

**Шамина Ольга Вячеславовна**

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

**03.02.03 – Микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени**

**кандидата медицинских наук**

**Москва 2020**

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр здоровья детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, профессор РАН

**Маянский Николай Андреевич**

**Официальные оппоненты:**

**Попов Дмитрий Александрович** - доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А.Н. Бакулева» Минздрава России, лаборатория клинической микробиологии и антимикробной терапии, заведующий лабораторией

**Багирова Наталия Сергеевна** - доктор медицинских наук, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, лаборатория микробиологической диагностики и лечения инфекций в онкологии, старший научный сотрудник

**Ведущая организация:** ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «19» января 2021 г. в 14:00 на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.001.08 ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov.ru](http://www.sechenov.ru)

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



**Калужин Олег Витальевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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» (Сухорукова М.В., 2014; Сухорукова М.В., 2017; Яковлев С.В., 2016; Rice L.B., 2008).

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 (Gomez-Simmonds A., 2017). 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 сиквенс-типам (ST) *K. pneumoniae*, однако большинство Карба-Р изолятов принадлежит к узкому кругу успешных клонов, которые доминируют в структуре госпитальных популяций повсеместно (Lee C.R., 2016; Wyres K.L., 2016). 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 (Chen L., 2014). В настоящее время к числу глобально диссеминированных относятся и другие МЛУ-клоны, включая ST14/15, ST17/20, ST43, ST147, ST395 (Izdebski R., 2018; Liapis E., 2014; Wyres K.L., 2016), а также ST307, который приобрел значимость сравнительно недавно (Wyres K.L., 2019). Для перечисленных клонов характерно носительство разнообразных карбапенемаз, в том числе KPC, OXA-48, NDM-1 и

VIM-1 (Wyres K.L., 2016). Кроме того, глобальный клон ST23 включает гипервирулентные изоляты *K. pneumoniae* (Gomez-Simmonds A., 2017).

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 (Сухорукова М.В., 2017), среди которых описаны ОХА-48, NDM-1 и KPC-2 (Шайдуллина Э.Р., 2018; Ageevets V.A., 2014; Fursova N.K., 2015; Lazareva I.V., 2016). 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 (Ah Y.M., 2014; Poirel L., 2017). 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 (Poirel L., 2017). Возросшее вслед за этим использование колистина в клинике привело к появлению и распространению колистинрезистентности (Ah Y.M., 2014; Lee C.R., 2016), которая может существенно снижать эффективность антимикробной терапии и проявляться повышением смертности пациентов, инфицированных колистинрезистентными (Кол-Р) *K. pneumoniae* (Rojas L.J., 2017).

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 (Ah Y.M., 2014; Poirel L., 2017). Хромосомные и плазмидные механизмы приводят к похожим изменениям структуры ЛПС-мишени колистина, снижая связывание антибиотика с клеточной стенкой бактерий (Poirel L., 2017). Резистентность к колистину у Карба-Р *K. pneumoniae* чаще всего связывают с инактивацией гена *mgrB*, связанной с различными хромосомными перестройками (Cannatelli A., 2014; Poirel L., 2015; Poirel L., 2017). К ним относят повреждение *mgrB* несколькими типами вставочных элементов (insertion sequence, IS), в первую очередь IS1- и IS5-подобными элементами (например, IS*Kpn14* и IS*Kpn26* соответственно), а также точечные мутации и делеции локуса *mgrB* разных размеров (Berglund B., 2018; Cannatelli A., 2014; Otter

J.A., 2017; Poirel L., 2015; Poirel L., 2017). 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» (Guo B., 2012; Pore C.F., 2010; Ternent L., 2015) по сравнению с чувствительными штаммами в отсутствие селективного давления антибиотика (Vesceiro A., 2014; Choi M.J., 2016). 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 (Poirel L., 2017). В связи с этим чувствительность к колистину рекомендуют тестировать эталонным методом микроразведений (ММР) в бульоне, определяя минимальную подавляющую концентрацию (МПК). Однако из-за трудоемкости ММР в повседневной лабораторной практике нередко используют альтернативные методы, такие как диско-диффузионный, автоматизированный (бактериологические анализаторы) и эпсилотрический (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 (Poirel L., 2017). В связи с этим валидация методов определения чувствительности к колистину является одной из актуальных задач клинической микробиологии (Meletis G., 2011; Poudyal A., 2008).

Таким образом, экспансия резистентных форм *K. pneumoniae* является серьезной проблемой современного здравоохранения. В связи с этим мониторинг клональной структуры бактериальной популяции Карба-Р *K. pneumoniae*, получение новых данных о молекулярных механизмах антибиотикорезистентности и ее физиологических аспектах будут полезны при разработке стратегии борьбы с устойчивостью к антимикробным препаратам.

## 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  $\beta$ -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.

В российской литературе описаны многоцентровые исследования по изучению *K. pneumoniae*, выделенных у взрослых пациентов (Баранцевич Е.П., 2016; Сухорукова М.В., 2014; Сухорукова М.В., 2017; Шайдуллина Э.Р., 2018; Fursova N.K., 2018), 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 (Сухорукова М.В., 2014; Сухорукова М.В., 2017; Ah Y.M., 2014; Mobasser G., 2019). На сегодняшний день в литературе описаны молекулярные механизмы, лежащие в основе появления устойчивости к колистину (Cannatelli A., 2013; Poirel L., 2017). 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 у 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 *mgrB* вставочными элементами.

В геноме карбапенемрезистентных *K. pneumoniae* описан новый, ранее неизвестный миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами MITE*Kpn1*, 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, КРС-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.

Получены представления 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 MITE*KpnI*, 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 этих 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 используются 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 E-тестов. Наличие генов карбапенемаз определяли с использованием 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 *mgrB*, *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. Для сравнительного анализа кривых роста использовали тест Краскела-Уоллиса, парные сравнения проводили с использованием теста Манна-Уитни. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

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.

### **Основные 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 *mgrB*.

4. У *K. pneumoniae*, резистентных к колистину, снижена конкурентоспособность по сравнению с чувствительными изолятами.

### **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 объём 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» (Москва, 2019); на заседании Московского отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2019).

### **Личный вклад автора в получение 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 E-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. 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 диссертации 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.

### **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 статьях в журналах из перечня рецензируемых научных изданий ВАК и реферируемых базой данных Scopus и 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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Материалы и методы исследования

За период 2012-2017 гг. была собрана коллекция клинических Карба-Р изолятов *K. pneumoniae*. Для определения МПК к меропенему, имипенему и тигециклину использовали метод Е-тестов (BioMerieux) на среде Мюллера-Хинтона (BioRad).

МПК к колистину определяли эталонным Методом микроразведений (ММР) в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010) и сравнивали результаты с методом Е-тестов (BioMerieux) на среде Мюллера-Хинтона и ВИТЕК, рассчитывая коэффициенты эффективности (см. примечание к таблице 2).

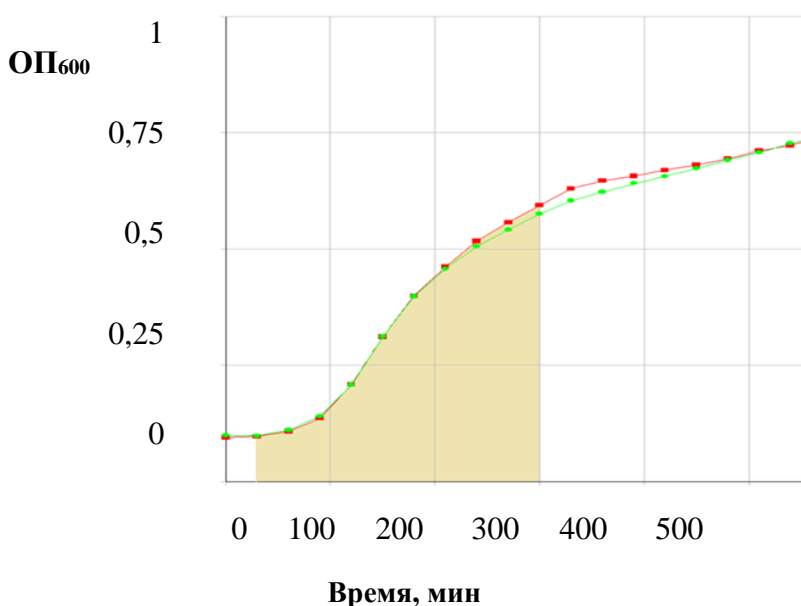
Результаты интерпретировали, руководствуясь оценочными критериями EUCAST, 2018. Фенотип МЛУ определяли у изолятов, резистентных хотя бы к одному антибиотику из трех и более классов антимикробных препаратов (Magiorakos A.P., 2012).

Для проведения молекулярно-генетических методов исследований бактериальную ДНК выделяли с помощью набора «DNeasy Blood & Tissue Kit» (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя. Для генотипирования штаммов *K. pneumoniae* использовали метод МЛСТ согласно схеме Pasteur (Diancourt L., 2005). Для детекции гена  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра *bla*<sub>CTX-M</sub>, генов пориновых белков *ompK35* и *ompK36*, и генов *mgrB*, *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ*, изменения в которых приводят к возникновению резистентности к колистину, использовали метод ПЦР. Выявление генов карбапенемаз проводили с использованием наборов реагентов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени «АмплиСенс MDR MBL-FL» (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>), «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL» (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>) производства ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Выявление гена *mcr-1* проводили в режиме реального времени с анализом кривых плавления. Секвенирование генов проводили с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по протоколу фирмы-производителя.

Нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью программы SeqMan, затем сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank, NCBI. Идентификацию IS-элементов проводили на основе базы данных ISfinder. Аминокислотные последовательности белков PmrA, PmrB, PhoP и PhoQ Кол-Р штаммов сравнивали с аминокислотными последовательностями колистинчувствительных (Кол-Ч) штаммов соответствующих сиквенс-типов.

Полногеномное секвенирование проводили на приборе Illumina HiSeq1500. Результаты анализировали с помощью интернет-ресурсов BLAST, RAST, PATRIC, ResFinder 3.0, PlasmidFinder 1.3 и VirulenceFinder 2.0.

Для исследования бактериального фитнеса были отобраны Кол-Ч изоляты и Кол-Р изоляты *K. pneumoniae* с поврежденным *mgrB* и *mgrB* дикого типа. Кривые роста были построены путем измерения оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм в течение 15 ч. В качестве индикатора интенсивности роста использовали значение площади под кривой роста (ПКР), которую рассчитывали от начала экспоненциального роста до выхода кривой на плато (рисунок 1) и выражали в ОП<sub>600</sub> за 1 ч. Конкурентный рост Кол-Р изолятов *K. pneumoniae* оценивали относительно Кол-Ч изолята. Кол-Р- и Кол-Ч-изоляты в



**Рисунок 1. Типичные кривые роста Кол-Ч (зеленый) и Кол-Р (красный) изолятов *K. pneumoniae* в среде без колистина**

*Примечание.* Заштрихованная область — значение площади под кривой (ПКР), ОП<sub>600</sub> за 1 час.

экспоненциальной фазе роста смешивали в пропорции 1:1, инкубировали в среде Луриа–Бертани (LB; HiMedia Laboratories Pvt. Limited) и затем наносили на агар LB, содержащий 10 мг/л колистина, и без него (см. рисунок 4). Индекс конкуренции (ИК) рассчитывали как отношение выросших Кол-Р и Кол-Ч-колоний. Статистическую обработку данных проводили с помощью программ SPSS 20.0 (SPSS Statistics, США) и Microsoft Excel. 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  $p < 0,05$ .

## 2. Молекулярная эпидемиология и механизмы устойчивости карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae* к $\beta$ -лактамам антибиотикам

Всего было собрано 159 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*, которые имели фенотип МЛЮ: 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%). Резистентность к тигециклину продемонстрировали 7% изолятов.

По данным МЛСТ, исследованные Карба-Р-изоляты *K. pneumoniae* были распределены между 18 сиквенс-типами, но большинство (86%) относилось 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%).

Основной детерминантой резистентности к карбапенемным антибиотикам был ген *bla<sub>OXA-48-like</sub>*, обнаруженный у 146 (92%) изолятов (таблица 1). С помощью секвенирования ДНК в выборке из 62 изолятов, охватившей каждый сиквенс-тип, были идентифицированы варианты *bla<sub>OXA-48</sub>* и *bla<sub>OXA-244</sub>* у 55 и 7 штаммов соответственно. Также были обнаружены гены *bla<sub>NDM-1</sub>* и *bla<sub>KPC-3</sub>* у 11 (7%) и 2 (1%) изолятов *K. pneumoniae* соответственно (таблица 1). У 152 (96%) штаммов было выявлено носительство гена *bla<sub>CTX-M</sub>* (таблица 1). В 142 (93%) изолятах он относился к типу *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, а в 18 (12%) изолятах – к типу *bla<sub>CTX-M-9</sub>*, причем 8 (5%) изолятов были носителями обоих типов *bla<sub>CTX-M</sub>*.

Другим важным механизмом возникновения устойчивости к  $\beta$ -лактамам являются изменения структуры пориновых каналов. 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. У трех изолятов в гене *ompK36* был обнаружен вставочный элемент *MITEKpn1*, который был впервые описан нами в гене *mgrB* (см. ниже).

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

ST	n (%)	n	<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>
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	-	+	-	-
<b>Всего:</b>	<b>159 (100%)</b>	<b>159</b>	<b>146 (92%)</b>	<b>11 (7%)</b>	<b>2 (1%)</b>	<b>152 (96%)</b>

**3. Сравнение лабораторных методов определения устойчивости к колистину и ее механизмы у карбапенемрезистентных *Klebsiella pneumoniae***

Для анализа эффективности определения чувствительности к колистину методом E-тестов и с помощью бактериологического анализатора VITEK были выбраны 119 Карба-Р штаммов *K. pneumoniae*. Доля Кол-Р изолятов, полученная референсным ММР, методом E-тестов и с помощью бактериологического анализатора VITEK, составила 52% (n=62/119), 39% (n=46/119) и 35% (n=42/119) соответственно. Полученные значения МПК колистина были сопоставлены (таблица 2). Оба коммерческих метода продемонстрировали высокие уровни очень существенной ошибки (VME): 26% для метода E-тестов и 34% для VITEK. Значения категорийного и полного согласия (CA; EA) не превысили 90%. Единичная

**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 <sup>a</sup> , n (%)	CA <sup>b</sup> , n (%)	ME <sup>b</sup> , n (%)	VME <sup>г</sup> , n (%)
ММР	57 (48%)	62 (52%)				
Е-тесты	73 (61%)	46 (39%)	86 (72%)	103 (87%)	0	16 (26%)
ВИТЕК	77 (65%)	42 (35%)	95 (80%)	97 (82%)	1 (2%)	21 (34%)

*Примечание.*

- <sup>a</sup> - EA (Essential agreement) - полное согласие;
- <sup>b</sup> - CA (Categorical agreement) - категорийное согласие;
- <sup>b</sup> - ME (Major error) - существенная ошибка;
- <sup>г</sup> - VME (Very major error) - очень существенная ошибка.

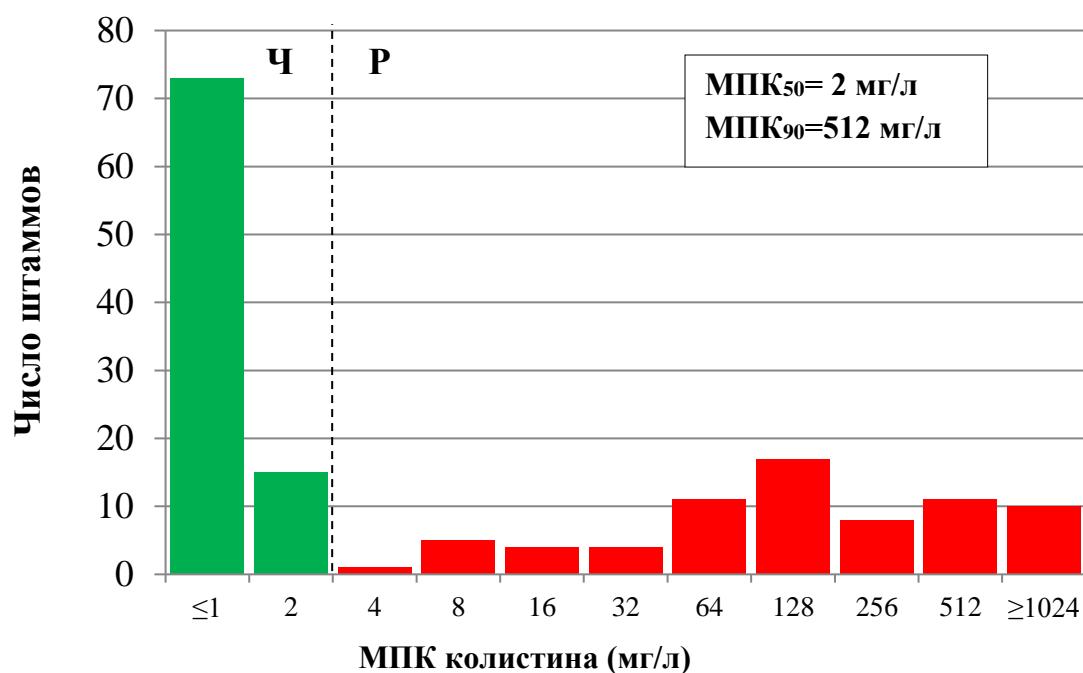
существенная ошибка (ME) выявлена для ВИТЕК. Допустимые значения: EA>89,9%, CA>89,9%, VME<1,5% [при значении EA<95%] или VME<7,5% [при значении EA>95%], ME < 3% . Таким образом, для определения МПК колистина следует использовать эталонный ММР.

При использовании ММР среди 159 Кол-Р *K. pneumoniae* 71 (45%) изолят продемонстрировал резистентность к колистину. МПК колистина находились в диапазоне от 4 до >1024 мг/л, при этом МПК<sub>50</sub> составила 2 мг/л, МПК<sub>90</sub> - 512 мг/л. Спектр МПК колистина представлен на рисунке 2.

Расшифровка молекулярных механизмов устойчивости к колистину была начата с поиска плазмидного гена *mcr-1*, который не был обнаружен ни в одном из 71 Кол-Р изоляте *K. pneumoniae*. Изменения *mgrB* были обнаружены у 23 (32%) Кол-Р изолятов (таблица 3). В 4 (17%) изолятах была обнаружена делеция всего локуса *mgrB*. 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 3).

Наибольший интерес представляет обнаруженный в *mgrB* шести (26%) Кол-Р изолятов миниатюрный мобильный элемент с инвертированными повторами (Miniature Inverted repeat Transposable Elements, MITE) (таблица 3). Такой тип вставочных элементов в





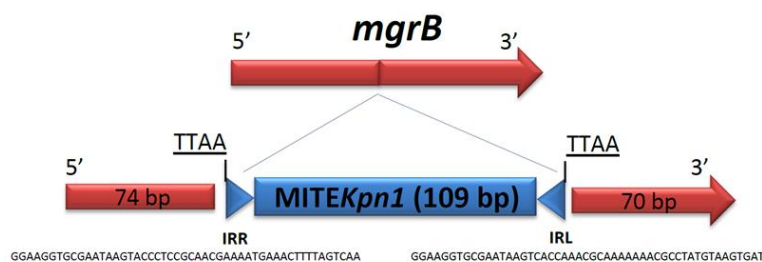
**Рисунок 2. Спектр МПК колистина для карбапенемрезистентных изолятов *K. pneumoniae* (метод микроразведений)**

*Примечание.* Ч – чувствительный; Р – резистентный.

составе генома *K. pneumoniae* был обнаружен и описан впервые, и координаторами базы данных ISfinder ему было присвоено название MITEKpn1 (Shamina O.V., 2020).

MITEKpn1 состоял из 109 п.н., принадлежал к семейству вставочных элементов IS5, не имел открытых рамок считывания и содержал прямые повторы (direct repeat, DR) размером 4 п.н. (СТАА). MITEKpn1 был обнаружен в гене *mgrB* в позиции 75 у шести изолятов ST307 (таблица 3, рисунок 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). Еще в двух изолятах (ST395) MITEKpn1 был обнаружен при анализе результатов полногеномного секвенирования. В одном штамме MITEKpn1 был внедрен в ген эффлюксного RND транспортёра, у другого штамма он находился в генах двух гипотетических белков. Таким образом, новый вставочный элемент MITEKpn1 был обнаружен в 11 (7%) Карба-Р штаммах *K. pneumoniae* ST307 и ST395.



**Рисунок 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

Наличие гена *mgrB* дикого типа у 48 из 71 (68%) Кол-Р изолятов *K. pneumoniae* требовало поиска других механизмов устойчивости к колистину. Значимые изменения PmrA и/или PmrB были выявлены у 3 изолятов, которые принадлежали к трем разным сиквенс-типам (ST307; ST395; ST48) (таблица 3).

#### 4. Бактериальный фитнес колистинрезистентных *Klebsiella pneumoniae*

Кинетика роста Кол-Р и Кол-Ч изолятов *K. pneumoniae* в отсутствие колистина различалась незначимо (рисунок 1), медианы ПКР составили 4,2 (3,9; 4,3) и 4,05 (3,9; 4,6) ОП<sub>600</sub> за 1 ч соответственно ( $p = 0,842$ ). Добавление 1 мг/л колистина снижало ПКР Кол-Ч изолятов до 1,9 (0,95; 4,13) ОП<sub>600</sub> за 1 ч ( $p=0,065$ ), а более высокие концентрации колистина ожидаемо полностью подавляли рост чувствительных изолятов. 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) ОП<sub>600</sub> за 1 ч. 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 4). Среднее значение ИК составило 0,15 (0,21), при этом 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 ( $p=0,283$ ). Таким

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

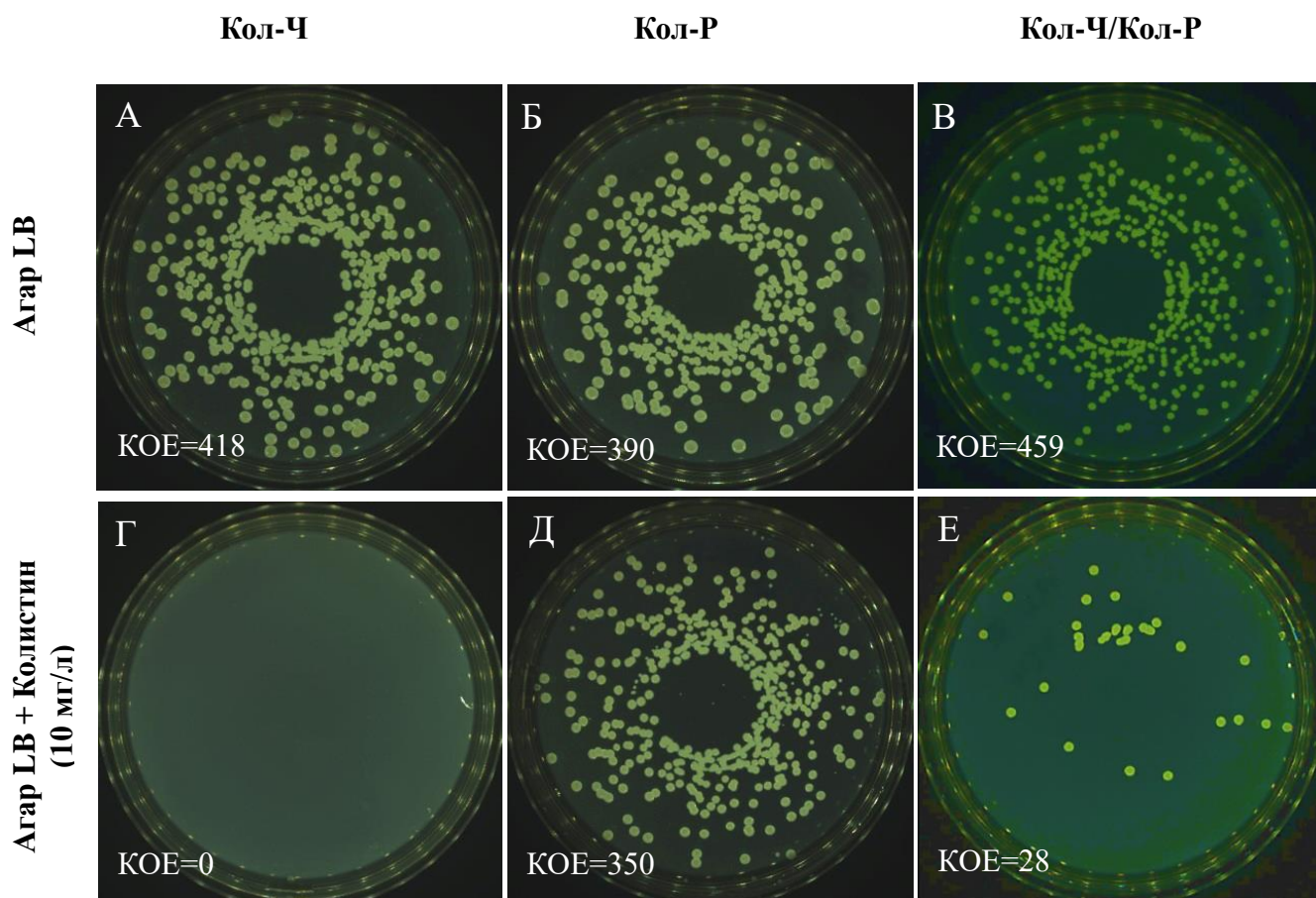
№ штамма	ST	МПК колистина (мг/л)	Статус <i>mgrB</i> <sup>а</sup>
69-77	23	128	IS1A, IS-1 family (+127/+128)
56-1790	307	64	IS1R, IS-1 family (+36/+37)
68-66-1	48	16	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-2876	48	128	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-3431	48	128	ISKpn14, IS-1 family (+141/+142)
58-2966	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
36-2246	395	128	Δ <i>mgrB</i> локуса
46-1574	307	128	Дикий тип <sup>б</sup>
48-2246	395	≥1024	Дикий тип <sup>в</sup>
56-410	48	128	Дикий тип <sup>г</sup>

*Примечание.* <sup>а</sup> в скобках указана нуклеотидная позиция встраивания вставочного элемента; <sup>б</sup> измененный PmrB (T157P); <sup>в</sup> измененный PmrA (A141T) и PmrB (L213M, G256R); <sup>г</sup> измененный PmrB (делеция 27-30 (QLIS))

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 4).

Конкуренетоспособность 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 4).



**Рисунок 4. 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. КОЕ «Е»/(КОЕ «В» - 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 <sup>а</sup>		ИК <sup>а,г</sup>
ST	№ изолята		на чашке с колистином (10 мг/л) <sup>б</sup>	на чашке без колистина <sup>в</sup>	
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
<b>Итого ST23:</b>			<b>37 (32)</b>	<b>134 (26)</b>	<b>0,48 (0,56)</b>
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
<b>Итого ST395:</b>			<b>55 (53)</b>	<b>142 (8)</b>	<b>1,1 (1,24)</b>
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
<b>Итого ST377:</b>			<b>69 (27)</b>	<b>283 (52)</b>	<b>0,35 (0,18)</b>
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
<b>Итого ST307:</b>			<b>55 (19)</b>	<b>231 (49)</b>	<b>0,36 (0,2)</b>
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.

<sup>а</sup> В строках «Итого» указано среднее (стандартное отклонение) соответствующих показателей.

<sup>б</sup> Условия, как на рисунке 4 (Е).

<sup>в</sup> Условия, как на рисунке 4 (В).

<sup>г</sup> 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.

## 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 OXA-48-подобных карбапенемаз, которые были выявлены у 92% карбапенемрезистентных *K. pneumoniae*; 7% изолятов содержали *bla<sub>NDM-1</sub>*.
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 *mgrB* 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.

### ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **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.
2. **Shamina, O.V.** Emergence of a ST307 clone carrying a novel insertion element MITEK $pn1$  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.
3. **Шамина, О.В.** Устойчивость карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к колистину: молекулярные механизмы и бактериальный фитнес / **О.В. Шамина**, О.А. Крыжановская, А.В. Лазарева, Н.М. Алябьева, Н.А. Маянский // **Вестник РГМУ**. - 2020. - №3. – С. 11-18.
4. **Шамина, О.В.** *Klebsiella pneumoniae*: микробиологическая характеристика, антибиотикорезистентность и вирулентность / **О.В. Шамина**, Е.А. Самойлова, И.Е. Новикова, А.В. Лазарева // **Российский педиатрический журнал**. – 2020. – Т.23. - №3. – С. 191-197.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- 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  
ОП<sub>600</sub> - оптическая плотность на длине волны 600 нм  
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 - insertion sequence, вставочные элементы  
KPC - *Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза  
LB - агар Лурия-Бертани  
ME - major error, существенная ошибка  
MITE - Miniature Inverted-repeat Transposable Element  
NDM - Нью-Дели металло-β-лактамаза  
ОХА-48 - оксациллиназа-48  
ST - сиквенс-тип  
VME - very major error, очень существенная ошибка