунок 4.2. Сопоставление МПК колистина, определенных с помощью бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (А) и метода Е-тестов (Б) с методом микроразведений в бульоне (ММР)

Примечание. Цифры в квадратах означают число изолятов. ME (Major error) - существенная ошибка; VME (Very major error) - очень существенная ошибка; CA (Categorical agreement) - категорийное согласие; EA (Essential agreement) - полное согласие.

4.2. Молекулярные механизмы устойчивости к колистину карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*: новый миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами MITEKpn1

Расшифровка молекулярных механизмов устойчивости к колистину была начата с поиска плазмидного гена *mcr-1*, который по данным литературы является наиболее частой причиной резистентности [26, 95, 158]. Ни в одном из 71 Кол-Р изолята *K. pneumoniae* ген *mcr-1* обнаружен не был.

Далее мы исследовали структуру гена *mgrB*, с повреждением которого может ассоциироваться устойчивость к колистину. Изменения *mgrB* были

обнаружены у 23 (32%) Кол-Р изолятов (таблица 4.2, приложение А). В 4 (17%) изолятах была обнаружена делеция всего локуса *mgrB*, причем два из них демонстрировали гетерорезистентный фенотип (см. раздел 4.4). У 13 (56%) изолятов *mgrB* был поврежден вставочными элементами четырех различных типов (IS1A, IS1R, ISKpn14, и ISKpn26) из семейств IS1 и IS5, внедренными в разные позиции *mgrB* (таблица 4.2).

Наибольший интерес представляет обнаруженный в *mgrB* шести (26%) Кол-Р изолятов миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами (Miniature Inverted repeat Transposable Elements, MITE) (таблица 4.2). Такой тип вставочных элементов в составе генома *K. pneumoniae* был обнаружен и описан впервые, и координаторами базы данных ISfinder ему было присвоено название MITEKpn1 [137].

MITEKpn1 состоял из 109 бп, принадлежал к семейству вставочных элементов IS5, не имел открытых рамок считывания и содержал прямые повторы (direct repeat, DR) размером 4 бп (СТАА). MITEKpn1 был обнаружен в гене *mgrB* в позиции 75 у шести изолятов ST307 (таблица 4.2, рисунок 4.3); у этих изолятов МПК колистина находилась в диапазоне от 16 до >1024 мг/л. Нуклеотидная последовательность MITEKpn1, встроенного в *mgrB*, была внесена в международную базу данных GenBank под номером MK241841 и в базу данных ISfinder под номером CP018364.

MITEKpn1 был ретроспективно обнаружен еще в 5 штаммах *K. pneumoniae* с диким типом гена *mgrB*. В трех Карба-Р изолятах ST307 MITEKpn1 присутствовал в гене основного поринового белка OmpK36 в нуклеотидных позициях 98 (в двух штаммах) и 956 (у одного штамма) (см. раздел 3.3). Еще в двух изолятах (ST395) MITEKpn1 был обнаружен при анализе результатов полногеномного секвенирования. В одном штамме MITEKpn1 был внедрен в ген эффлюксного RND транспортера, у другого штамма он находился в генах двух гипотетических белков (см. раздел 4.3). Таким образом, новый вставочный элемент MITEKpn1 был обнаружен в 11 (7%) Карба-Р штаммах *K. pneumoniae* ST307 и ST395.

Наличие гена *mgrB* дикого типа у 48 из 71 (68%) Кол-Р изолятов *K. pneumoniae* требовало поиска других механизмов устойчивости к колистину. С этой целью во всех этих 48 Кол-Р изолятах мы проанализировали аминокислотные последовательности белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ, участвующих в процессах модификации ЛПС, повреждение которых может вызывать устойчивость к колистину [80, 125]. Значимые изменения PmrA и/или PmrB были выявлены у 3 изолятов, которые принадлежали к трем разным сиквенс-типам (ST307; ST395; ST48) с МПК колистина в диапазоне от 128 до >1024 мг/л (таблица 4.2).

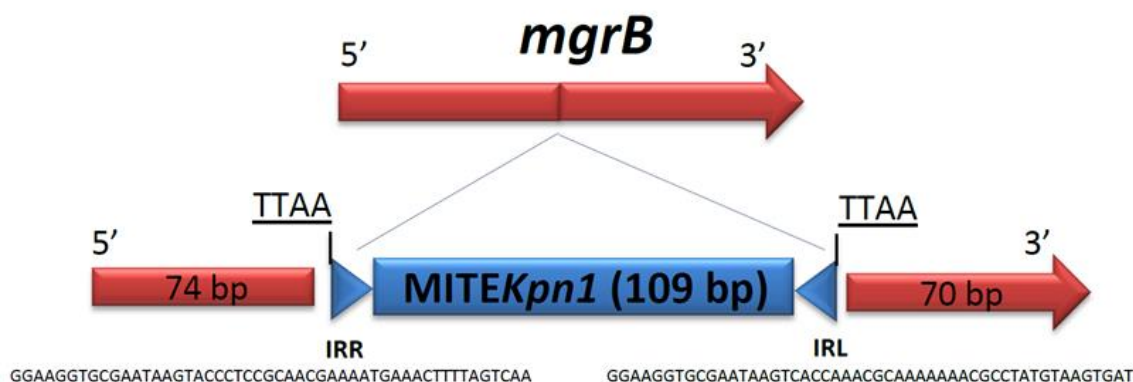


Рисунок 4.3. Структура измененного гена *mgrB*, содержащего MITEKpn1, в сравнении с *mgrB* дикого типа

Примечание. IRR, inverted repeat right, правый инвертированный повтор; IRL, inverted repeat left, левый инвертированный повтор.

- *mgrB* gene
- MITEKpn1

**Механизмы резистентности к колистину среди
карбапенемрезистентных *K. pneumoniae***

№ штамма	ST	МПК колистина (мг/л)	Статус <i>mgrB</i> ^а
69-77	23	128	IS1A, IS-1 family (+127/+128)
56-1790	307	64	IS1R, IS-1 family (+36/+37)
68-66-1	48	16	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-2876	48	128	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-3431	48	128	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-2966	48	512	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
56-1678	48	≥1024	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
56-1053	48	≥1024	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
71-1375	307	512	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
76-2089	377	512	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
64-574	307	256	ISKpn26, IS-5 family (+74/+75)
4469	395	128	ISKpn26, IS-5 family (+74/+75)
52-1659	395	256	ISKpn26, IS-5 family (+74/+75)
58-1363	307	16	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
55-148	307	64	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
56-566	307	128	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
58-1286	307	128	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
56-613	307	512	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
48-1594	307	≥1024	MITEKpn1, IS-5 family (+74/+75)
78-296	37	16	Δ <i>mgrB</i> локуса
37262	147	64	Δ <i>mgrB</i> локуса
29423	70	128	Δ <i>mgrB</i> локуса ^б
36-2246	395	128	Δ <i>mgrB</i> локуса ^б
46-1574	307	128	Дикий тип ^в
48-2246	395	≥1024	Дикий тип ^г
56-410	48	128	Дикий тип ^д

Примечание. ^а в скобках указана нуклеотидная позиция встраивания вставочного элемента; ^б Кол-Р субпопуляция гетерезистентного штамма; ^в измененный PmrB (T157P); ^г измененный PmrA (A141T) и PmrB (L213M, G256R); ^д измененный PmrB (делеция 27-30 (QLIS))

4.3. Особенности геномов карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*, устойчивых и чувствительных к колистину

Для анализа полных геномов были выбраны пять пар Кол-Ч/Кол-Р изолятов *K. pneumoniae*, принадлежавших к пяти доминирующим сиквенс-типам (ST307, ST395, ST377, ST23 и ST48) и имевших нерасшифрованный механизм резистентности к колистину у Кол-Р изолятов. Целью данного этапа работы было попарно сравнить геномы Кол-Ч и Кол-Р изолятов одного сиквенс-типа, что бы обнаружить дополнительные механизмы резистентности к колистину. Один Карба-Ч/Кол-Ч изолят *K. pneumoniae* (ST395) был использован в качестве референсного (таблица 4.3).

Штаммы *K. pneumoniae*, включённые в полногеномное секвенирование

№ штамма	Локус выделения	ST	Меропенем/имипенем	Цефалоспорины 3/4 поколения	Ципрофлоксацин	Фосфомидин	Амикацин	Гентамицин	Нетилмицин	Колистин	Ттигетиклин
37243	мокрота	23	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Р	Р	Ч
49-535	рана	23	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Ч	Ч
48-667	зев	48	Р/Р	Р	Р	Р	У	Р	Р	Р	У
48-966	анус	48	Р/Р	Р	Р	Ч	Ч	Р	Р	Ч	У
46-1601	анус	307	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Р	Р	Ч
56-1339	анус	307	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	Ч	НТ
16963	мокрота	377	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	Р	Ч
59-307	рана	377	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Ч	Ч	Ч
39-40	дренаж	395	Р/Р	Р	Р	Р	У	Ч	Р	Р	Ч
36-2029	зев	395	Р/Р	Р	Р	Р	Ч	Р	Р	Ч	Ч
16937	моча	395	Ч/Ч	НТ	НТ	НТ	НТ	НТ	НТ	Ч	Ч

Примечание. ST – сиквенс-тип; Ч – чувствительный; Р – резистентный; У – чувствительный при увеличенной экспозиции антимикробного препарата; НТ – не тестировали.

При сравнении аминокислотных последовательностей белков MgrB, PmrA, PmrB, PhoP, PhoQ, PmrC (EptA), CrrA, CrrB, YciM, мутации в которых обуславливают хромосомную резистентность к колистину, были обнаружены аминокислотные замены K129E и G277E в белке CrrB у Кол-Р штамма *K.*

pneumoniae ST48 (изолят №48-667), по сравнению с Кол-Ч штаммом *K. pneumoniae* того же сиквенс-типа (изолят №48-966) (таблица 4.4).

Дополнительно в геноме двух ST395-изолятов был обнаружен *MITEKpn1*: в гене эффлюксного RND транспортера (изолят № 39-40) и в генах двух гипотетических белков (изолят № 36-2029), о чем говорилось выше.

Таким образом, в результате анализа полных геномов и сравнению геномов Кол-Ч и Кол-Р изолятов *K. pneumoniae* был выявлен дополнительный механизм резистентности к колистину, а также присутствие *MITEKpn1* в различных генах, что делает его одним из важных факторов эволюции бактериального генома.

В дополнение анализ полных геномов 11 изолятов *K. pneumoniae* позволил уточнить картину резистомы Кол-Р/Карба-Р изолятов и выявить дополнительные детерминанты устойчивости к карбапенемным антибиотикам, раскрыть механизмы устойчивости к другим группам антибактериальных препаратов, а также описать различные факторы вирулентности.

Практически во всех включенных в анализ штаммах были обнаружены гены бета-лактамаз нескольких типов одновременно. Были обнаружены ферменты ОХА-типа – подгруппы ОХА-1 и ОХА-48. Во всех штаммах, содержащих *bla*_{ОХА-48}, присутствовала плаزمида IncL/M_pОХА-48.

Во всех штаммах присутствовали гены β-лактамаз SHV-типа, среди которых были выявлены SHV1, SHV110, SHV33, SHV28 и SHV182.

Ген β-лактамаз CTX-M-типа был обнаружен во всех штаммах и был представлен в четырех вариантах: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-3}, *bla*_{CTX-M-14b}. Чаще всего встречался *bla*_{CTX-M-15} – у 8 штаммов. Ген *bla*_{CTX-M-55} был обнаружен у ST23-изолятов *K. pneumoniae*.

Во всех 11 исследованных нами штаммах *K. pneumoniae* были найдены детерминанты резистентности к фторхинолонам (*oqxB*). Во всех *K. pneumoniae* была обнаружена детерминанта резистентности *fosA*, в том числе и в фосфомицинчувствительном изоляте (№48-966).

Также были обнаружены детерминанты резистентности к другим антибиотикам. Гены резистентности к аминогликозидам: *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*,

aadA1, *aadA2*, *aadA5*, *aph(3')-VIa*; к хлорамфениколу: *catA1*, *catA2*, *catB3*; к триметоприму: *dfrA1*, *dfrA12*, *dfrA14*, *dfrA17*; к макролидам: *mph(A)*; к сульфаниламидам: *sul1*, *sul2*; тетрациклину: *tet(A)* (таблица 4.4).

Таблица 4.4

**Гены антибиотикорезистентности *K. pneumoniae*, идентифицированные
в ходе полногеномного секвенирования**

Группа антимикробных препаратов	Ген	37243	49-535	48-667 ^а	48-966	46-1601	56-1339	16963	59-307	39-40 ^б	36-2029 ^в	16937
β-лактамы	<i>bla</i> OXA-48											
	<i>bla</i> OXA-1											
	<i>bla</i> SHV	33	33	1	1	28	28	110	110	182	182	182
	<i>bla</i> CTX-M-55											
	<i>bla</i> CTX-M-15											
	<i>bla</i> CTX-M-3											
	<i>bla</i> CTX-M-14b											
Аминогликозиды	<i>aac3</i> -IIa											
	<i>aac6</i> -Ib-cr											
	<i>aadA</i>		2; 5	2		1	1	1				
	<i>aph3</i> -VIa											
Хлорамфениколы	<i>catA1</i>											
	<i>catA2</i>											
	<i>catB3</i>											
Фосфомицин	<i>fosA</i>											
Фторхинолоны	<i>oqxB</i>											
Сульфаниламиды	<i>sul1</i>											
	<i>sul2</i>											
Тетрациклины	<i>tetA</i>											
Макролиды	<i>mphA</i>											
Триметоприм	<i>dfrA</i>			12; 17	12	14	14			1	1	1

Примечание.

^а аминокислотные замены K129E и G277E в белке CrrB

^б MITEKpn1 в гене эффлюксного RND транспортера

^в MITEKpn1 в генах двух гипотетических белков

В проведенном исследовании с помощью анализа полных геномов были обнаружены гены вирулентности *K. pneumoniae* (таблица 4.5). Во всех 11 штаммах присутствовали гены, кодирующие адгезивную структуру *K. pneumoniae* – фимбрии типа 3. У *K. pneumoniae* они кодируются кластером генов *mrkABCD*. Ген *mrkA*, кодирующий основную часть фимбрии MrkA, и ген *mrkD*, кодирующий адгезин MrkD, были обнаружены во всех штаммах. Гены, кодирующие субъединицы, участвующие в сборке и регуляции экспрессии фимбрии 3, а также ее стабилизации были обнаружены у всех штаммов, кроме штаммов ST307 (отсутствовал ген *mrkC*).

Гены регуляторов гипермукоидного фенотипа *rmpA* и *rmpA2* были выявлены только в геномах штаммов гипервирулентного сиквенс-типа ST23.

Во всех 11 штаммах были обнаружены гены, кодирующие систему утилизации ионов трехвалентного железа (сидерофоры).

Гены, кодирующие иерсиниабактин (*fyuA*; *ybtA*, *E*, *Q*, *S*, *T*, *U*, *X*; *irp1*, *irp2*), экспрессирующиеся у 18% классических и 90% гипервирулентных изолятов *K. pneumoniae* [60], были обнаружены у штаммов всех сиквенс-типов, кроме ST377.

Гены аэробактина (*iucA*, *C*, *D*; *iutA*), который в 93-100% случаев синтезируется гипервирулентными изолятами *K. pneumoniae*, а его наличие всегда сочетается с гиперпродукцией капсулы [159], были обнаружены в штаммах ST23, ST377, у одного штамма ST395 и у одного штамма ST307 (таблица 4.5).

Гены вирулентности *K. pneumoniae*, идентифицированные в ходе полногеномного секвенирования

Кодируемый фактор		Ген	Ген											
			37243	49-535	48-667	48-966	46-1601	56-1339	16963	59-307	39-40	36-2029	16937	
Фимбрии типа 3		mrk	A											
			B											
			C											
			D											
			F											
			H											
			I											
			J											
			Регуляторы гипермукоидного фенотипа		rmpA									
rmpA2														
Сидерофоры	Иерсиниабактин	fyuA												
		ybt	A											
			E											
			Q											
			S											
			T											
			U											
			X											
		irp1												
	irp2													
	Аэробактин	iuc	A											
			C											
			D											
		iutA												

4.4. Гетерорезистентность к колистину карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*

Гетерорезистентность к колистину была обнаружена у трех Карба-Р изолятов *K. pneumoniae* (один из них представлен на рисунке 4.4, ряд С). Кол-Р субпопуляцию гетерорезистентных изолятов собирали из лунок с самой высокой концентрацией колистина для исследования *mgrB* (рисунок 4.4, ряд С, лунка 5). У Кол-Р субпопуляций двух изолятов была выявлена делеция *mgrB* (рисунок 4.5, линии 4 и 6). При этом в общей популяции данных гетерорезистентных изолятов *mgrB* был обнаружен (рисунок 4.5, линии 3 и 5).

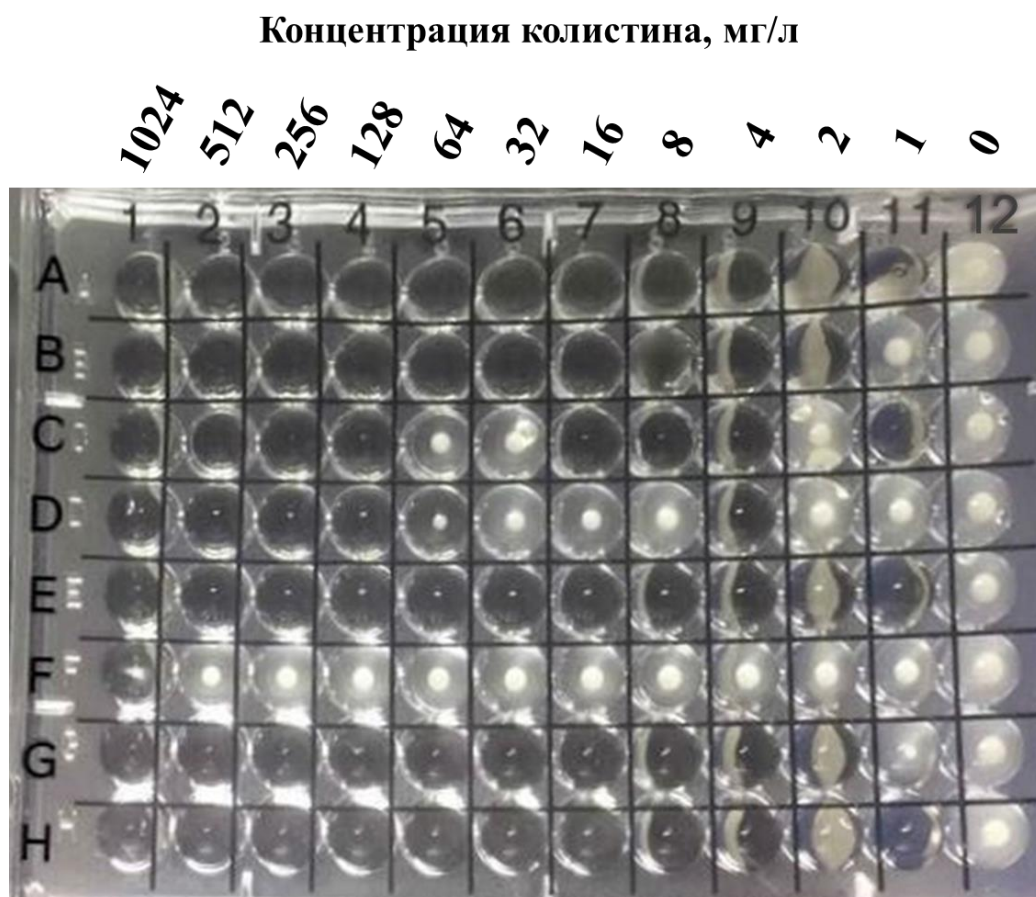


Рисунок 4.4. Прерывистый и обычный рост карбапенемрезистентных штаммов *K. pneumoniae* при определении МПК к колистину методом микроразведений (ММР)

Примечание. Гетерорезистентность выявляли в ходе определения МПК колистина с помощью ММР в бульоне. Считали, что изоляты (т.е. популяция в целом), демонстрирующие прерывистый характер роста (наличие, по меньшей мере, двух пропущенных лунок между лунками с концентрациями колистина в диапазоне чувствительных концентраций [<2 мг/л] и более высокой концентрацией в диапазоне резистентных [>2 мг/л]) (ряд С), содержат Кол-Р субпопуляцию, придающую штамму свойство гетерорезистентности [55]. Вертикальные ряды 1 – 11 – разведения колистина в диапазоне от 1 до 1024 мг/л, лунка 1 – максимальная концентрация (1024 мг/л), лунка 11 – минимальная концентрация (1 мг/л), лунка 12 – контроль роста (без антибиотика); в горизонтальном ряде А расположен контрольный изолят *E. coli* ATCC 25922, МПК колистина <1 мг/л; исследуемые штаммы расположены в рядах В–Н: ряд В – *K. pneumoniae* 49-287, МПК 2 мг/л; ряд С – гетерорезистентный к колистину изолят *K. pneumoniae* 36-2246, МПК 128 мг/л; ряд D – *K. pneumoniae* 36-2709, МПК 128 мг/л; ряд E – *K. pneumoniae* 46-82, МПК <1 мг/л; ряд F – *K. pneumoniae* 56-1715, МПК >1024 мг/л; ряд G – *K. pneumoniae* 68-1600, МПК 2 мг/л; ряд H – *K. pneumoniae* 58-2512, МПК <1 мкг/мл.

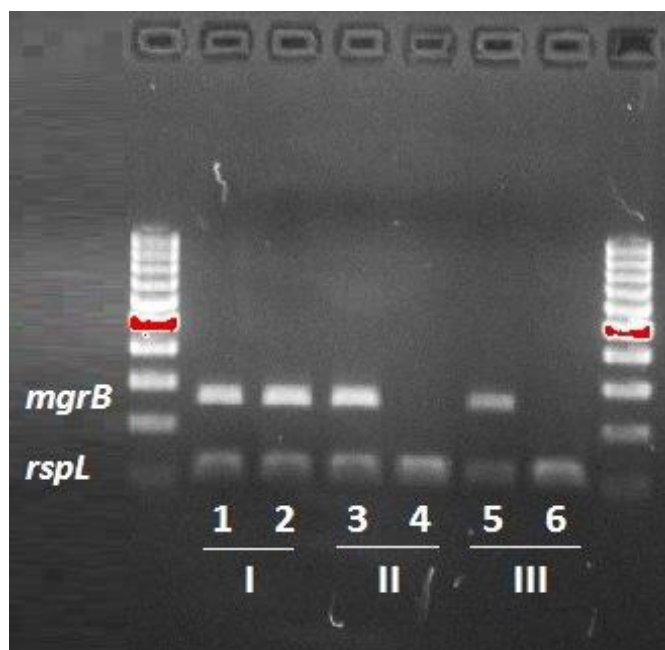


Рисунок 4.5. Результаты электрофореза продуктов амплификации гена *mgrB* у гетерорезистентных к колистину изолятов *K. pneumoniae*

Примечание. *mgrB* был исследован у трех гетерорезистентных изолятов (I-III). Представлены бактериальные популяции в целом (линии 1, 3, 5) и Кол-Р субпопуляции (линии 2, 4, 6). Обращает внимание делеция *mgrB* в Кол-Р субпопуляциях изолятов II и III (линии 4 и 6). Ген *rspL* использовали для контроля амплификации.

Таким образом, предполагаемый механизм устойчивости к колистину был выявлен у 37% исследованных Кол-Р *K. pneumoniae*. Ведущим механизмом устойчивости было изменение гена *mgrB* различными вставочными элементами (семейства IS1 и IS5). Новый тип вставочного элемента, инактивирующего *mgrB*, был обнаружен в шести изолятах ST307. Следует отметить, что два изолята с делецией *mgrB* продемонстрировали гетерорезистентность к колистину, что свидетельствует о том, что этот вариант изменения *mgrB* может быть одним из механизмов появления колистин-гетерорезистентного фенотипа у *K. pneumoniae*. Проведенный анализ полных геномов с целью поиска альтернативных механизмов резистентности к колистину позволил выявить дополнительный механизм устойчивости к колистину для одного Кол-Р изолята.

Глава 5. Бактериальный фитнес колистинрезистентных *Klebsiella pneumoniae*

Мутации, приводящие к возникновению резистентности к колистину, в том числе связанные с модификацией ЛПС, дают бактериям преимущество над чувствительными штаммами в присутствии антибиотика. Однако формирование и поддержание резистентности может быть сопряжено со снижением бактериального фитнеса, т.е. уровня приспособленности к жизнедеятельности. В данном исследовании мы оценили влияние колистинрезистентности на бактериальный фитнес изолятов *K. pneumoniae* в разных условиях.

Кинетика роста Кол-Р и Кол-Ч изолятов *K. pneumoniae* в отсутствие колистина различалась незначимо, медианы ПКР составили 4,2 (3,9; 4,3) и 4,05 (3,9; 4,6) ОП₆₀₀ за 1 ч соответственно ($p = 0,842$; таблица 5.1).

Добавление 1 мг/л колистина угнетало ПКР Кол-Ч изолятов до 1,9 (0,95; 4,13) ОП₆₀₀ за 1 ч ($p=0,065$), а более высокие концентрации колистина ожидаемо полностью подавляли рост чувствительных изолятов (таблица 5.1). Кол-Р *K. pneumoniae* сохраняли обычную кинетику роста при содержании колистина 1 мг/л и демонстрировали ее значимое снижение в присутствии 4 и 16 мг/л колистина ($p=0,016$ и $p<0,001$ соответственно). Почти полное угнетение роста Кол-Р изолятов наблюдалось при добавлении колистина в концентрации 64 мг/л, когда ПКР составила 0,9 (0; 3,0) ОП₆₀₀ за 1 ч (таблица 5.1).

Далее мы сравнили ПКР Кол-Р изолятов с поврежденным *mgrB* и *mgrB* дикого типа (таблица 5.1). Оказалось, что статус *mgrB* незначимо влиял на кинетику роста бактериальной популяции вне зависимости от концентрации колистина.

Затем мы провели исследование 26 Кол-Р изолятов и рассчитали ИК в экспериментах по оценке конкурентоспособности относительно Карба-Ч/Кол-Ч изолята *K. pneumoniae* при их совместном культивировании (рисунок 5.1, таблица 5.1). Среднее значение ИК составило 0,15 (0,21), при этом у 25/26 (96%) Кол-Р изолятов ИК был <1 и варьировал от 0,01 до 0,53, а один изолят имел ИК=1.

Изоляты с диким типом и повреждением *mgrB* обладали похожими ИК, которые составили 0,19 (0,26) и 0,1 (0,1) соответственно ($p=0,283$; таблица 5.1). Таким образом, резистентность к колистину у подавляющего числа Кол-Р *K. pneumoniae* была ассоциирована со снижением конкурентоспособности по отношению к Карба-Ч/Кол-Ч *K. pneumoniae*, которое не зависело от статуса гена *mgrB*.

Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес было дополнительно исследовано в Карба-Р/Кол-Ч и Карба-Р/Кол-Р парах *K. pneumoniae*, относящихся к одному сиквенс-типу. Для данных экспериментов были отобраны изоляты пяти наиболее распространенных (ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395) и одного редкого (ST147) сиквенс-типов, среди которых в коллекции имелся, по меньшей мере, один Кол-Ч изолят (таблица 5.2). Конкурентоспособность всех Кол-Р изолятов ST48, ST147, ST307 и ST377 относительно Кол-Ч изолятов аналогичных сиквенс-типов была снижена, о чем свидетельствовал $ИК < 1$. Результаты исследования изолятов двух других сиквенс-типов, ST23 и ST395, не были так однозначны. Один Кол-Р изолят ST23 ($ИК=1,3$) и два Кол-Р изолята ST395 ($ИК=1,87$ и $ИК=2,5$) продемонстрировали повышенный фитнес относительно своих Кол-Ч аналогов (таблица 5.2).

Таким образом, анализ полученных данных позволяет сделать следующие выводы: устойчивость к колистину не влияет на кинетику роста в его отсутствие и не зависит от статуса гена *mgrB*; подавляющее большинство Кол-Р изолятов проявили сниженную конкурентоспособность по сравнению с Кол-Ч *K. pneumoniae*, однако в рамках одного сиквенс-типа встречаются Кол-Р изоляты с повышенной конкурентоспособностью.

**Влияние устойчивости к колистину на бактериальный фитнес (кинетику роста и индекс конкуренции)
карбапенемрезистентных *K. pneumoniae***

Изоляты	МПК колистина (мг/л), Ме (P25; P75)	ПКР (ОП ₆₀₀ за 1 ч), Ме (P25; P75)					ИК, Среднее (СО)
		Концентрация колистина (мг/л)					
		0	1	4	16	64	
Кол-Ч (n=6)	<1 (<1; <1)	4,05 (3,9; 4,6)	1,9 (0,95; 4,13)	0 (0; 4,03)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	НП
Кол-Р (n=32)	256 (128; 512)	4,2 (3,9; 4,3) ^а	4,1 (3,7; 4,2) ^б	3,9 (3,2; 4,15) ^в	3,3 (2,2; 3,45) ^г	0,9 (0; 3) ^г	0,15 (0,21) ^ж
Из них:							
Поврежденный <i>mgrB</i> (n=15)	256 (128; 512)	4,1 (3,9; 4,2)	4 (3,9; 4,2)	3,9 (3,1; 4,1)	3,4 (0,9; 3,7)	1,1 (0; 3,3)	0,1 (0,1) ^и
<i>mgrB</i> , дикий тип (n=17)	256 (96; 512)	4,3 (3,85; 4,4) ^д	4,2 (3,53; 4,25) ^д	3,8 (3,18; 4,25) ^д	3,25 (2,75; 3,43) ^д	0,9 (0; 3) ^д	0,19 (0,26) ^{е, к}

Примечание. МПК – минимальная подавляющая концентрация; ПКР – площадь под кривой роста; Ме – медиана; P25 и P75 – 25-й и 75-й перцентили; ИК – индекс конкуренции; СО – стандартное отклонение; Кол-Ч – колистинчувствительные; Кол-Р – колистинрезистентные; НП – не применимо.

^а p=0,842 при сравнении с ПКР Кол-Ч

^б p=0,19 при сравнении с ПКР Кол-Р при концентрации колистина 0 мг/л

^в p=0,016 при сравнении с ПКР Кол-Р при концентрации колистина 0 мг/л

^г p<0,001 при сравнении с ПКР Кол-Р при концентрации колистина 0 мг/л

^д p>0,05 при сравнении с ПКР Кол-Р изолятов с поврежденным *mgrB*

^е p=0,283 при сравнении с ПКР Кол-Р изолятов с поврежденным *mgrB*

^ж n=26

^и n=11

^к n=15

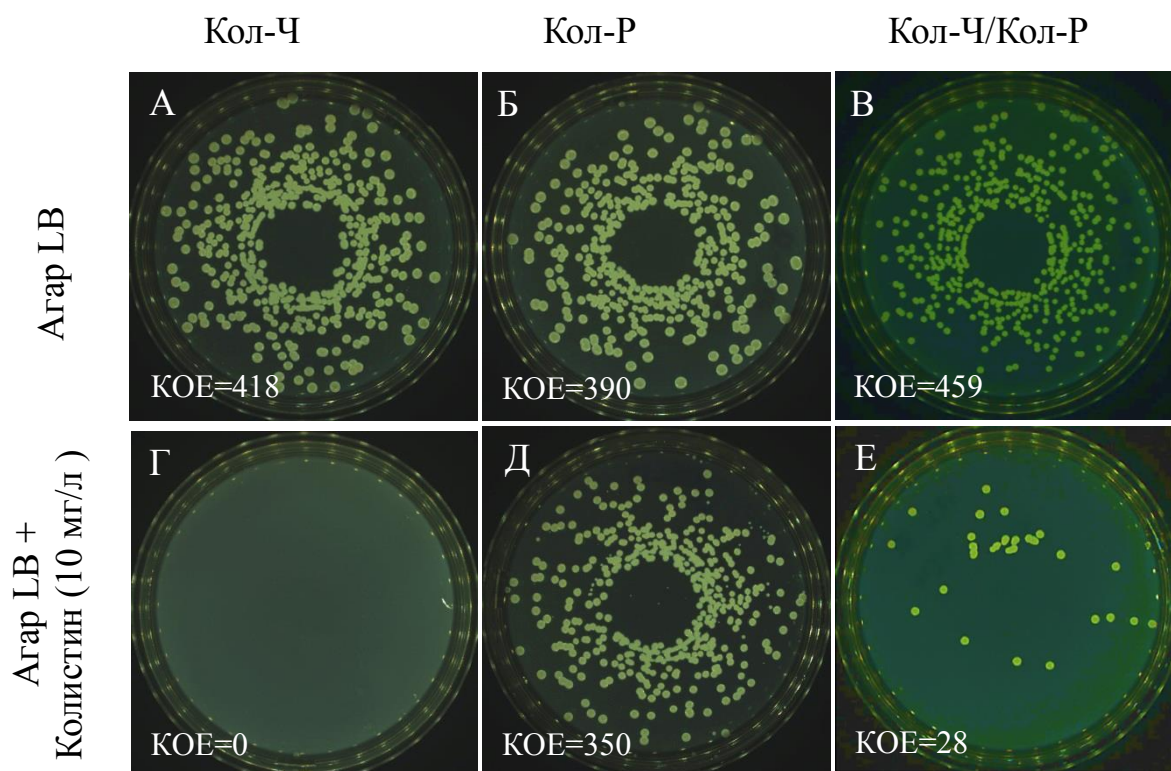


Рисунок 5.1. Фото репрезентативного эксперимента по оценке конкурентоспособности колистинрезистентных *K. pneumoniae*

Примечание. Кол-Ч – колистинчувствительные; Кол-Р – колистинрезистентные; Кол-Ч /Кол-Р – смесь колистинчувствительных и колистинрезистентных изолятов; КОЕ – колониеобразующие единицы.

На рисунке представлены фото чашек Петри, демонстрирующие характер роста Кол-Ч (А, Г), Кол-Р (Б, Д) и смеси Кол-Р/Кол-Ч (В, Е) изолятов *K. pneumoniae* на агаре LB без колистина (А, Б, В) и агаре LB с содержанием 10 мг/л колистина (Г, Д, Е). Цифры указывают число КОЕ на каждой чашке. Индекс конкурентоспособности (ИК) рассчитывается как (число КОЕ на LB+колистин)/(число КОЕ на LB - число КОЕ на LB+колистин), т.е. $\text{КОЕ «Е»} / (\text{КОЕ «В»} - \text{КОЕ «Е»})$.

**Индекс конкуренции колистинрезистентных и колистинчувствительных
изолятов карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* одинаковых сиквенс-типов**

Кол-Р изоляты		Механизм резистентности	Число КОЕ после посева смеси Кол-Р/Кол-Ч ^а		ИК ^{а, г}
ST	№ изолята		на чашке с колистином (10 мг/л) ^б	на чашке без колистина ^в	
ST23	37261	Неизвестный	80	141	1,3
	69-77	Поврежденный <i>mgrB</i>	39	168	0,3
	37243	Неизвестный	25	112	0,29
	37224	Неизвестный	5	114	0,05
Итого ST23:			37 (32)	134 (26)	0,48 (0,56)
ST395	52-1659	Поврежденный <i>mgrB</i>	88	135	1,87
	78-1127	Неизвестный	3	138	0,02
	59-397	Неизвестный	110	153	2,5
	4469	Поврежденный <i>mgrB</i>	17	141	0,14
Итого ST395:			55 (53)	142 (8)	1,1 (1,24)
ST377	76-1648	Неизвестный	90	335	0,37
	76-2053	Неизвестный	38	282	0,16
	76-2089	Поврежденный <i>mgrB</i>	79	232	0,52
Итого ST377:			69 (27)	283 (52)	0,35 (0,18)
ST307	64-574	Поврежденный <i>mgrB</i>	33	287	0,13
	56-566	Поврежденный <i>mgrB</i>	68	210	0,48
	71-1375	Поврежденный <i>mgrB</i>	63	196	0,47
Итого ST307:			55 (19)	231 (49)	0,36 (0,2)
ST147	37-262	Поврежденный <i>mgrB</i>	3	201	0,02
ST48	58-2966	Поврежденный <i>mgrB</i>	8	152	0,06

Примечание. ИК – индекс конкуренции.

^а В строках «Итого» указано среднее (стандартное отклонение) соответствующих показателей.

^б Условия, как на рисунке 5.1 (Е).

^в Условия, как на рисунке 5.1 (В).

^г ИК рассчитывали как отношение числа КОЕ после посева из смеси Кол-Р/Кол-Ч на чашке LB+колистин к числу КОЕ на чашке с LB без колистина. ИК <1 означал сниженную конкурентоспособность Кол-Р изолята относительно своих Кол-Ч аналогов; ИК >1 означал повышенную конкурентоспособность Кол-Р изолята относительно своих Кол-Ч аналогов (см. раздел 2.3. Фитнес бактерий).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

K. pneumoniae как в Российской Федерации, так и во всем мире является одним из наиболее значимых госпитальных патогенов, поскольку характеризуется способностью быстро приобретать резистентность ко многим группам антибиотиков. В настоящей работе была исследована молекулярная эпидемиология, механизмы устойчивости к карбапенемам и колистину, а также бактериальный фитнес госпитальных штаммов *K. pneumoniae*, полученных в трех стационарах г. Москвы.

Большинство Карба-Р *K. pneumoniae* в нашей коллекции относилось к пяти глобальным клонам, причем два генотипа, ST307 и ST395, суммарно охватывали долю 54%. *K. pneumoniae* ST307 в настоящее время становится международным клоном высокого риска [155]. *K. pneumoniae* ST307, ассоциированная с продукцией КРС, впервые была обнаружена в США, и впоследствии распространилась по всему миру; реже ST307-изоляты ассоциированы с продукцией NDM-1 и OXA-48-подобных карбапенемаз [155]. По данным ряда авторов, ST307 ранее не входил в число доминирующих клонов на территории нашей страны [2, 10, 17], но в настоящее время ST307 становится одним из ведущих международных клонов высокого риска [155], что согласуется с полученными нами данными. ST395-изоляты, продуцирующие КРС и OXA-48-подобные карбапенемазы, уже были обнаружены в некоторых странах, включая Францию, Венгрию, Италию, Польшу и Китай [78, 84, 92, 100]. Таким образом, полученные результаты согласуются с другими сообщениями из России о том, что Карба-Р OXA-48-ассоциированные клоны *K. pneumoniae* распространились по всей стране [17, 66]. Хотя OXA-48-продуцирующие изоляты могут демонстрировать чувствительный к карбапенемам или чувствительный с увеличенной экспозицией антибиотика фенотип, практически стандартная комбинация OXA-48 и БЛРС среди клинических *K. pneumoniae* дает высокий уровень устойчивости к карбапенемам [113]. Тем не менее, КРС-продуцирующие изоляты, обычно ассоциированные с ST258 и родственными сиквенс-типами, были описаны в

Санкт-Петербурге [21, 89]. В исследованной коллекции только два изолята ST15 являлись продуцентами КРС-3. С момента первого обнаружения ОХА-48-продуцирующего клинического изолята *K. pneumoniae* в Турции в 2011 году, продуценты ОХА-48-подобных карбапенемаз распространялись по всему миру и сейчас эндемически обнаруживаются в Египте, Индии, Турции и некоторых других странах [78, 90, 127].

Существенная доля (45%) исследованных нами Карба-Р изолятов была устойчива к колистину. По данным многоцентрового исследования «МАРАФОН» [16], в большой выборке госпитальных *K. pneumoniae* распространенность Кол-Р изолятов была низкой, хотя и возросла с 4,5% в 2012 г. до 7,9% в 2014 г. Наши данные могут отражать общий тренд повышения антибиотикорезистентности, который затрагивает и устойчивость к колистину. Например, 15-летнее ретроспективное исследование в крупном госпитале в Афинах показало резкое увеличение доли Кол-Р изолятов *K. pneumoniae* из гемокультур с 0% в 2002 г. до 26,9% в 2016 [27]. С другой стороны, высокая частота колистинрезистентности в нашей коллекции могла быть связана с преобладанием изолятов, полученных в отделениях реанимации и интенсивной терапии, где, по данным Feretzakis и соавт. [59], доля Кол-Р *K. pneumoniae* можеткратно превышать долю таких изолятов в других отделениях (40% против 13,8%).

Кроме того, преобладание Кол-Р бактерий может быть выше в Карба-Р популяции [59], как в случае с нашей исследуемой коллекцией. Действительно, факторы риска появления Кол-Р *K. pneumoniae* включают среди прочего предшествующий инфекционный процесс, вызванный устойчивыми к карбапенемам бактериями, а также терапию карбапенемами в предыдущие 90 дней [132]. Кроме того, прямое сравнение исследований, использующих различные способы тестирования устойчивости к колистину, может иметь известные трудности. Так, эпсилотрические Е-тесты могут давать высокую долю ошибочных результатов по сравнению с референсным методом микроразведений в бульоне, препятствуя выявлению реальной частоты колистинрезистентности [1, 18, 148].

В своей работе мы сравнили методы Е-тестов и VITEK 2 Compact с эталонным ММР для определения МПК к колистину у Карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Оказалось, что оба тестируемых метода существенно занижают истинную долю Кол-Р изолятов. Для метода Е-тестов был рассчитан процент очень существенной ошибки (VME) равный 26%, при котором 16 штаммов были оценены как чувствительные данным методом и как резистентные с помощью ММР: коэффициенты полного согласия (ЕА) и категорийного согласия (СА) были 72% и 87% соответственно. Другие исследования также показали разногласие между референсным ММР и другими методами определения МПК к колистину. Так, VME для Е-тестов составила 41,5% по данным Daforoulou [48], а коэффициенты ЕА и СА составили 48,8% и 56,1% соответственно. Похожие результаты были получены в исследовании Rojas [133] - значение VME составило 35%. Отличные от рекомендаций [65] значения коэффициентов эффективности были получены при определении МПК к колистину с помощью анализатора VITEK 2 Compact. Недостаточные значения показателей полного согласия (ЕА) и категорийного согласия (СА) (80% и 82%), а также высокая частота очень существенной ошибки (VME) (34%) показали ненадежность данного метода для определения чувствительности к колистину. В зарубежной литературе этот метод также не рекомендуют использовать для определения значений МПК к колистину [42, 152].

Определение чувствительности к колистину с помощью ММР в оптимальных условиях потребовало повторного тестирования у восьми штаммов *K. pneumoniae*. Трудности в определении МПК к колистину, а именно прерывистый рост культуры, были описаны ранее [76, 86, 133]. Вероятно, это может быть связано с наличием гетерорезистентности к колистину у *K. pneumoniae* – феномена, описывающего вариабельность чувствительности к определенному антибиотику во внешне изогенной бактериальной популяции [125].

Вероятный механизм устойчивости к колистину был определен у 36% исследованных Кол-Р *K. pneumoniae*. В большинстве случаев мы обнаружили

повреждение гена *mgrB* за счет вставочных элементов и крупных делеций. Среди исследованных Кол-Р *K. pneumoniae* не было обнаружено *mcr-1*-позитивных изолятов. Однако не следует исключать возможную роль *mcr*-гомологов [106, 153]. Следует отметить, что два из четырех изолятов с делецией *mgrB* продемонстрировали колистин-гетерорезистентность, что свидетельствует о том, что этот вариант изменения *mgrB* представляет собой один из механизмов, присущих колистин-гетерорезистентному фенотипу *K. pneumoniae*, как было описано ранее [74].

IS1- и IS5-подобные вставки, выявленные в ходе настоящего исследования, описаны в числе частых инактиваторов *mgrB* у *K. pneumoniae* [31, 38, 124, 125]. У шести изолятов ST307 мы описали новый тип вставки в гене *mgrB*, MITE*Kpn1*, который был внедрен между нуклеотидными позициями 74 и 75. Этот участок *mgrB* является «горячей точкой» для IS5-подобных элементов, таких как IS*Kpn26* [138]. Интересно, что MITE*Kpn1* был ретроспективно обнаружен нами в гене основного поринового белка *ompK36* у двух Кол-Р и одного Кол-Ч изолятов ST307 и при анализе результатов полногеномного секвенирования в геноме Кол-Р и Кол-Ч изолятов ST395. Таким образом, у 11 из 159 (7%) Карба-Р изолятов *K. pneumoniae* был обнаружен MITE*Kpn1*.

Теоретически, при наличии таких «горячих точек» миграция по бактериальному геному небольших вставочных элементов, подобных MITE*Kpn1*, может облегчать формирование колистинрезистентности даже в отсутствие селективного давления антибиотика. Эта гипотеза может служить одним из объяснений возникновения Кол-Р *K. pneumoniae* без предшествующего воздействия колистина, а также феномена гетерорезистентности среди клинических Кол-Ч изолятов и в референсном штамме *K. pneumoniae* ATCC13883 [27].

Наличие устойчивости к колистину не влияло на кинетику роста в отсутствие антибиотика и не зависело от статуса гена *mgrB*, что согласуется с результатами предыдущих исследований [39]. В противоположность этому, устойчивость к колистину у *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa*

сопровождается выраженными нарушениями динамики роста бактериальной популяции [107, 109], что может объяснять сравнительно высокую распространенность энтеробактерий с хромосомной устойчивостью к колистину по сравнению с Кол-Р *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

В то же время, подавляющее большинство Кол-Р изолятов демонстрировали снижение конкурентоспособности по сравнению с Кол-Ч *K. pneumoniae*, что характерно и для других видов бактерий, в частности, *A. baumannii* [30, 96] и *P. aeruginosa* [91, 107]. Описано снижение бактериального фитнеса у Кол-Р *K. pneumoniae*, являющихся носителями гена *mcr-1* [109].

Интересные результаты были получены в конкурентных экспериментах с Кол-Р и Кол-Ч изолятами *K. pneumoniae* одного сиквенс-типа, т.е. бактериями с очень похожим генотипом, но отличающимися чувствительностью к колистину. Было исследовано шесть разных сиквенс-типов, и большинство протестированных Кол-Р изолятов демонстрировали снижение ИК. В то же время, у двух Кол-Р ST395-изолятов и одного Кол-Р ST23-изолята уровень конкурентоспособности оказался выше, чем у Кол-Ч изолятов аналогичных ST. Это можно объяснить наличием в их геноме возможных компенсаторных мутаций, как было описано в случае с резистентностью к фторхинолонам и колистину у *E. coli* [101] и *A. baumannii* [108]. Компенсаторные мутации в противовес мутациям, приводящим к резистентности, увеличивают бактериальный фитнес резистентных изолятов и тем самым способствуют распространению устойчивости даже в отсутствие селективного воздействия антибиотика [101, 108].

Таким образом, *bla*_{OXA-48-like}-ассоциированные *K. pneumoniae* ST307-изоляты являются доминирующей клональной линией в г. Москве. Высокая распространенность колистинрезистентности среди Карба-Р *K. pneumoniae* диктует необходимость срочных мер для сохранения активности колистина в качестве терапевтического антимикробного препарата, что еще раз подчеркивает необходимость выбора правильного метода определения МПК.

Настораживающая эпидемиологическая ситуация в отношении Кол-Р бактерий требует проведения дальнейшего тщательного мониторинга.

ВЫВОДЫ

1. Среди карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* доминировали пять глобально распространенных генотипов, включая ST23, ST48, ST307, ST377 и ST395, которые суммарно составили долю в 86%.

2. Ведущим механизмом устойчивости к карбапенемам стало носительство ОХА-48-подобных карбапенемаз, которые были выявлены у 92% карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*; 7% изолятов содержали *bla*_{NDM-1}.

3. Для определения МПК колистина следует использовать метод микроразведений в бульоне.

4. Устойчивостью к колистину (МПК>2 мг/л) обладали 45% карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*. У 32% колистинрезистентных изолятов резистентность была обусловлена повреждениями гена *mgrB*, преимущественно вставочными элементами.

5. В геноме 11 изолятов карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* выявлен новый вставочный миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами *MITEKpn1*, который у шести изолятов был встроен в ген *mgrB*.

6. Наличие устойчивости к колистину не влияло на кинетику роста карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*, однако при исследовании конкурентоспособности в парных экспериментах большинство (14/16, 87%) протестированных колистинрезистентных изолятов обнаружили сниженный бактериальный фитнес относительно колистинчувствительных изолятов аналогичных сиквенс-типов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Необходим постоянный мониторинг детерминант резистентности к карбапенемам штаммов *K. pneumoniae* с целью обеспечения адекватной этиотропной терапии.
2. Для анализа распространения сиквенс-типов, ассоциированных с генами резистентности, целесообразно проводить мультилокусное сиквенс-типирование.
3. Во избежание перехода чувствительных штаммов в категорию резистентных целесообразно своевременное выявление штаммов с гетерорезистентностью к колистину и правильное определение минимальных подавляющих концентраций колистина при помощи метода микроразведений в бульоне.
4. В качестве эпидемиологического маркера возникновения резистентности к колистину можно использовать вставочные элементы, ответственные за инактивацию *mcrB* гена.
5. Необходимо учитывать сниженную конкурентоспособность колистинрезистентных штаммов *K. pneumoniae* без локального давления антибиотика в окружающей среде по сравнению с чувствительной популяцией.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Продолжение мониторинга циркулирующих карбапенемрезистентных изолятов *K. pneumoniae* в стационарах с использованием методов молекулярной эпидемиологии.
2. Продолжение исследований, направленных на выявление детерминант устойчивости к карбапенемам изолятов *K. pneumoniae*.
3. Продолжение исследований, направленных на выявление механизмов резистентности к колистину.
4. Изучение влияния резистентности к колистину, а также к другим антибиотикам на бактериальный фитнес.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АМП - антимикробный препарат
- БЛРС - β -лактамаза расширенного спектра
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИК - индекс конкуренции
- ИСМП - инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
- Карба-Р - штаммы микроорганизмов, резистентные к карбапенемам
- Карба-Ч - штаммы микроорганизмов, чувствительные к карбапенемам
- Кол-Р - штаммы микроорганизмов, резистентные к колистину
- Кол-Ч - штаммы микроорганизмов, чувствительные к колистину
- ЛПС - липополисахарид
- МБЛ - металло- β -лактамазы
- МГЭ - мобильные генетические элементы
- МЛСТ - мультилокусное сиквенс-типирование
- МЛУ - множественная лекарственная устойчивость
- ММР - метод микроразведений в бульоне
- МПК - минимальная подавляющая концентрация
- ОРИТ - отделение реанимации и интенсивной терапии
- ПКР - площадь под кривой роста
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- СА - categorical agreement, категорийное согласие
- ЕА - essential agreement, полное согласие
- IS - инсерционные последовательности
- LB - агар Лурия-Бертани
- ME - major error, существенная ошибка
- MITE - Miniature Inverted-repeat Transposable Element
- ОП₆₀₀ - оптическая плотность на длине волны 600 нм
- ST - сиквенс-тип
- VME - very major error, очень существенная ошибка

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеевец В.А. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп / В.А. Агеевец, И.В. Партина, Е.С. Лисицына, И.М. Батыршин, Л.Н. Попенко, С.А. Шляпников, Е.Н. Ильина, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. - 2013. - Т. 58. - № 3–4. - С. 10–13.
2. Агеевец В.А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства *Enterobacteriaceae* выделенных в Санкт-Петербурге: дисс. канд. биол. наук.03.02.03 / Агеевец Владимир Андреевич. - СПб., 2016. - С. 137.
3. Баранцевич Е.П. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге / Е.П.Баранцевич, Н.Е. Баранцевич, Е.В. Шляхто // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2016. - Т.18. - № 3. - С. 196–199.
4. ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни: дата введения 2012-03-01. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200083430> (дата обращения: 14.07.2018). – Текст: электронный.
5. Гюлазян Н.М. Липополисахариды/Эндотоксины грамотрицательных бактерий: роль в развитии интоксикации / Н.М. Гюлазян, О.Ф. Белая, В.А. Малов, С.Г. Пак, Е.В. Волчкова // Эпидемиология и инфекционные болезни. -2014. - № 2. - С. 11-16.
6. Клинические рекомендации. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. – Введ. 2018-03. – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2018. – 206 с.
7. 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: дисс. канд. мед. наук: 03.02.03 / Крыжановская Ольга Андреевна. – М., 2016. – С.119.

8. Лабинская, А.С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская. – Изд. 4-е, перераб. и доп. М.: Медицина, 2005 г. – 394 с.

9. Лагун Л.В. Бета-лактамазы расширенного спектра и их значение в формировании устойчивости возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антибактериальным препаратам / Л.В. Лагун // Проблемы здоровья и экологии. - 2012. - Т.33. - № 3. - С. 82–88.

10. Лазарева И.В. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию / И.В. Лазарева, П.С. Старкова, В.А. Агеевец, М.О. Волкова, М.С.Лебедева, А.С. Навацкая, Е.Б. Мясникова, Г.В. Митрошина, С.В. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия. - 2018. – Т.63. - № 11–12. - С. 18–23.

11. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. МУК 4.2. 1890-04.

12. Новикова О.Д. Порообразующие белки наружной мембраны некоторых грамотрицательных бактерий. Структура и свойства / О.Д. Новикова, В.А. Хоменко, О.П. Вострикова, О.Ю. Портнягина, О.В. Сидорова, Д.К. Чистюлин, Т.Ф. Соловьева // Вестник ДВО РАН. - 2014. - №1. - С. 120–134.

13. Сидоренко С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. - 2004. - №44. - С. 263–306.

14. Страчунский Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусов, С.Н. Козлов // НИИАХ СГМА. - Смоленск, 2007. - С. 420.

15. 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 и соавт. //

Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2014. - Т.16. - № 4. - С. 254–265.

16. Сухорукова М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН» 2013-2014 / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Скленова, Н.В. Иванчик и соавт. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2017. - Т.19. - № 1. - С. 49–56.

17. Шайдуллина Э.Р. Антибиотикорезистентность нозокомиальных карбапенемазопродуцирующих штаммов *Enterobacterales* в России: результаты эпидемиологического исследования 2014-2016 гг. / Э.Р. Шайдуллина, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Скленова, М.В. Сухорукова, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2018. - Т.20. - № 4. - С. 362–369.

18. Шамина О. В. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / О.В. Шамина, О.А. Крыжановская, А.В. Лазарева, С.В. Поликарпова, О.В. Карасёва, И.В. Чеботарь, Н.А. Маянский // Клиническая лабораторная диагностика. - 2018. - Т.63. - № 10. - С. 646–650.

19. Яковлев С.В. Распространённость и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование эргини / С.В. Яковлев, М.П. Суворова, В.Б. Белобородов, Е.Е. Басин, Е.В. Елисеева, С.В. Ковеленов, У.С. Портнягина, А.А. Абрамовна, В.А. Руднов, О.Н. Барканова // Антибиотики и химиотерапия. – 2016. – Т.61. - № 5–6. - С. 32–42.

20. Afzali H. Characterization of CTX-M-type extend-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella spp.* in Kashan, Iran / H. Afzali, F. Firoozeh, A. Amiri, R. Moniri, M. Zibaei // Jundishapur Journal of Microbiology. - 2015. - Vol. 8. - № 10. - P. 1–5.

21. 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 // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2014. - Vol. 44. - № 2. - P. 152–155.

22. Ah Y.M. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* / Y.M. Ah, A.J. Kim,

J.Y. Lee // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2014. - Vol. 44. - № 1. - P. 8–15.

23. Ambler, R.P. The structure of β -lactamases / R.P. Ambler // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1980. – № 289. – P. 321–331.

24. Athamna A. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of attachment and ingestion stages of bacterial phagocytosis / A. Athamna, I. Ofek // Journal of Clinical Microbiology. - 1988. - Vol. 26. - № 1. - P. 62–66.

25. Bachman M.A. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia [Электронный ресурс] / M.A. Bachman, S. Lenio, L. Schmidt, J.E. Oyler, J.N. Weiser // mBio. - 2012. - Vol.3. - № 6. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3509427/>

26. Baron S. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns / S. Baron, L. Hadjadj, J.M. Rolain, A.O. Olaitan // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2016. - Vol.48. - № 6. - P. 583–591.

27. Barragan-Prada H. Emergence and dissemination of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates expressing OXA-48 plus CTX-M-15 in patients not previously treated with colistin in a Spanish university hospital / H. Barragan-Prada, P. Ruiz-Hueso, A.P. Tedim, F. González-Candelas, J.C. Galan, R. Canton, M.I. Morosini // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2019. - Vol. 93. - № 2. - P. 147–153.

28. Basic local alignment search tool: сайт. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. (дата обращения: 15.01.201). – Текст: электронный.

29. Bassetti M. How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections [Электронный ресурс] / M. Bassetti, A.Vena, A. Croxatto, E. Righi, B. Guery // Drugs in Context. - 2018. – Vol.7. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29872449/>

30. Beceiro A. Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii* / A. Beceiro, A. Moreno, N.

Fernández, J.A. Vallejo, J. Aranda, B. Adler, M. Harper, J.D. Boyce, G. Bou // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2014. - Vol. 58. – № 1. - P. 518–526.

31. Berglund B. Insertion sequence transpositions and point mutations in *mgrB* causing colistin resistance in a clinical strain of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Vietnam / B. Berglund, N.T.B. Hoang, M. Tärnberg, N.K. Le, O. Svartström, D.T.K. Khu, M. Nilsson, H.T. Le, J. Welander, L. Olson, M. Larsson, L.E. Nilsson, H. Hanberger // International Journal of Antimicrobial Agents. - 2018. - Vol.51. – № 5. - P. 789–793.

32. Bij A.K. Van der. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae* / A.K. van der Bij, J.D.D. Pitout // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2012. - Vol. 67. – № 9. - P. 2090–2100.

33. Bontron S., Poirel L., Nordmann P. Real-time PCR for detection of plasmid-mediated polymyxin resistance (*mcr-1*) from cultured bacteria and stools / S. Bontron, L. Poirel, P. Nordmann // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2016. - Vol.71. – № 8. - P. 2318–2320.

34. Brock J.H. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms / J.H. Brock, P.H.Williams, J. Liceaga, K.G.Wooldridge, // Infection and Immunity. - 1991. - Vol.59. – № 9. - P. 3185–3190.

35. Bush K. Updated functional classification of β -lactamases / K. Bush, G.A. Jacoby // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2010. - Vol. 54. – № 3. - P. 969–976.

36. Campos M.A. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides / M.A. Campos, M.A. Vargas, V. Regueiro, C.M. Llompart, S.Alberti, J.A. Bengoechea // Infection and Immunity. - 2004. - Vol.72. – № 12. - P. 7107–7114.

37. Cannatelli A. In Vivo Emergence of Colistin Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Producing KPC-Type Carbapenemases Mediated by Insertional Inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB Regulator / A. Cannatelli, M.M. D’Andrea, T.Giani, V.D. Pilato, F. Arena, S. Ambretti, P. Gaibani, G.M. Rossolini // Antimicrobial

Agents and Chemotherapy. - 2013. - Vol.57. – № 11. - P. 5521–5526.

38. Cannatelli A. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin / A. Cannatelli, T. Giani, M.M.D'Andrea, V.D. Pilato, F. Arena, V. Conte, K. Tryfinopoulou, the COLGRIT Study Group, A. Vatopoulos, G. M. Rossolini // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2014. - Vol.58. – № 10. - P. 5696–5703.

39. Cannatelli A. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae* / A. Cannatelli, A. Santos-Lopez, T. Giani, B. Gonzalez-Zorn, G.M. Rossolini // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2015. - Vol.59. – № 5. - P. 2898–2900.

40. Chandler M. Insertion Sequences Revisited / M. Chandler, J. Mahillon // Mobile DNA II. - 2002. - Vol.2. - P. 305–366.

41. 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 in Microbiology. - 2014. - Vol. 22. – № 12. - P. 686–696.

42. Chew K.L. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and *mcr*-positive *Enterobacteriaceae*: comparison of sensititre, microScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution / K.L. Chew, M.V. La, R.T. P. Lin, J.W. P. Teo // Journal of Clinical Microbiology. - 2017. - Vol.55. – № 9. - P. 2609–2616.

43. Choi M.J. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains / M.J. Choi, K.S. Ko // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2015. - Vol.59. – № 11. - P. 6763–6773.

44. Choi M.J. Pathways regulating the *pbgP* operon and colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains / M.J. Choi, S. Kim, K.S. Ko // Journal of Microbiology and Biotechnology. - 2016. - Vol.26. – № 9. - P. 1620–1628.

45. Clegg S. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae* / S. Clegg, C.N. Murphy // Microbiology Spectrum. - 2016. - Vol.4. – № 1. - P. 1-17.

46. Cuzon G. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *blaKPC-2* gene / G. Cuzon, T. Naas, H.V. Truong, M.V. Villegas, K.T. Wisell, Y. Carmeli, A.C. Gales, S.N. Venezia, J.P. Quinn, P. Nordmann // Emerging

Infectious Diseases. - 2010. - Vol.16. – № 9. - P. 1349–1356.

47. Cuzon G. Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France / G. Cuzon, J. Ouanich, R. Gondret, T. Naas, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2011. - Vol.55. – № 5. - P. 2420–2423.

48. Dafopoulou K. Comparative evaluation of colistin susceptibility testing methods among carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates / K. Dafopoulou, O. Zarkotou, E. Dimitroulia, C. Hadjichristodoulou, V. Gennimata, S. Pournaras, A. Tsakris // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2015. - Vol. 59. – № 8. - P. 4625–4630.

49. Deris Z.Z. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity / Z.Z. Derisa, J. Aktera, S. Sivanesana, K.D. Robertsc, P.E. Thompsonc, R.L. Nationa, Jian Lia, T. Velkov // *The Journal of Antibiotics*. - 2014. - Vol.67. – № 2. - P. 147–151.

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

51. Dixon R.A. Polymyxin B and polymyxin B nonapeptide alter cytoplasmic membrane permeability in *Escherichia coli* / R.A. Dixon, I. Chopra // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 1986. - Vol. 18. – № 5. - P. 557–563.

52. Docquier J.D. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- β -lactamases / J.D. Docquier, J. Lamotte-Brasseur, M. Galleni, G. Amicosante, J. M. Frere, G.M.Rossolini // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2003. - Vol. 51. – № 2. - P. 257–266.

53. Domenech-Sanchez A. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: Its role in β -lactam antibiotic resistance / A. Domenech-Sanchez, S. Hernandez-Alles, L.Martinez-Martinez, V.J. Benedi, S. Alberti // *Journal of Bacteriology*. - 1999. - Vol. 181. – № 9. - P. 2726–2732.

54. Domenech-Sanchez A. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance / A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, S. Hernandez-

Alles, M.C. Conejo, A. Pascual, J.M. Tomas, S. Alberti, V.J. Benedi // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2003. - Vol.47. – № 10. - P. 3332–3335.

55. El-Halfawy O.M. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity / O.M. El-Halfawy, M.A. Valvano // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2015. - Vol.28. – № 1. - P. 191–207.

56. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [электронный ресурс] // Colistin Recommendations for MIC determination of colistin (polymyxin E) as recommended by the joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. - P. 1. - URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Recommendations_for_MIC_determination_of_colistin_March_2016.pdf/ (дата обращения: 22.06.2018).

57. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [электронный ресурс] // Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. – P. 11. – URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения: 10.11.2018).

58. Falagas M.E. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections / M.E. Falagas, S.K. Kasiakou // *The Pediatric Infectious Disease Journal*. – 2006. – Vol.12. – №42. – P. 1819.

59. Feretzakis G. A 2-year single-centre audit on antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* strains from an intensive care unit and other wards in a general public hospital in greece / G. Feretzakis, E. Loupelis, A. Sakagianni, N. Skarmoutsou, S. Michelidou, A. Velentza, M. Martsoukou, K.Valakis, S. Petropoulou, E. Koutalas // *Antibiotics*. - 2019. - Vol.8. – № 2. – P. 1-12.

60. Fertas-Aissani R.El. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens / R. El Fertas-Aissani, Y. Messai, S. Alouache, R. Bakour // *Pathologie Biologie*. - 2013. – Vol.61. – № 5. - P. 209–216.

61. Feschotte C. Plant transposable elements: Where genetics meets genomics / C. Feschotte, N. Jiang, S.R. Wessler // *Nature Reviews Genetics*. - 2002. – Vol.3. – № 5. - P. 329–341.

62. Fischbach M.A. In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase / M.A. Fischbach, H. Lin, D.R. Liu, C.T. Walsh // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2005. – Vol.102. – № 3. - P. 571–576.

63. Fischbach M.A. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2 / M.A. Fischbach, H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R.J. Abergel, D.R. Liu, K.N. Raymond, B.L. Wanner, R.K. Strong, C.T. Walsh, A. Aderem, K.D. Smith // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2006. – Vol.103. – № 44. - P. 16502–16507.

64. Follador R. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides [Электронный ресурс] / R. Follador, E. Heinz, K.L. Wyres, M.J. Ellington, M. Kowarik, K.E. Holt, N.R. Thomson // *Microbial genomics*. - 2016. – Vol.2. – № 8. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28348868/>

65. Food and Drug Administration Class II Special Controls Guidance Document: Antimicrobial Susceptibility Test (AST) Systems // Guidance for Industry and FDA. - P. 1–42. - URL: <https://www.fda.gov/medical-devices/guidance-documents-medical-devices-and-radiation-emitting-products/antimicrobial-susceptibility-test-ast-systems-class-ii-special-controls-guidance-industry-and-fda> (дата обращения: 12.09.2018).

66. Fursova N.K. The spread of *blaOXA-48* and *blaOXA-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 // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. - 2015. – Vol.14. – № 46. - P. 1–9.

67. Fursova N.K. Phenotypes and genotypes of classical and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clinical strains isolated in Moscow in 2013–2018 / N.K.

Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Lev, T.S. Novikova, G.N. Fedjukina, N.V. Volozhantsev // Russian Journal of Infection and Immunity. – 2018. – Vol.4. – №8. - P.603.

68. Gbarah A. Identification of the leukocyte adhesion molecules CD11 and CD18 as receptors for type 1-fimbriated (mannose-specific) *Escherichia coli* / A. Gbarah, C.G. Gahmberg, I. Ofek, U. Jacobi, N. Sharon // Infection and Immunity. - 1991. – Vol.59. – № 12. - P. 4524–4530.

69. Gomez-Simmonds A. Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* / A. Gomez-Simmonds, A.C. Uhlemann // The Journal of Infectious Diseases. - 2017. - № 215. - P. 18–27.

70. Groisman E.A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ / E.A. Groisman // Journal of Bacteriology. - 2001. – Vol. 183. – № 6. - P. 1835–1842.

71. Grundmann H. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts / H Grundmann, D.M. Livermore, C.G. Giske, R. Canton, G.M. Rossolini, J. Campos, A. Vatopoulos, M Gniadkowski, A. Toth, Y. Pfeifer, V. Jarlier, Y. Carmeli, the CNSE Working Group // Bulletin. - 2010. - Vol. 46. – № 15. – Режим доступа: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19711>

72. Gunn J.S. The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more / J.S. Gunn // Trends in Microbiology. - 2008. – Vol.16. – № 6. - P. 284–290.

73. Guo B. Predicting bacterial fitness cost associated with drug resistance / B. Guo, K. Abdelraouf, K.R. Ledesma, M. Nikolaou, V.H. Tam // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2012. – Vol.67. – № 4. - P. 928–932.

74. Halaby T. Genomic characterization of colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* during a nosocomial outbreak / T. Halaby, E. Kucukkose, A.B. Janssen, M.R.C. Rogers, D.J. Doorduijn, A.G.M. van der Zanden, N. Naiemi, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, W. van Schaik // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2016. – Vol.60. – № 11. - P. 6837–6843.

75. Hernandez-Alles S. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* / S.

Hernandez-Allesa, M. del Carmen Conejob, A. Pascualb, J.M. Tomasc, V.J. Benedia, L. Martinez-Martinez // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2000. – Vol.46. – № 2. - P. 273–277.

76. Hindler J.A. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant gram-negative bacilli / J.A. Hindler, R.M. Humphries // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2013. – Vol.51. – № 6. - P. 1678–1684.

77. ISfinder database: сайт. – URL: <http://www-is.biotoul.fr/is.html> (дата обращения: 12.08.2018). – Текст: электронный.

78. Izdebski R. *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in Poland, 2013-January 2017 / R. Izdebski, A. Baraniak, D. Zabicka, M. Machulska, P. Urbanowicz, J. Fiett, E. Literacka, K. Bojarska, A. Kozinska, B. Zieniuk, W. Hryniewicz, M. Gniadkowski, OXA-48-PL Study Group Collaborators // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2018. – Vol.73. – № 3. - P. 620–625.

79. Jacoby G.A. AmpC β -Lactamases / G.A. Jacoby // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2009. – Vol.22. – № 1. - P. 161–182.

80. Jayol A. Resistance to Colistin Associated with a Single Amino Acid Change in Protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Worldwide Origin / A. Jayol, L. Poirel, A. Brink, M.V. Villegas, M. Yilmaz, P. Nordmann // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2014. – Vol.58. – № 8. - P. 4762–4766.

81. Kaczmarek F.M. High-Level Carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -Lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin PhoE / F.M Kaczmarek, F.Dib-Hajj, W. Shang, T.D Gootz // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2006. – Vol.50. – № 10. - P. 3396–3406.

82. Kapitonov V. V. Universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase / V.V. Kapitonov, J.A. Jurka // *Nature Reviews Genetics*. - 2008. – Vol.9. – № 5. - P. 411–412.

83. Kitchel B. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258 / B. Kitchel, J.K. Rasheed, J.B. Patel, A. Srinivasan, S. Navon-Venezia, Y. Carmeli, A.

Brolund, C.G. Giske // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2009. –Vol.53. – № 8. - P. 3365–3370.

84. Kovacs K. Emergence and interhospital spread of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST395 clone in Western Hungary / K. Kovacs, A. Nyul, G. Mestyan, S. Meleg, H. Fenyvesi, G. Jakab, H. Szabo, L. Janvari, I. Damjanova, Á. Toth // *Infectious Diseases*. - 2017. – Vol.49. – № 3. - P. 231–233.

85. Lai Y.C. Identification of genes induced in vivo during *Klebsiella pneumoniae* CG43 infection / Y.C. Lai, H.L. Peng, H.Y. Chang // *Infection and Immunity*. - 2001. – Vol.69. – № 11. - P. 7140–7145.

86. Landman D. Irreproducible and uninterpretable polymyxin B MICs for *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes* / D. Landman, J. Salamera, J. Quale // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2013. – Vol.51. – № 12. - P. 4106–4111.

87. Lascols C. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America / C. Lascols, G. Peirano, M. Hackel, K. B. Laupland, J.D.D. Pitout // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2013. – Vol.57. – № 1. - P. 130–136.

88. Lawlor M.S. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection / M.S. Lawlor, C. O'Connor, V.L. Miller // *Infection and Immunity*. - 2007. – Vol. 75 . – № 3. - P. 1463–1472.

89. Lazareva I.V. Prevalence and antibiotic resistance of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg and some other regions of the Russian Federation. / I.V. Lazareva, V.A. Ageevets, T.A. Ershova, L.P. Zueva, A.E. Goncharov, M.G. Darina, Y.S. Svetlichnaya, A.N. Uskov, S.V. Sidorenko // *Antibiot Khimioter*. – 2016. – Vol.61. – №11-12. – P. 28-38.

90. Lee C.R. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods / C.R. Lee, J.H. Lee, K.S. Park, Y.B. Kim, B.C. Jeong, S.H. Lee // *Frontiers in Microbiology*. - 2016. – Vol.7. - P. 1–30.

91. Lee J.Y. Preservation of acquired colistin resistance in Gram-negative bacteria / J.Y. Lee, M.J. Choi, H.J. Choi, K.S. Ko // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2016. – Vol.60. – № 1. - P. 609–612.

92. Liapis E. Molecular epidemiology of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in France / E. Liapis, A. Pantel, J. Robert, M.H. Nicolas-Chanoine, L. Cavalie, N. van der Mee-Marquet, C. de Champs, N. Aissa, C. Eloy, V. Blanc, C. Guyeux, D. Hocquet, J.P. Lavigne, X. Bertrand, ONERBA // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2014. – Vol.20. – № 12. - P. O1121–O1123.

93. Limbago B.M. IMP-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States / B.M. Limbago, J.K. Rasheed, K.F. Anderson, W. Zhu, B. Kitchel, N. Watz, S. Munro, H. Gans, N. Banaei, A.J. Kallen // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2011. – Vol.49. – № 12. - P. 4239–4245.

94. Liu H. A novel *mcr-1* variant carried by an IncI2-Type plasmid identified from a multidrug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* / H. Liu, B. Zhu, B. Liang, X. Xu, S. Qiu, L. Jia, P. Li, L. Yang, Y. Li, Y. Xiang, J. Xie, L. Wang, C. Yang, Y. Sun, H. Song // *Frontiers in Microbiology*. - 2018. – Vol.9. - P. 1–8.

95. 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 // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2016. – Vol.16. – № 2. - P. 161–168.

96. Lopez-Rojas R. Impaired virulence and in vivo fitness of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* / R. Lopez-Rojas, J. Dominguez-Herrera, M.J. McConnell, F. Docobo-Perez, Y. Smani, M. Fernandez-Reyes, L. Rivas, J. Pachon // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2011. – Vol.203. – № 4. - P. 545–548.

97. Magiorakos A.P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance / A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L.

Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2012. – Vol.18. – № 3. - P. 268–281.

98. Magiorakos A.P. The rise of carbapenem resistance in Europe: Just the tip of the iceberg? / A.P. Magiorakos, C. Suetens, D.L. Monnet, C. Gagliotti, O.E. Heuer, EARS-Net Coordination Group and EARS-Net participants // *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. - 2013. -Vol. 2. – №1. – P. 6.

99. Mahillon J. Insertion sequences / J. Mahillon, M. Chandler // *Microbiology and Molecular Biology Review*. - 1998. – Vol.62. – № 3. - P. 725– 774.

100. Maida C.M. Outbreak of ST395 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy / C.M. Maida, C. Bonura, D.M. Geraci, G. Graziano, A. Carattoli, A. Rizzo, M.V. Torregrossa, D. Vecchio, M. Giuffre // *Infection Control and Hospital Epidemiology*. - 2018. - Vol.39. – № 4. – P. 496–498.

101. Marcusson L.L. Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness [Электронный ресурс] / L.L. Marcusson, N. Frimodt-Moller, D. Hughes // *PLoS Pathogens*. - 2009. Vol.5. – № 8. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714960/>

102. Martin R.M. Effect of a Low-Intensity PSA-Based Screening Intervention on Prostate Cancer Mortality: The CAP Randomized Clinical Trial / R.M. Martin, J.L. Donovan, E.L. Turner, C. Metcalfe, G.J.Young, E.I. Walsh, J.A. Lane, S. Noble, S.E. Oliver, S. Evans, J.A.C. Sterne, P. Holding, Y. Ben-Shlomo, P. Brindle, N.J. Williams, E.M. Hill, S.Y. Ng, J. Toole, M.K. Tazewell, L.J. Hughes, C.F. Davies, J.C. Thorn, E. Down, G.D. Smith, D.E. Neal, F.C. Hamdy, CAP Trial Group // *JAMA*. - 2018. – Vol.319. – № 9. - P. 883–895.

103. Martin R.M. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae* [Электронный ресурс] / R.M. Martin, M.A. Bachman // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. – 2018. – Vol.8. – Режим доступа: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29404282/>

104. Meletis G. Colistin heteroresistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* / G. Meletis, E. Tzampaz, E. Sianou, I. Tzavaras, D. Sofianou // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2011. Vol.66. – № 4. - P. 946–947.

105. Mobasser G. Molecular characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine farms in Malaysia / G. Mobasser, C.S.J. Teh, P.T. Ooi, S.C. Tan, K.L. Thong // Microbial Drug Resistance. - 2019. – Vol.25. – № 7. - P. 1087–1098.

106. Moosavian M. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran / M. Moosavian, N. Emam // Infection and Drug Resistance. - 2019. – Vol. 12. - P. 1001–1010.

107. Moskowitz S.M. PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients / S.M. Moskowitz, M.K. Brannon, N. Dasgupta, M. Pier, N. Sgambati, A.K. Miller, S.E. Selgrade, S.I. Miller, M. Denton, S.P. Conway, H.K. Johansen, N. Hoiby // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2012. – Vol.56. – № 2. - P. 1019–1030.

108. Mu X. The effect of colistin resistance-associated mutations on the fitness of *Acinetobacter baumannii* / X. Mu, N. Wang, X. Li, K. Shi, Z. Zhou, Y. Yu, X. Hua // Frontiers in Microbiology. - 2016. – Vol.7. - P. 1–8.

109. Nang S.C. Fitness cost of *mcr*-1-mediated polymyxin resistance in *Klebsiella pneumoniae* / S.C. Nang, F.C. Morris, M.J. McDonald, M.L. Han, J. Wang, R.A. Strugnell, T. Velkov, J. Li // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2018. – Vol.73. – № 6. - P. 1604–1610.

110. National Center for Health Statistics [электронный ресурс] // Health, United States, 2014: With Special Feature on Adults Aged 55–64. – P. 1–473. - URL: <https://www.cdc.gov/nchs/data/hsr/hsr14.pdf> / (дата обращения: 22.06.2018).

111. Nevers P. Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements / P. Nevers, H. Saedler // Nature Publishing Group. - 1977. - Vol.5616. – № 268. - P. 109–115.

112. Nordmann P. The emerging NDM carbapenemases / P. Nordmann, L. Poirel, T.R. Walsh, D.M. Livermore // Trends in Microbiology. - 2011. – Vol.19. – № 12. - P. 588–595.

113. Nordmann P. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* / P. Nordmann, M. Gniadkowski, C.G. Giske, L. Poirel, N. Woodford, V. Miriagou, European Network on Carbapenemases // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2012. – Vol.18. – № 5. - P. 432–438.
114. Olaitan A.O. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria [Электронный ресурс] / A.O. Olaitan, S. Morand, J.M. Rolain // *Frontiers in Microbiology*. - 2014. – Vol.5. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4244539/>
115. Otter J.A. Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London / J.A. Otter, M. Doumith, F. Davies, S. Mookerjee, E. Dyakova, M. Gilchrist, E.T. Brannigan, K. Bamford, T. Galletly, H. Donaldson, D.M. Aanensen, M.J. Ellington, R. Hill, J.F. Turton, K.L. Hopkins, N. Woodford, A. Holmes // *Scientific Reports*. - 2017. – Vol.7. – № 1. - P. 12711.
116. Paczosa M.K. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense / M.K. Paczosa, J. Mecsas // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2016. – Vol. 80. – № 3. - P. 629–661.
117. Padilla E. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence / E. Padilla, E. Llobet, A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, J.A. Bengoechea, S. Alberti // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2010. – Vol.54. – № 1. - P. 177–183.
118. Park S.Y. Adaptor protein complexes and intracellular transport / S.Y. Park, X. Guo // *Bioscience Reports*. - 2014. – Vol.34. – № 4. - P. 381–390.
119. Pathosystems Resource Integration Center: сайт. – URL: <https://www.patricbrc.org/> (дата обращения: 24.01.2019). – Текст: электронный.
120. Perry R.D. Signature-tagged mutagenesis and the hunt for virulence factors: Response // *Trends in Microbiology*. - 1999. – Vol.7. – № 10. - P. 388–389.
121. Pitout J.D.D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance / J.D.D. Pitout, P. Nordmann, L. Poirel // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2015. – Vol.59. – № 10. - P. 5873–5884.

122. PlasmidFinder: сайт. – URL: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/> (дата обращения: 12.01.2019). – Текст: электронный.

123. Poirel L. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes / L. Poirel, T.R. Walsh, V. Cuvillier, P. Nordmann // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. - 2011. – Vol.70. – № 1. - P. 119–123.

124. Poirel L. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* / L. Poirel, A. Jayol, S. Bontron, M.V. Villegas, M. Ozdamar, S. Turkoglu, P. Nordmann // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2015. – Vol.70. – № 1. - P. 75–80.

125. Poirel L. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes / Poirel L., Aurélie J., Nordmann P. // *Clinical Microbiology Reviews*. - 2017. – Vol.30. – № 2. - P. 557–596.

126. Pope C.F. Approaches to measure the fitness of *Burkholderia cepacia* complex isolates / C.F. Pope, S.H. Gillespie, J.E. Moore, T.D. McHugh // *Journal of Medical Microbiology*. - 2010. – Vol.59. – № 6. - P. 679–686.

127. Potron A. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011 [Электронный ресурс] / A. Potron, L. Poirel, E. Rondinaud, P. Nordmann // *Eurosurveillance*. - 2013. – Vol. 31. – № 18. - Режим доступа: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES2013.18.31.20549>

128. Poudyal A. In vitro pharmacodynamics of colistin against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* / A. Poudyal, B.P. Howden, J.M. Bell, W. Gao, R.J. Owen, J.D. Turnidge, R.L. Nation, J. Li // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2008. – Vol.6. – № 62. - P. 1311–1318.

129. Rapid Annotation using Subsystem Technology: сайт. – URL: <https://rast.nmpdr.org/> (дата обращения: 22.01.2019). – Текст: электронный.

130. ResFinder database: сайт. – URL: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/> (дата обращения: 12.08.2018). – Текст: электронный.

131. Rice L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE / L.B. Rice // The Journal of Infectious Diseases. - 2008. – Vol.8. – № 197. - P. 1079–1081.

132. Richter S.E. Risk Factors for Colistin Resistance among Gram-Negative Rods and *Klebsiella pneumoniae* Isolates [Электронный ресурс] / S.E. Richter, L. Miller, D.Z. Uslan, D. Bell, K. Watson, R. Humphries, J.A. McKinnell // Journal of Clinical Microbiology. - 2018. Vol. 9. – № 56. - Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6113453/>

133. Rojas L.J. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality / L.J. Rojas, M. Salim, E. Cober, S.S. Richter, F. Perez, R.A. Salata, R.C. Kalayjian, R. Watkins, R. Marshall, S., Rudin, S. D., Domitrovic, T. N., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Doi, Y., Kaye, K. S., Evans, S., Fowler, V. G., Jr, Bonomo, R. A., van Duin, D., & Antibacterial Resistance Leadership Group // Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. – 2017. – Vol. 6. – № 64. – P. 711–718.

134. 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 // Journal of Infectious Diseases. - 2016. – Vol. 4. – № 213. - P. 649–658.

135. Saidani M. Various Inc-type plasmids and lineages of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* spreading blaCTX-M-15, blaCTX-M-1 and *mcr-1* genes in camels in Tunisia / M. Saidani, L. Messadi, J. Mefteh, A. Chaouechi, A. Soudani, R. Selmi, M. Daaloul-Jedidi, F.B. Chehida, A. Mamlouk, M.H. Jemli, J.Y. Madec, M. Haenni // Journal of Global Antimicrobial Resistance. - 2019. - № 19. - P. 280–283.

136. Sanina N. Effect of phenol-induced changes in lipid composition on conformation of OmpF-like porin of *Yersinia pseudotuberculosis* / N. Sanina, L. Davydova, S. Bakholdina, O. Novikova, O. Pornyagina, T. Soloveva, V. Shnyrov, M. Bogdanov // FEBS Letters. - 2013. – Vol. 587. – № 14. - P. 2260–2265.

137. Shamina O.V. Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITE *Kpn1* in the *mgrB* gene among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Moscow, Russia / O.V. Shamina, O.A. Kryzhanovskaya, A.V.

Lazareva, N.M. Alyabieva, S.V. Polikarpova, O.V. Karaseva, N.A. Mayanskiy // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2020. – Vol. 55. - № 2. – P. 1-6.

138. Shankar C. *mgrB* as hotspot for insertion sequence integration: change over from multidrug-resistant to extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*? / C. Shankar, A.K. Pragasam, S. Anandan, B. Veeraraghavan // Microbial Drug Resistance. - 2019. - Vol.25. – №7. - P. 1122-1125.

139. 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 // Journal of Medical Microbiology. - 2012. – Vol. 61. – № 2. - P. 239–245.

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

141. Siguier P. Everyman's guide to bacterial insertion sequences / P. Siguier, E. Gourbeyre, A. Varani, B. Ton-Hoang, M. Chandler // Microbiology Spectrum. - 2015. – Vol. 3. – №2. – P. 555–590.

142. Siguier P. Bacterial insertion sequences: Their genomic impact and diversity / P. Siguier, E. Gourbeyre, M. Chandler // FEMS Microbiology Reviews. - 2014. – Vol.38. – № 5. - P. 865–891.

143. Srinivasan V.B. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance / V.B. Srinivasan, G. Rajamohan // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2013. – Vol.57. – № 9. - P. 4449–4462.

144. 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 // Journal of Bacteriology. - 2009. – Vol.191. – № 21. - P. 6592–6601.

145. Struve C. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence /

C. Struve, M. Bojer, K.A. Krogfelt // Infection and Immunity. - 2008. – Vol. 76. – № 9. - P. 4055–4065.

146. Sugawara E. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -Lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC / E. Sugawara, S. Kojima, H. Nikaido // Journal of Bacteriology. - 2016. – Vol.198. – № 23. - P. 3200–3208.

147. Ternent L. Bacterial fitness shapes the population dynamics of antibiotic-resistant and -susceptible bacteria in a model of combined antibiotic and anti-virulence treatment / L.Ternent, R.J. Dyson, A.M. Krachler, S. Jabbari // Journal of Theoretical Biology. - 2015. – Vol. 372. - P. 1–11.

148. Tumbarello M. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Differences in therapy and mortality in a multicentre study / M. Tumbarello, E.M. Trecarichi, F.G.De Rosa, M. Giannella, D.R. Giacobbe, M. Bassetti, A.R. Losito, M. Bartoletti, V.D. Bono, S. Corcione, G. Maiuro, S. Tedeschi, L. Celani, C.S. Cardellino, T. Spanu, A. Marchese, S. Ambretti, R. Cauda, C. Viscoli, P. Viale, ISGRI-SITA // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2015. – Vol. 70. – № 7. - P. 2133–2143.

149. Tzouveleakis L.S. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions / L.S. Tzouveleakis, A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P.T. Tassios, G.L. Daikos // Clinical Microbiology Reviews. - 2012. – Vol.25. – № 4. - P. 682–707.

150. 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 // The Open Microbiology Journal. - 2011. - Vol. 5. - P. 107–113.

151. VirulenceFinder: сайт. – URL: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder/> (дата обращения: 12.01.2019). – Текст: электронный.

152. Vourli S. Evaluation of two automated systems for colistin susceptibility testing of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates / S. Vourli, K.

Dafopoulou, G. Vrioni, A. Tsakris, S. Pournaras // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2017. – Vol. 72. – № 9. - P. 2528–2530.

153. Wang X. Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in several uncommon species of *Enterobacteriaceae* from commercial poultry farm surrounding environments / X. Wang, Y. Wang, Y. Wang, S. Zhang, Z. Shen, S. Wang // Veterinary Microbiology. - 2018. - Vol. 219. - P. 161–164.

154. Wicker T. A unified classification system for eukaryotic transposable elements / T. Wicker, F. Sabot, A. Hua-Van, J.L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel, A.H. Schulman // Nature Reviews Genetics. - 2007. – Vol. 8. – № 12. - P. 973–982.

155. Wyres K.L. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307 / K.L. Wyres, J. Hawkey, M.A.K. Hetland, A. Fostervold, R.R. Wick, L.M. Judd, M. Hamidian, B.P. Howden, I.H. Lohr, K.E. Holt // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. - 2019. – Vol.74. – № 3. - P. 577–581.

156. Wyres K.L. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones / K.L. Wyres, K.E. Holt // Trends in Microbiology. 2016. – Vol. 24. – № 12. - P. 944–956.

157. Yeh K.M. Surface antigens contribute differently to the pathophysiological features in serotype K1 and K2 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscesses [Электронный ресурс] / K.M. Yeh, S.K. Chiu, C.L. Lin, L.Y. Huang, Y.K. Tsai, J.C. Chang, J.C. Lin, F.Y. Chang, L.K. Siu // Gut Pathogens. - 2016. – Vol. 8. – № 4.
- Режим доступа:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758166/pdf/13099_2016_Article_85.pdf

158. Yong D. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India / D. Yong, M.A. Toleman, C.G. Giske, H.S. Cho, K. Sundman, K. Lee, T.R. Walsh // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2009. – Vol. 53. – № 12. - P. 5046–5054.

159. 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 // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. - 2008. – Vol. 1. – № 1. - P. 1–6.

Характеристика карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в г. Москве в 2012-2017 гг (n=159)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
56-1053	2015	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
56-1678	2015	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
58-2876	2015	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
58-2966	2015	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
58-3431	2015	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
68-66-1	2016	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	ISKpn14 в <i>mgrB</i>
46-935	2014	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
48-667	2014	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
48-685	2014	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
56-410	2015	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	мутации в <i>PmrB</i>
58-2313	2015	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
48-966	2014	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
68-17-1	2016	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
68-75	2016	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
46-1964	2014	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
48-143	2014	48	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
48-631	2014	48	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
72-3372	2017	247	CTX-M-1-sub.					
54-65	2015	336	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
39-27	2013	336	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
37239	2014	134	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
46-82-2	2014	395					Δ OmpK36	

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
46-82-2	2014	395					Δ OmpK36	
59-431-1	2015	395	CTX-M-9-sub.				Δ OmpK36	
52-1659	2015	395	CTX-M-1-sub.					ISKpn26 в <i>mgrB</i>
48-2246	2014	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				мутации в <i>PmrA</i> и <i>B</i>
36-2246	2013	395	CTX-M-1-sub.					Δ <i>mgrB</i>
39-650	2013	395	CTX-M-9-sub.					
36-1309	2013	395	CTX-M-1-sub.					
59-397	2015	395	CTX-M-1,9-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
78-1127	2017	395						
76-2165	2017	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK35	
59-520	2015	395	CTX-M-9-sub.				Δ OmpK36	
39-627-2	2013	395	CTX-M-9-sub.					
10071-1	2014	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
36-2029	2013	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
37198	2014	395	CTX-M-1-sub.					
39-412	2013	395	CTX-M-1,9-sub.					
39-561	2013	395	CTX-M-1,9-sub.					
46-826	2014	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
49-287	2014	395	CTX-M-9-sub.					
69-138	2016	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
69-14-1	2016	395	CTX-M-1-sub.					
69-69-1	2016	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}				
69-50	2016	395						
39-76	2013	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
49-286	2014	395	CTX-M-9-sub.				Δ OmpK36	
39-79-2	2013	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
49-24-1	2014	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
49-303	2014	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
59-424-1	2015	395	CTX-M-9-sub.				Δ OmpK36	
65-252	2016	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
36-2709	2013	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
36-2802	2013	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
39-40	2013	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
49-145	2014	395	CTX-M-9-sub.				Δ OmpK36	
66-697-2	2016	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
78-694	2017	395	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
76-1285	2017	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
76-1384	2017	395	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
65-517	2016	395	CTX-M-1-sub.					
4469	2012	395	CTX-M-1-sub.					ISKpn26 в <i>mgrB</i>
66-171	2016	461						
69-77	2016	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				IS1A в <i>mgrB</i>
10044-2	2014	23	CTX-M-1-sub.					
37224	2014	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
37243	2014	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
37261	2014	23	CTX-M-1-sub.					
9536	2014	23	CTX-M-1-sub.					
16722-1	2014	23	CTX-M-1-sub.					
16727	2014	23	CTX-M-1-sub.					
37291	2014	23	CTX-M-1-sub.					
49-535-2	2014	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
79-472	2017	23	CTX-M-1-sub.					

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
69-408	2016	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
79-376	2017	23	CTX-M-1-sub.					
79-399	2017	23	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
79-407	2017	23	CTX-M-1-sub.					
09726-2	2014	23						
76-2089	2017	377	CTX-M-1-sub.					ISKpn14 в <i>mgrB</i>
16963	2014	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
56-1256	2015	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
76-1273	2017	377	CTX-M-1-sub.					
76-1648	2017	377	CTX-M-1-sub.					
78-123-3	2017	377	CTX-M-1-sub.					
78-981	2017	377	CTX-M-1-sub.					
74-2075	2017	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
59-306	2015	377	CTX-M-1,9-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
59-307	2015	377	CTX-M-1,9-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
68-339	2016	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
68-688	2016	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
68-748	2016	377	CTX-M-1-sub.					
78-355	2017	377	CTX-M-1-sub.					
78-50	2017	377	CTX-M-1-sub.					
79-1039	2017	377	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
76-2053	2017	377	CTX-M-1-sub.					
58-2512	2015	39	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
29423	2012	70	CTX-M-1,9-sub.	<i>bla</i> OXA-48				$\Delta mgrB$
58-2980	2015	13	CTX-M-1-sub.					
58-1900	2015	13	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK35, Δ OmpK36	

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
58-1951	2015	13	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK35, Δ OmpK36	
76-11-1	2017	35	CTX-M-1-sub.					
71-1375	2017	307	CTX-M-1-sub.					ISKpn14 in mgrB
48-1594	2014	307	CTX-M-1-sub.					MITEKpn1 в mgrB
55-148	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				MITEKpn1 в mgrB
56-566	2015	307	CTX-M-1,9-sub.					MITEKpn1 в mgrB
56-613	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				MITEKpn1 в mgrB
58-1286	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				MITEKpn1 в mgrB
58-1363	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				MITEKpn1 в mgrB
48-1529	2014	307	CTX-M-1-sub.					
48-1612	2014	307	CTX-M-1-sub.					
58-3706	2015	307	CTX-M-1-sub.					
66-906	2016	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
74-781	2017	307	CTX-M-1-sub.					
48-2002	2014	307	CTX-M-1-sub.					
48-2005	2014	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48				
66-1615	2016	307	CTX-M-1-sub.					
66-614	2016	307	CTX-M-1-sub.					
68-1600	2016	307	CTX-M-1-sub.					
79-371	2017	307	CTX-M-1-sub.					
79-716	2017	307	CTX-M-1-sub.					
79-839-1	2017	307	CTX-M-1-sub.					
79-896	2017	307	CTX-M-1-sub.					
76-459	2017	307						
76-815	2017	307	CTX-M-1-sub.					
79-215	2017	307	CTX-M-1-sub.					

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
64-574	2016	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	ISKpn26 в <i>mgrB</i>
56-1790	2015	307	CTX-M-1,9-sub.				Δ OmpK36	IS1R in <i>mgrB</i>
46-1612	2014	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
36-3247	2013	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
46-1458	2014	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
46-1574	2014	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	мутации в <i>PmrB</i>
46-1601	2014	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
56-1249	2015	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
56-1254	2015	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
58-2817-1	2015	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
58-3895	2015	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
68-982	2016	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
56-1335	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
56-1339	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
56-1626	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			Δ OmpK36	
66-800-3	2016	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
68-853	2016	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
76-1602	2017	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	
58-857	2015	307	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-48			MITEKpn1 в OmpK36	
56-159	2015	307	CTX-M-1-sub.				MITEKpn1 в OmpK36	
68-183-2	2016	307	CTX-M-1-sub.				MITEKpn1 в OmpK36	
76-641	2017	307	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK35	
78-498	2017	14	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
78-500	2017	14	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> OXA-244				
72-1213	2017	15	CTX-M-1-sub.					
78-556	2017	15	CTX-M-1-sub.					

Таблица А-1 (продолжение)

№ изолята	Год выделения	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM-1}	<i>bla</i> _{KPC-3}	Мутации в поринах OmpK35/36	Резистентность к колистину
76-162	2017	37	CTX-M-1-sub.					
78-296	2017	37	CTX-M-1-sub.				Δ OmpK36	Δ mgrB
16730	2014	86		<i>bla</i> _{OXA-48}			Δ OmpK36	
76-215	2017	147	CTX-M-1-sub.					
16782	2014	147	CTX-M-1-sub.					
37262	2014	147	CTX-M-1-sub.	<i>bla</i> _{OXA-48}			Δ OmpK36	Δ mgrB
56-1715	2015	147	CTX-M-1-sub.					
76-266	2017	147	CTX-M-1-sub.					

Примечание. ST – сиквенс-тип.

Закрашенные клетки в столбцах генов карбапенемаз указывают на наличие соответствующих генов. Тип карбапенемазы *bla*_{OXA-48} или *bla*_{OXA-244} (отмечено в соответствующих клетках) был выявлен путем анализа последовательности *bla*_{OXA-48-like} в 62 изолятах. В колонке «Резистентность к колистину» зеленые и красные клетки указывают на чувствительные и резистентные к колистину изоляты соответственно; для устойчивых к колистину изолятов был изучен механизм резистентности, указанный внутри соответствующей ячейки.