

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и
микробиологии им. Пастера»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Самойлова Анна Андреевна

**Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных
штаммов *Klebsiella pneumoniae***

Специальность - 1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
Краева Людмила Александровна

Санкт-Петербург – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Характеристика рода <i>Klebsiella</i>	14
1.2 Морфологические, культуральные и биохимические свойства <i>K. pneumoniae</i>	15
1.3 Клиническая значимость заболеваний, вызываемых штаммами <i>K. pneumoniae</i>	16
1.4 Вирулентность <i>K. pneumoniae</i>	18
1.5 Антибиотикорезистентность <i>K. pneumoniae</i>	32
1.6 Заключение по главе 1	35
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	37
2.1 Бактериологические методы	37
2.2 Молекулярно-генетические методы	39
2.3 Биологические методы	40
2.4 Морфологические методы	43
2.5 Биоинформатические методы	43
2.6 Разработка экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов <i>K. pneumoniae</i>	43
2.7 Статистические методы	47
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	51
ГЛАВА 3. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>K. PNEUMONIAE</i>	51
3.1 Оценка чувствительности штаммов <i>K. pneumoniae</i> к антимикробным препаратам	51
3.2 Генетические детерминанты резистентности исследованных штаммов <i>K. pneumoniae</i>	52
3.3 Заключение по главе 3	57

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>K. PNEUMONIAE</i> , ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ	59
4.1 Характеристика гипермукоидных свойств бактериальных штаммов .	59
4.2 Детекция генетических детерминант вирулентности	59
4.3 Определение капсульных типов (К-типов).....	60
4.4 Определение сиквенс-типов (ST-типов)	61
4.5 Локусы вирулентности	63
4.6 Заключение по главе 4	66
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> НА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ.....	68
5.1 Оценка вирулентности бактерий на модели инфекции, обусловленной штаммами <i>K. pneumoniae</i> , у белых мышей.....	68
5.2 Заключение по главе 5	77
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССНОГО СПОСОБА ОЦЕНКИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>K. PNEUMONIAE</i>	79
6.1 Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки вирулентности	79
6.2 Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности.....	84
6.3 Проверка работоспособности диагностической микрочиповой панели	85
6.4 Определение чувствительности тест-систем для выявления генетических детерминант вирулентности.....	86
6.5 Интерпретация результатов определения генетических детерминант вирулентности на микрочиповой панели	88
6.6 Заключение по главе 6	90
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	92
ВЫВОДЫ	98
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	100
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	101

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	102
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	105
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	130
ПРИЛОЖЕНИЕ А	134
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	135
ПРИЛОЖЕНИЕ В	136
ПРИЛОЖЕНИЕ Г.....	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Klebsiella pneumoniae является одной из наиболее частых причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [18], входит в группу «ESKAPE» - возбудителей — микроорганизмов, связанных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих серьезную проблему для здравоохранения [30]. В опубликованном в 2024 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) «Списке приоритетных глобальных патогенов» штаммы *K. pneumoniae* отнесены в группу возбудителей с «критическим уровнем приоритетности» [178].

В настоящее время штаммы *K. pneumoniae* представлены двумя патотипами: классическим и гипервирулентным [102]. Классические штаммы *K. pneumoniae* (сКр, classical *K. pneumoniae*) являются преобладающими и вызывают инфекции преимущественно у людей с сопутствующими заболеваниями или ослабленным иммунитетом. Данные штаммы ассоциированы с внутрибольничными инфекциями и являются клинически значимыми в связи с высокой частотой приобретения и передачи плазмид с многочисленными детерминантами резистентности, осложняющими лечение [124].

Для сКр штаммов характерны множественная, экстремальная устойчивость и панрезистентность, обусловленные наличием генов β-лактамаз (TEM-, OXA-48-, NDM- СТХМ-, и KPC-типов), интегронов и других генетических детерминант [124, 155]. По данным российской онлайн-платформы анализа данных антимикробной резистентности AMRmap, среди штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Российской Федерации в период 2018–2022 гг., 81,3% штаммов были устойчивы к цефотаксиму, 78,9 % изолятов – к ципрофлоксацину, 77,0 % - к азтреонаму. Колистин и меропенем сохраняют наибольшую активность в отношении *K. pneumoniae* [10, 92].

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* (hvKp, hypervirulent *K. pneumoniae*) вызывают инвазивные внебольничные инфекции с частотой смертности от 3 % до 55 % [91, 156]. Штаммы hvKp вызывают пневмонию, бактериемию, абсцесс печени, а также могут метастазировать в другие органы, в центральную нервную систему (ЦНС) [5, 156]. Публикации последних 5 лет указывают на возрастание частоты выделения множественно-резистентных hvKp [45, 51]. Заболевания, вызываемые подобными патогенами, наиболее опасны и трудно поддаются лечению. Это свидетельствует о необходимости разработки комплексного диагностического теста для определения hvKp штаммов в микробиологических лабораториях.

После регистрации первых случаев инвазивных инфекций, вызванных hvKp штаммами, гипермукоидный фенотип стал считаться маркером гипервирулентности. Однако последние исследования показывают, что гипервирулентность и гипермукоидность — это два разных понятия, которые не следует использовать как синонимы. Данный феномен требует более глубокого изучения генетических детерминант, которые могут быть ответственны за гипервирулентность штаммов *K. pneumoniae* [38]. В настоящее время перечень маркеров для достоверной дифференциации гипервирулентного патотипа включает около 20 генов, каждый из которых с высокой частотой ассоциирован с гипервирулентностью штаммов *K. pneumoniae*, но ни один из них не обладает 100% специфичностью [18].

Серьезную угрозу представляет появление штаммов клебсиелл с конвергенцией множественной резистентности и гипервирулентности. При сочетании резистентности к АМП и вирулентности в hvKp, такие штаммы могут вызывать трудно поддающиеся лечению инфекции [64].

Первые случаи множественно-резистентных hvKp в России описаны в 2018 году в Москве - было обнаружено 19 изолятов, демонстрирующих уровень вирулентности на мышах $LD_{50} \leq 10^4$ [105]. Выявленные hvKp штаммы относились к клональной группе ST23 и обладали плазмидой,

близкой к гипервирулентной плазмиде pLVPK [43], а также две плазмиды, несущие гены приобретенной резистентности, в том числе OXA-48-карбапенемазу [105].

Диагностика инфекций, вызванных штаммами *K. pneumoniae*, не должна ограничиваться только получением чистой культуры и идентификацией патогена. Она должна включать определение спектра антибиотикорезистентности и генетических детерминант вирулентности выделенного штамма в кратчайшие сроки для проведения адекватного этиотропного лечения.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время не существует общепринятых фенотипических и генотипических критериев для дифференцировки sKp и hvKp штаммов.

HvKp штаммы часто связаны с гипермукоидным фенотипом, который определяют при помощи стринг-теста. Тест является положительным, если нить длиной более 5 мм тянется за бактериологической петлей от колонии бактериальной культуры [137]. Однако не все гипермукоидные штаммы являются hvKp, и не все гипервирулентные штаммы обладают гипермукоидным фенотипом. По данным литературы, положительный стринг-тест в 90 % случаев наблюдается у hvKp штаммов [146, 174], что делает стринг-тест значимым диагностическим инструментом, но недостаточным для достоверной дифференцировки sKp и hvKp штаммов.

Для оценки вирулентности клебсиелл используют экспериментальную модель на мышах. Однако ни генетические линии мышей, ни пути заражения (внутрибрюшинный, аэрозольный или подкожный) не стандартизованы. При оценке штаммов hvKp на модели инфицирования аутбредных мышей различают три группы штаммов в зависимости от величины полулетальной дозы (LD_{50}): высоковирулентные ($LD_{50} \leq 10^3$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^4 до 10^5 КОЕ) и авирулентные (отсутствие летальности при 10^6 КОЕ) [100].

В литературных источниках показано, что с высокой вирулентностью штамма, определенной с помощью биологической модели, коррелирует

наличие у штаммов *K. pneumoniae* следующих генетических детерминант: *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *prmpA*, и *prmpA2*, а также высокий уровень продукции сидерофоров (≥ 30 мкг/мл) [146].

Клиническая диагностика и идентификация гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* сложны и требуют молекулярного тестирования для надежной идентификации данных штаммов [64].

Цель исследования

Разработка экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности клинических штаммов *K. pneumoniae* на основе изучения генетических детерминант и фенотипических характеристик бактерий.

Задачи исследования

1. Изучить фенотипические характеристики вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*.
2. Исследовать генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности исследуемых штаммов.
3. Оценить вирулентность исследуемых штаммов на биологической модели.
4. Разработать экспрессный способ оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*.

Научная новизна исследования

Установлено, что среди исследованных штаммов, выделенных от госпитализированных пациентов Санкт-Петербурга, 84,7 % изолятов обладали множественной лекарственной резистентностью. Устойчивость к карбапенемам проявляли 64,7 % изолятов, к колистину - 23,5 %. Наличие генов карбапенемаз выявлено у 60,2 % штаммов, а БЛРС – у 57,7 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз гены OXA-48 и NDM-1 - ими обладали 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно. Среди генов БЛРС наиболее часто (54,1 %) встречался ген CTX-M-15.

Обнаружена высокая генетическая гетерогенность штаммов *K. pneumoniae*: идентифицировано 17 капсульных типов и 18 сиквенс-типов. Наиболее

распространенными сиквенс-типами являются: ST395 (25,8 %), ST23 (18,8 %) и ST512 (9,3 %).

При оценке вирулентности изолятов *K. pneumoniae* на модели системной инфекции белых аутбредных мышей выделены три группы штаммов в зависимости от величины полуметальной дозы: авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ). Показано, что гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выделены от лиц с флегмоной рубца, панкреатитом, некротической раной культуры ($LD_{50} 1 \times 10^1$ КОЕ), а также синовитом коленного сустава и флегмоной поясничной области ($LD_{50} 1 \times 10^2$ КОЕ). Во всех hνKp изолятах присутствовали гены *rmpA*, *rmpA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора аэробактина (*iuc1*), и гены *peg-344* и *wzyK2*. Большая часть из этих признаков встречалась также у авирулентных штаммов (по результатам биопробы): *peg-344*, *iuc1*, *rmpA* и *rmpA2*.

Впервые разработана и апробирована диагностическая микрочиповая панель для выявления вирулентных штаммов *K. pneumoniae* и генетических детерминант антибиотикорезистентности на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА».

Теоретическая и практическая значимость исследования

Выполненные исследования расширяют представление об особенностях биологических свойств бактерий *K. pneumoniae*, выделяемых из проб биологического материала у госпитализированных пациентов города Санкт-Петербурга с различной патологией.

Созданная модель оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на основании точного теста Фишера с использованием программного пакета Microsoft Excel позволяет в автоматическом режиме рассчитывать значение коэффициента, на основании которого исследуемый штамм расценивается как вирулентный или авирулентный.

Практическая значимость исследования:

Разработанный способ ускоренного определения генетических детерминант вирулентности и резистентности к АМП у штаммов *K. pneumoniae* позволяет

быстро выявлять вирулентные и антибиотикорезистентные бактерии в клиническом образце.

Разработанная топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты вирулентности и антибиотикорезистентности может быть использована для создания тест-системы, позволяющей одновременно проводить исследование клинического материала на наличие вирулентных и резистентных штаммов *K. pneumoniae*.

Зарегистрированы следующие базы данных: «Генотип и фенотип вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19» (Свидетельство RU 2023621900 от 29.05.2023 г., Приложение А), «Генетические детерминанты и фенотипические характеристики антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*» (Свидетельство RU 2023621899 от 29.05.2023 г., Приложение Б), «Генетические детерминанты и фенотипические характеристики вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*» (Свидетельство RU 2023621898 от 29.05.2023 г., Приложение В).

Создана рабочая коллекция штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из проб биологического материала от госпитализированных пациентов в 2020-2022 гг., которая используется для мониторинга циркулирующих вирулентных и резистентных бактерий *K. pneumoniae* в медицинских учреждениях Санкт-Петербурга.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы была спланирована, исходя из поставленной цели, и включала использование методов научного познания для решения поставленных задач. В работе использовали следующие методы исследования: масс-спектрометрические, бактериологические, молекулярно-генетические, биологические, статистические.

Организация и проведение диссертационной работы одобрены Локальным Комитетом по этике ФБУН НИИЭМ имени Пастера Роспотребнадзора (выписка из протокола заседания № 69 от 01.12.2020 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из проб биоматериала от пациентов Санкт-Петербурга, характеризуются высоким уровнем устойчивости к антимикробным препаратам: 84,7 % изолятов обладали множественной лекарственной резистентностью (MDR). Устойчивость к карбапенемам проявляли 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов.

2. Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* преимущественно принадлежат к сиквенс-типам ST395 (25,8 %), ST23 (18,8 %), ST86 (5,9 %) и характеризуются наличием в геномах следующих детерминант вирулентности: синтеза сидерофоров аэробактина (*iuc*) и сальмохелина (*iro*), синтеза полисахаридов капсулы, специфичных для капсульных типов K1 и K2 (*magA* и *wzy*), регуляторов мукоидного фенотипа (*rmpA*, *rmpA2*).

3. Доля гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*, оцененная на инфекционной модели белых аутбредных мышей, составляет 20 % ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ), 30% штаммов являются вирулентными (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и 50% авирулентными ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ).

4. Разработанные тест-системы на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации позволяют провести комплексную экспресс-диагностику, отражающую наличие в клиническом образце или выделенном штамме *K. pneumoniae* генетических детерминант вирулентности или резистентности к АМП.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Достоверность полученных результатов определяется репрезентативностью материала и достаточным объемом проведенных исследований. Дизайн исследования, анализ полученных данных и статистическая обработка результатов

соответствуют целям и задачам работы. Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на 9 международных и Всероссийских конференциях: XXIII Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 26-28 мая, 2021); XIII Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского (Москва, 24–26 мая, 2021); 31st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (Online, 9-12 July, 2021); Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Пермь, 5–9 октября, 2020); International conference on Applied Microbiology and Biotechnology (Berlin, Germany, October 22-23, 2021); II Национальная научная конференция студентов и молодых ученых (Санкт-Петербург, 2–3 марта, 2022); Всероссийская научно-практическая конференция «Нерешенные вопросы этиотропной терапии актуальных инфекций» (Санкт-Петербург, 5-6 декабря, 2022); Конференция молодых ученых и специалистов «Новости инфектологии, микробиологии и биотехнологии 2022» (Санкт-Петербург, 21 декабря, 2022); Международный конгресс МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии (Москва, 25-27 мая, 2022).

Соответствие паспорту специальности

Диссертационное исследование, включающее изучение антибиотикорезистентности и вирулентности штаммов *K. pneumoniae*, соответствует паспорту специальности 1.5.11. Микробиология (Биологические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 1, 2, 4, 6, 7, 12 паспорта специальности.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие автора заключалось в анализе научной литературы, планировании и постановке экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке баз данных, публикации результатов исследований. Молекулярно-генетические исследования проведены совместно с сотрудниками группы метагеномных исследований и лабораторией

молекулярной генетики патогенных микроорганизмов. Исследование тканевых срезов для оценки патоморфологических изменений внутренних органов животных проведено совместно с сотрудниками ФГУ «НИИДИ ФМБА России». Разработка экспрессных тест-систем на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации проведена совместно с сотрудниками ООО «Люмэкс маркетинг».

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 20 научных работ, из них 7 статей – в научных рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК, 10 тезисов в материалах международных и всероссийских научных конференций, 3 свидетельства о регистрации базы данных.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав (обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и обсуждения полученных результатов), выводов, практических рекомендаций, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 138 страницах машинописного текста, иллюстрирована 18 таблицами, 18 рисунками. Список литературы содержит 20 отечественных и 169 зарубежных источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика рода *Klebsiella*

Род *Klebsiella* впервые был описан в 1885 г. и считается одним из первых изученных родов в порядке *Enterobacteriales*. Четыре основных его вида (*K. pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ozaenae* и *K. oxytoca*) были открыты в начале XX века. Род бактерий был назван В. Тревизаном в честь немецкого бактериолога Э.Т. Клебса, который обнаружил *K. pneumoniae* в трупах людей, умерших от крупозной пневмонии (1875). Чистая культура бактерий была выделена К. Фридендером (1882 г.) [14].

Микроорганизмы рода *Klebsiella* являются повсеместно распространенными условно-патогенными бактериями [17]. Клебсиеллы колонизируют слизистую оболочку толстого кишечника и верхних отделов респираторного тракта человека и различных животных. У 6 % здоровых людей выявляются клебсиеллы на слизистой оболочке верхних дыхательных путей и в носоглотке [54, 124]. Кишечник более 35 % здоровых людей колонизирован *K. pneumoniae* [54]. Бактерии также выделяют из воды, почвы, смывов с различных объектов, с древесины, а также с различных растений, включая сельскохозяйственные [131, 140, 164, 170].

Классические штаммы клебсиелл вызывают инфекции у новорожденных, пожилых и ослабленных лиц, а гипервирулентные штаммы - у здоровых людей [124]. Микроорганизмы данного вида являются причиной сепсиса, пневмонии, бактериемии, урогенитальных инфекций, конъюнктивитов, менингитов и гнойных абсцессов печени [124, 7].

K. pneumoniae обладает факторами вирулентности, к которым относят: капсульный антиген, липополисахарид (О-антиген), сидерофоры (низкомолекулярные соединения, которые секретируют бактерии для связывания ионов железа и транспортировки в клетку) и белки адгезии (фимбрии или пили III типа) [182]. Штаммы могут продуцировать

термолабильные и термостабильные энтеротоксины, цитотоксины, сериновые протеазы с широким спектром протеолитической активности [7, 8]. Как все энтеробактерии, клебсиеллы обладают эндотоксином [124].

K. pneumoniae устойчива к высыханию и может сохранять жизнеспособность, в том числе на искусственных поверхностях, что часто является причиной развития ноозокомиальных инфекций. Распространение инфекции происходит преимущественно при помощи контактного механизма, «от человека к человеку», с использованием медицинских инструментов, предметов обихода, электронных устройств (телефоны, клавиатуры компьютеров и др.) [29, 37, 85, 131, 148]. Передача клебсиелл возможна аэрогенным и фекально-оральным путями. Официальная статистика показывает, что до 9 % всех ИСМП, обусловлено штаммами клебсиелл [58, 172].

1.2 Морфологические, культуральные и биохимические свойства

K. pneumoniae

По морфологическим свойствам штаммы *K. pneumoniae* представляют собой неподвижные грамотрицательные палочки размером (0,3-1,0) мкм на (0,6-6,0) мкм, в мазках располагаются короткими цепочками, одиночно или парами [20]. Они являются факультативными анаэробами, хорошо растут на простых питательных средах в диапазоне температур от 12 °С до 43 °С и обладают выраженной биохимической активностью [14]. Оптимальная температура роста - 35-37 °С, оптимальный показатель рН - 7,2.

На агаризованных питательных средах бактерии образуют слизистые куполообразные блестящие S-формы и шероховатые, тусклые, мелкие R-формы. Последние характерны для бескапсульных неслизистых форм; такие колонии обычно образуют бактерии, которые выделены из мочи. На плотной питательной среде Эндо клебсиеллы образуют колонии красного цвета с металлическим блеском, поскольку ферментируют лактозу [14]. Клебсиеллы вызывают гомогенное помутнение жидких сред или образуют поверхностную плёнку [51].

Клебсиеллы неспорообразующие, в большинстве случаев имеют капсулы, за счет которых способны сохранять жизнеспособность в неблагоприятных условиях окружающей среды. Под действием антибиотиков клебсиеллы в отдельных случаях способны образовывать L-формы.

Биохимические свойства. Бактерии *K. pneumoniae* ферментируют глюкозу, сахарозу, лактозу, арабинозу, рамнозу, раффинозу, инозитол, сорбитол, маннитол, цитрат, являются уреазоположительными. Глюкозу ферментируют с образованием газа и кислоты [14]. Клебсиеллы в качестве источника азота в анаэробных условиях могут утилизировать атмосферный N₂ [20].

1.3 Клиническая значимость заболеваний, вызываемых штаммами

K. pneumoniae

В настоящее время *K. pneumoniae* является одним из наиболее распространенных условно-патогенных микроорганизмов, вызывая примерно треть инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями [121]. *K. pneumoniae* вызывает ИСМП: инфекции нижних дыхательных путей (ИНДП), катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей, инфекции в области хирургического вмешательства (ИОХВ), катетер-ассоциированные инфекции кровотока (КАИК) [40].

Госпитальные штаммы *K. pneumoniae* обладают высоким уровнем устойчивости к АМП. Широкое использование β-лактамов в качестве эмпирической терапии привело к селекции изолятов, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы. Локализация данных детерминант резистентности на мобильных генетических элементах (плазмидах, транспозонах) стала причиной внутривидового и межвидового переноса данных генов [2]. Распространение множественно-резистентных (MDR) штаммов *K. pneumoniae* приобретает эпидемический характер, отмечаются региональные особенности преобладания определенных генотипов, различающихся по характеру фенотипических проявлений [120].

В странах Прибалтийского региона и Санкт-Петербурге наиболее часто встречаются штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие металло- β -лактамазу NDM-1 и относящиеся к сиквенс-типу ST340 [21].

Информация о циркуляции определенных генотипов в большинстве регионов России практически отсутствует. Также недостаточно сведений о детальной молекулярно-генетической характеристике БЛРС-продуцирующих штаммов, включающей описание факторов патогенности, анализа структуры мобильных генетических элементов [3].

Штаммы hvKp способны вызывать внебольничные инфекции. Симптомы hvKp неспецифичны и могут включать лихорадку, озноб, боль в животе, тошноту и рвоту, но также могут быть обусловлены локализацией метастатической инфекции [56]. Наиболее распространенные локусы метастазирования включают глаза, легкие и ЦНС [65, 158]. Очаги локализации первичных и метастатических инфекций, вызванных hvKp, представлены на рисунке 1.

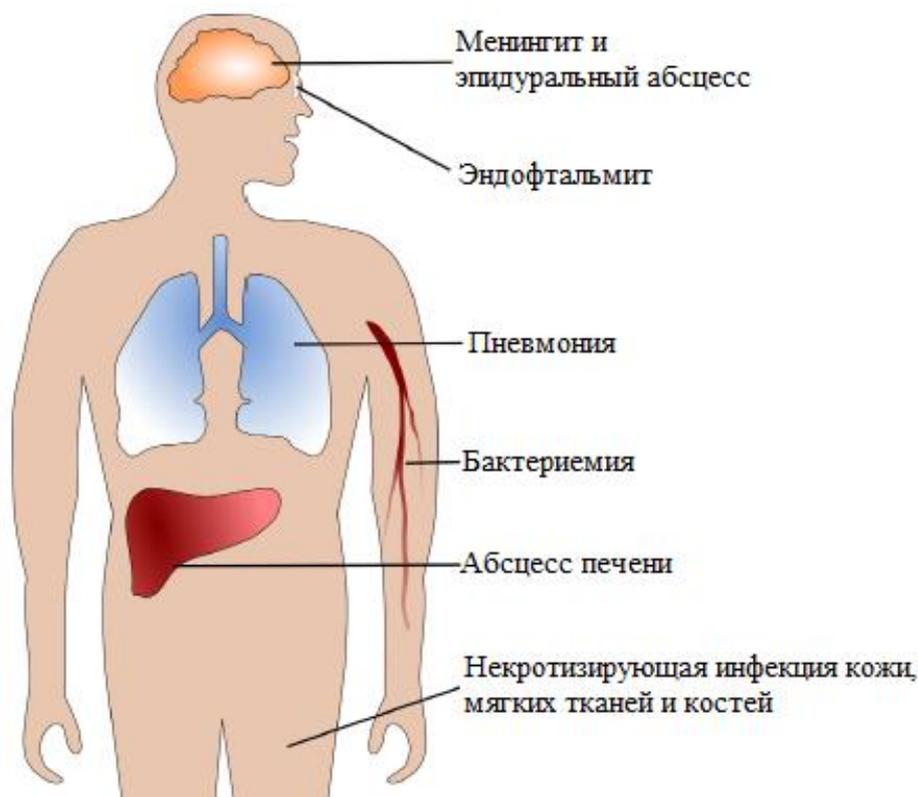


Рисунок 1 – Очаги локализации первичных и метастатических инфекций, вызванных hvKp (по Choby et al., 2020, с модификацией)

Отсутствие однозначных генотипических или фенотипических маркеров идентификации hvKp препятствует всестороннему пониманию распространенности и спектра заболеваний, вызываемых этими штаммами. В настоящее время маркер, обладающий чувствительностью и специфичностью, близкой к 100 % для штаммов hvKp не обнаружен. Однако гипермукоидный фенотип может являться указанием на принадлежность штамма к hvKp и часто ассоциируется с изолятами, вызывающими абсцессы печени [133].

1.4 Вирулентность *K. pneumoniae*

Факторы вирулентности *K. pneumoniae* обуславливают развитие всех основных стадий инфекционного процесса. Адгезия и колонизация происходит за счет фимбрий, инвазия и подавление неспецифической и иммунной защиты организма при помощи липополисахарида и ферментов, которые инактивируют иммуноглобулины, комплемент, лизоцим, интерфероны и другие гуморальные и клеточные компоненты иммунитета. Клебсиеллы продуцируют токсин колибактин, сидерофоры (аэробактин, энтеробактин, сальмохелин и др.) [182]. Геномы некоторых изолятов клебсиелл содержат генетические детерминанты других потенциальных факторов вирулентности: протеаза HtrA, резистентность к теллуриду и фосфолипаза D [47, 104]. Основные генетические детерминанты вирулентности *K. pneumoniae* и их функции приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Основные генетические детерминанты вирулентности *K. pneumoniae* и их функции

Генетическая детерминанта	Функция	Источник
<i>Капсула</i>		
<i>cps</i>	Кластер генов, участвующих в синтезе полисахаридов капсулы (<i>galF, cpsACP, wzi, wza, wzb, wzc, wzy, wxh, wbaP, wcaJ, gnd, ugd</i>)	[35]
<i>wzi</i>	Кодирует поверхностный белок, участвующий в сборке капсулы на наружной мембране клетки	[26]

Продолжение таблицы 1

Генетическая детерминанта	Функция	Источник
<i>wzy</i> и <i>wzx</i>	Гены, отвечающие за синтез капсульных полисахаридов	[70]
<i>rmpA</i> , <i>rmpA2</i>	Регуляторы гипермукоидного фенотипа (<i>c-rmpA</i> , – хромосомный ген, <i>p-rmpA</i> – плазмидный ген)	[78]
<i>rcaA</i> и <i>rcaB</i>	Регуляторы синтеза капсулы	[162]
<i>kvrA</i> и <i>kvrB</i>	Регуляторы транскрипции	[126]
<i>Липополисахарид</i>		
<i>rfb</i>	Кластер генов, отвечающих за биосинтез липополисахарида О-антигена (<i>glf</i> , <i>wbbM</i> , <i>wbbN</i> , <i>wbbO</i> , <i>wzm</i> , <i>wzt</i>)	[98]
<i>wab</i>	Ферменты синтеза липида А (<i>wabI</i> , <i>wabJ</i> , <i>wabK</i> , <i>wabM</i>)	[161]
<i>lpx</i>	Ферменты синтеза олигосахаридного ядра (<i>lpxL</i> , <i>lpxM</i> , <i>lpxP</i>)	[101]
<i>uge</i>	Ген уридин-дифосфат-галактуронат-4-эмпиразы	[83]
<i>wabG</i>	Ген, кодирующий глюкозилтрансферазу	[83]
<i>ycfM</i>	Ген, кодирующий липопротеин внешней мембраны	[63]
<i>Адгезия</i>		
<i>fim</i>	Кластер структурных генов фимбрий I типа (<i>fimA</i> , <i>fimH</i> , <i>gimF</i> , <i>fimG</i> , <i>fimC</i> , <i>fim I</i> , <i>fimK</i>)	[142]
<i>mrk</i>	Кластер структурных генов фимбрий III типа (<i>mrkA</i> , <i>mrkD</i> , <i>mrkB</i> , <i>mrkC</i> , <i>mrkE</i>)	[151]
<i>Сидерофоры</i>		
<i>entABCDEF</i>	Кластер, кодирующий синтез сидерофора энтеробактина	[125]
<i>iroBCDE</i>	Кластер, кодирующий синтез сидерофора сальмохелина	[28]
<i>iroN</i>	Ген, отвечающий за транспорт железа в клетку	[28]
<i>irp</i>	Ген, кодирующий синтез сидерофора иерсиниабактина (<i>irp-1</i> , <i>irp-2</i>)	[28]
<i>ybtS</i>	Ген, кодирующий синтез сидерофора иерсиниабактина	[99]
<i>iucABCDiutA</i>	Кластер, кодирующий синтез сидерофора аэробактина	[43]
<i>kfuABC</i>	Ген ABC-системы утилизации трехвалентного железа сидерофорами (<i>kfuA</i> , <i>kfuB</i> , <i>kfuC</i>)	[116]

Продолжение таблицы 1

Генетическая детерминанта	Функция	Источник
<i>Токсины</i>		
<i>pks</i>	Геномный остров, кодирует ферменты синтеза колибактина: пептидсинтазы и поликетидсинтазы (<i>clbA – clbS</i>)	[123]
<i>Внешняя мембрана</i>		
<i>ompK35/36</i>	Гены пориновых белков наружной мембраны	[171]
<i>Метаболизм аллantoина</i>		
<i>all</i>	Кластер генов аллantoин-утилизирующей системы (<i>allR, allS, allD, allA</i>)	[46]
<i>Другие</i>		
<i>terB</i>	Ген, предположительно связанный с резистентностью к теллуриду	[128]
<i>pld1</i>	Ген, кодирующий синтез фосфолипазы D	[104]
<i>peg-344</i>	Ген предполагаемого транспортера	[33]
<i>peg-589</i>	Ген, предполагаемый карбоксимутопланктон, семейства декарбоксилаз	[146]

Капсула (К-антиген) представляет собой полисахарид, синтезируемый *K. pneumoniae*, который ингибирует фагоцитоз, антимикробные пептиды, комплемент и индукцию воспалительной реакции макроорганизма [124]. Генетические детерминанты, ассоциированные с синтезом капсулы, являются хромосомными и в значительной степени консервативны у разных видов, но существуют вариации в полисахаридных компонентах капсулы, что является основой для типизации капсулы [45]. Серологическое типирование, которое основано на определении антигенов капсулы (К-антигенов), установило наличие 82 антигенных детерминант [89, 180]. Наиболее распространенными капсульными типами, ассоциированными с hvKp, являются K1 и K2, также описаны K5, K20, K47, K54, K57 и K64 [18, 45, 103, 146, 186].

Гипермукоидный фенотип формируется за счет гиперпродукции капсульных полисахаридов и экспрессии генов-регуляторов мукоидного

фенотипа – *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A) и *rmpA2* [173]. Гены *rscA* и *rscB* осуществляют положительную регуляцию кластера *cps* на уровне транскрипции [24, 93]. Гены-регуляторы мукоидного фенотипа могут быть локализованы на хромосоме, а также могут входить в состав плазмиды pLVPK (от англ. large virulence plasmid of *K. pneumoniae* – большая плазида *K. pneumoniae*, ассоциированная с вирулентностью) [78]. Гипермукоидный фенотип не требует наличия всех перечисленных генов [24, 78]. От 55 % до 100 % hvКр штаммов экспрессируют хотя бы один ген *rmpA* или *rmpA2*, и только от 7 % до 20 % сКр-штаммов содержат оба гена [106, 78].

Фимбрии необходимы для адгезии на клетках макроорганизма. Для *K. pneumoniae* характерны два типа фимбрий: тип 1, кодируемый кластером генов *fim*, и тип 3, кодируемый кластером генов *mrk*. Фимбрии 1-го типа являются основным фактором адгезии и экспрессируются практически у всех штаммов *K. pneumoniae* [151]. Основная функция фимбрий 3-го типа – образование биопленок; они экспрессируются у 57 % штаммов [22, 151]. Наиболее интенсивное биопленкообразование демонстрируют hvКр изоляты серотипа K1 [48]. Образование биопленок является одним из основных вирулентных свойств *K. pneumoniae*, поскольку в составе биопленки штамм становится недоступным для иммунных клеток макроорганизма (антимикробных пептидов, фагоцитов, систем комплемента) [32].

Липополисахарид (ЛПС) состоит из липида А, ядра или стержневой части и О-антигена. Эти компоненты кодируются генами в кластерах *wa*, *wb*, и *lpx* соответственно [55, 69]. В настоящее время неизвестно, играет ли значимую роль в гипервирулентности ЛПС, продуцируемый штаммами hvКр. О-антиген является первой молекулой, с которой сталкивается врожденная иммунная система макроорганизма и защищает бактерии от комплемент-опосредованного поглощения полиморфноядерными фагоцитами [189].

Среди факторов, которые обеспечивают рост и выживание *K. pneumoniae* в организме восприимчивого макроорганизма, важнейшими

являются сидерофоры: иерсиниабактин, энтеробактин, аэробактин, сальмохелин [97, 108, 156]. Сидерофоры — это низкомолекулярные соединения, которые секретируют бактерии для связывания и транспортировки ионов железа в клетку через специальные рецепторы. Бактериальные сидерофоры приводят к метаболическим нарушениям, в том числе к гибели клеток макроорганизма, лишая их ионов железа [34]. Железо необходимо бактериям для роста и размножения. Доступ к железу является основополагающим фактором, который обеспечивает способность штаммов *K. pneumoniae* вызывать инвазивные инфекции в организме как иммунокомпетентных, так и иммунокомпрометированных людей.

Синтез иерсиниабактина кодируется генами *ybt*, *irp1*, *irp2* и *fyuA*, которые располагаются на хромосомном «острове» высокой патогенности *Yersinia* (high-pathogenicity island, HPI) [77, 36]. Иерсиниабактин связывается белком плазмы трансферрином, поэтому штаммы *K. pneumoniae*, которые продуцируют данный сидерофор, не способны к диссеминации [27].

Энтеробактин кодируется кластером генов *entABCDEF*, расположенным на бактериальной хромосоме. По этой причине данный сидерофор является самым распространенным и продуцируется большинством штаммов *K. pneumoniae* [9]. Энтеробактин может быть инактивирован липокалином-2 (белок, секретируемый нейтрофилами и эпителиальными клетками дыхательных путей).

Аэробактин кодируется генным кластером *iucABCDiutA*, который входит в состав плазмиды pLVPK [43]. Аэробактин обнаруживается только у 6 % штаммов sKp и присутствует у 93–100 % штаммов hvKp [63, 187]. Присутствие аэробактина всегда связано с гипермукоидным фенотипом, но не все гипермукоидные штаммы обладают этим сидерофором [119]. Кластер генов аэробактина (*iucABCD*) и транспортер аэробактина *iutA* находятся на плазмиде вирулентности, которая также несет ген мукоидного фенотипа *rtxA* [166]. Аэробактин редко экспрессируется классическими штаммами,

вызывающими пневмонию, но он может быть преобладающим сидерофором, который экспрессируют гипервирулентные штаммы [143, 144].

Сальмохелин – это гликозирированная форма сидерофора энтеробактерина, которую кодируют гены кластера *iroBCDE* [28]. Такая модификация предупреждает связывание сальмохелина липокалин-2, что предотвращает нейтрализацию сидерофора и липокалин-2-зависимую индукцию воспаления [68]. Сальмохелин присутствует только у 2-4 % нозокомиальных штаммов *sKp*, но гораздо более распространен в штаммах *hVКp*. Данный сидерофор был обнаружен у 90 % гипервирулентных штаммов, ассоциированных с гнойным абсцессом печени [28, 63]. Сальмохелин и аэробактин не связываются тканевыми белками и являются более эффективными для выживания в организме человека по сравнению с энтеробактерином и иерсиниабактерином [20].

Колибактин является экзотоксином из группы цикломодулинов и способен вызывать в эукариотических клетках образование анафазных мостов, хромосомных aberrаций, повреждения ДНК [49, 123]. Синтез колибактина кодируется геномным «островом» *pks*, содержащим 19 генов (*clbA – clbS*) [123]. Факторы химического и физического стресса являются внешними стимулами для увеличения продукции генов *pks* [20]. Наличие «острова» *pks* более характерно для *hVКp* штаммов, обладающих капсульным типом K1, и регистрируется у 78,8 % из них [42].

Еще одним фактором вирулентности штаммов *K. pneumoniae* являются порины наружной мембраны, которые обеспечивают транспорт питательных веществ в бактериальную клетку. Штаммы, которые несут порины *OmpK35* и *OmpK36*, более вирулентны и менее чувствительны к фагоцитозу нейтрофилами [171].

Способность использовать аллантиин в качестве источника азота и углерода также является признаком, коррелирующим с вирулентностью штаммов. При изучении штаммов *K. pneumoniae* было обнаружено, что у *hVКp* штаммов транскрипция генов аллантиинового оперона (*allS*) выше, чем

у сКр изолятов [46]. Экспериментально доказано, что удаление гена, активирующего оперон, значительно снижает вирулентность штаммов [46].

Сравнение факторов вирулентности сКр и hvКр. Факторы вирулентности сКр и hvКр ответственны за различные составляющие патогенеза инфекции, вызванной *K. pneumoniae* (рисунок 2).

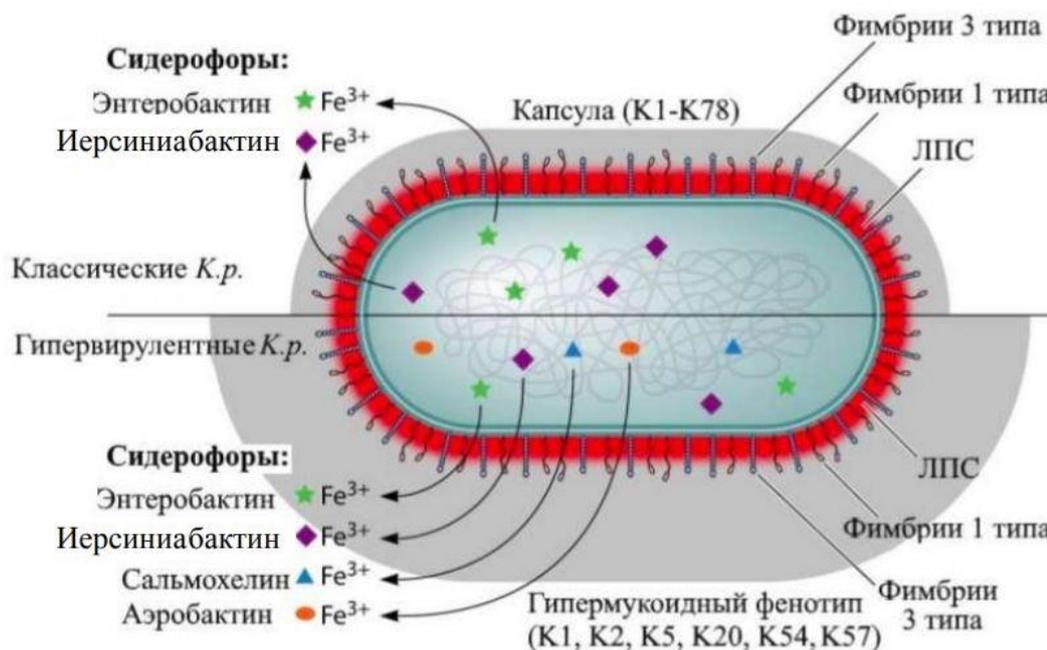


Рисунок 2 – Сравнение факторов вирулентности сКр и hvКр
(по Лев, 2018, Paczosa et al., 2016)

ЛПС характерен как для сКр штаммов, так и для hvКр, и может относиться к серотипам О-антигена от 1 до 9. Оба патотипа *K. pneumoniae* образуют связанные с мембраной адгезивные структуры - фимбриии типа 1 и типа 3, и секретируют сидерофоры [124]. Среди сидерофоров почти все штаммы продуцируют энтеробактин, около половины сКр и почти все hvКр штаммы - иерсиниабактин. Сальмохелин и аэробактин редко продуцируются классическими штаммами, но, как правило, секретируются гипервирулентными штаммами, при этом аэробактин является доминирующим сидерофором, продуцируемым hvКр штаммами [124].

Клинические проявления инфекций, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*, в большинстве случаев аналогичны другим внекишечным инфекциям. Исключение составляют случаи, когда возбудителем является

гипервирулентный штамм *K. pneumoniae*. Выделение hvKp штамма из очага инфекции указывает на особую тяжесть заболевания [20]. Попытки выявить характеристики, отличающие hvKp штаммы от cKp, предпринимаются с момента появления гипервирулентных штаммов. Сравнительная характеристика cKp и hvKp штаммов представлена в таблице 2 [12, 124, 156].
Таблица 2 - Характеристика cKp и hvKp штаммов *K. pneumoniae* (по Лев, 2018, Paczosa et al., 2016, Shon et al., 2013)

Характеристика	Классические <i>K. pneumoniae</i> (cKp)	Гипервирулентные <i>K. pneumoniae</i> (hvKp)
Инфекции	Пневмония, бактериемия, инфекции мочевыводящих путей	Абсцесс печени, легких, предстательной железы, почек и костей с метастатическими осложнениями такими как: эндофтальмит, менингит, некротизирующий фасциит
Группы риска	Лица с ослабленным иммунитетом	Лица с ослабленным иммунитетом и лица с нормальным иммунитетом
Тип инфекции	Внутрибольничные инфекции	Внутри- и внебольничные инфекции
Клиническая значимость	Высокая частота приобретения и передачи плазмид резистентности	Клинически значимы в связи с высокой смертностью
Способность к метастазированию	Нет	Способны к метастазированию в 80 % случаев (легкие, почки, кости, суставы, мышцы, селезенка, мягкие ткани, кожа, глаза, ЦНС)
Гипермукоидный фенотип штамма	Возможен	В большинстве случаев
Капсульные типы	K1–K78	K1, K2, K5, K20, K54, K57, K64
Устойчивость к АМП	Характерна множественная, экстремальная устойчивость и панрезистентность	В последнее время возрастает частота выделения штаммов с множественной устойчивостью
Генетические линии	CC11 (или CC258), CC15 и CC14	CC23, CC65 и CC86

Изначально большинство случаев инфицирования hVКр происходило во внебольничных условиях, но в настоящее время появляются сообщения, которые описывают ИСМП [51, 81]. Общие факторы риска инфекций, вызываемых сКр с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), включают: пребывание в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), ослабленный иммунитет и применение инвазивных устройств [31, 150]. Пациентов с риском инфицирования hVКр намного больше, чем известные группы риска [64]. Кроме того, гены, ассоциированные с вирулентностью, могут передаваться сКр штаммам с высоким риском МЛУ.

Характеристика гипервирулентных штаммов. Внутривидовое типирование штаммов клебсиелл проводят на основе протеомных, генетических и серологических методов. Серологическое типирование вытесняется молекулярно-генетическими методами типирования из-за низкой «разрешающей способности» и субъективности учёта результатов [20]. К молекулярно-генетическим методам относят полногеномное секвенирование и мультилокусное секвенирование-типирование (MLST). В некоторых публикациях прослеживается корреляция между ST-типами штаммов *K. pneumoniae* и локализацией инфекции [115]. Считается, что корреляция вирулентности с MLST-принадлежностью выражена сильнее, чем корреляция вирулентности с принадлежностью к серотипу [19]. Гипервирулентные штаммы наиболее часто принадлежат к следующему сиквенс-типам: ST86, ST380 и ST375 (ассоциированы с капсульным типом K2), ST57, ST23 (ассоциированы с капсульным типом K1) [156]. В литературных источниках к hVКр также часто относят: ST11, ST65, ST218, ST268, ST412, ST420 [60, 62, 109, 149, 188]. Штаммы *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью принадлежат к ST17, ST101, ST258, ST307 [76, 134].

Некоторые признаки hVКр-штаммов обусловлены наличием плазмиды вирулентности (например, pK2044 или pLVPK) и интегрированных хромосомных элементов (integrated chromosomal elements, ICE) [43]. Большая

плазмида вирулентности pLVPK содержит более 200 тыс. п. н. и кодирует гены транспорта железа (ABC transporter), синтеза сидерофоров сальмохелина и аэробактина, устойчивости к солям свинца (*pbr*), меди (*pco*), а также к теллуриду (*ter*) и серебру (*sil*), гены регуляторов мукоидного фенотипа, а также кластеры, гомологичные генам других видов бактерий (*Yersinia pestis*, *Burkholderia fungorum*, *Streptomyces coelicolor*) (рисунок 3) [9, 145].

Доказано, что у изолятов, утративших плазмиду pLVPK, наблюдается существенное снижение вирулентности, что подтверждает значительный вклад данной плазмиды в гипервирулентность штаммов *K. pneumoniae* [9]. Генетические детерминанты, присутствующие на данной плазмиде вирулентности, наиболее точно дифференцируют hvKp от cKp штаммов [146].

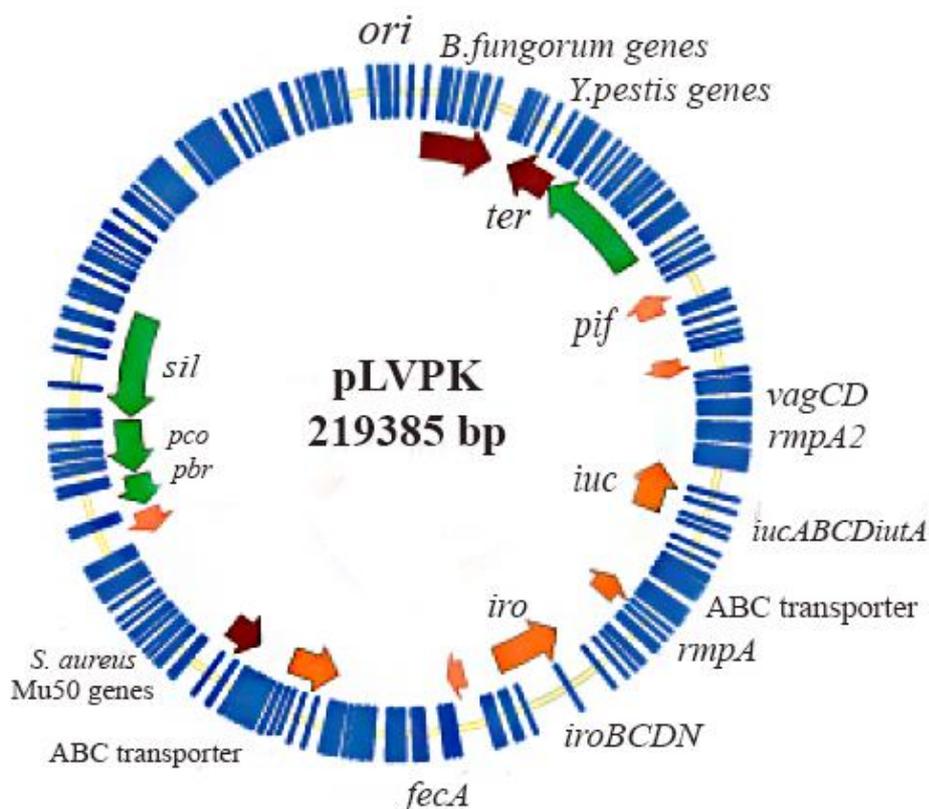


Рисунок 3 – Карта плазмиды pLVPK (GenBank: NC_005249)

(по Комисаровой и др., 2019)

Гипервирулентные и гипермукоидные штаммы.

Гипервирулентность *K. pneumoniae* — это способность микроорганизма вызывать тяжелые инвазивные инфекции или метастатическое распространение после первичного очага инфекции [38]. Гипермукоидный фенотип определяют при помощи «стринг-теста» – тест является положительным, если за бактериологической петлей от колонии бактериальной культуры тянется нить длиной более 5 мм [137].

В литературных источниках понятия «гипермукоидный» и «гипервирулентный» часто используют как синонимы; однако не все hvKp изоляты обладают гипермукоидным фенотипом, и не все гипермукоидные штаммы вызывают инвазивные инфекции (рисунок 4) [38, 169].



Рисунок 4 – Диаграмма Венна, показывающая различия и сходство между гипермукоидными и hvKp штаммами (по Catalan-Najera et al., 2017, с модификацией)

Гипервирулентность исследуемого штамма должна определяться не только фенотипом, но также клиническими характеристиками инфекции и генотипом. Иначе говоря, гипервирулентность выходит за рамки положительного стринг-теста и капсульного серотипа [115].

Первоначально гипервирулентные штаммы были обнаружены преимущественно в Азии и редко были устойчивы к АМП. Однако недавние научные статьи указывают на появление hvKp штаммов в новых географических регионах и распространение среди них множественно-резистентных штаммов [64]. Серьезную угрозу представляет появление конвергентных штаммов *K. pneumoniae* с гипервирулентностью и резистентностью к резервным АМП, таким как карбапенемы [1]. При конвергенции антибиотикорезистентности и гипервирулентности в *K. pneumoniae*, такие штаммы могут вызывать трудно поддающиеся лечению инфекции [94]. В случае если гипервирулентные штаммы распространятся в медицинских учреждениях, можно ожидать еще более высокую заболеваемость и смертность [64].

Методы выявления факторов вирулентности.

Среди маркеров для четкого разграничения патотипов сKp и hvKp предлагаются различные сочетания фенотипических признаков и детекции генов, например, положительный тест на два из трех маркеров: стринг-теста, наличия гена *rtxA* и продукции сидерофора аэробактина [179] или количественно высокую продукцию сидерофоров. Список маркеров включает около 20 генов, каждый из которых с высокой частотой ассоциирован с гипервирулентным патотипом, но ни один из них не обладает 100 % специфичностью [18].

Для дифференциации мукоидного фенотипа от гипермукоидного используют стринг-тест [137]. Степень корреляции стринг-теста с гипервирулентностью может достигать 90 % [146, 174], что делает этот фенотипический признак важным диагностическим инструментом, но недостаточным для достоверной дифференциации классического патотипа от гипервирулентного [18].

Серологическое типирование основано на исследовании K-антигена. Серотипирование проводят в реакции агглютинации на стекле с использованием K-сывороток к известным K-антигенам или методом

набухания капсулы (capsular swelling method). Метод набухания капсулы основывается на том, что при добавлении сыворотки, содержащей антитела против капсульных полисахаридов данного серотипа к суспензии бактерий, происходит склеивание и набухание капсулы, которое хорошо видно под микроскопом [138]. В Российской Федерации этот метод не используется в связи с отсутствием диагностических агглютинирующих сывороток.

Продукция сидерофоров является основным фактором вирулентности *K. pneumoniae*. Качественный анализ продукции сидерофоров проводят с использованием питательной среды, содержащей краситель хромазуrol S (CAS) [113, 153]. В данном анализе возникает конкуренция за поглощение железа между сидерофором и комплексом трехвалентного железа красителя (комплекс CAS – железо – детергент). Сидерофоры хелатируют железо из комплекса железо-краситель, что вызывает изменение цвета красителя с синего на оранжевый (рисунок 5) [153]. Культивирование бактерий на среде с использованием CAS является универсальным колориметрическим методом, с помощью которого определяют продукцию сидерофоров независимо от их типа. В *hν*Kp продукция аэробактина составляет около 80–90 % от общей продукции сидерофоров [144].

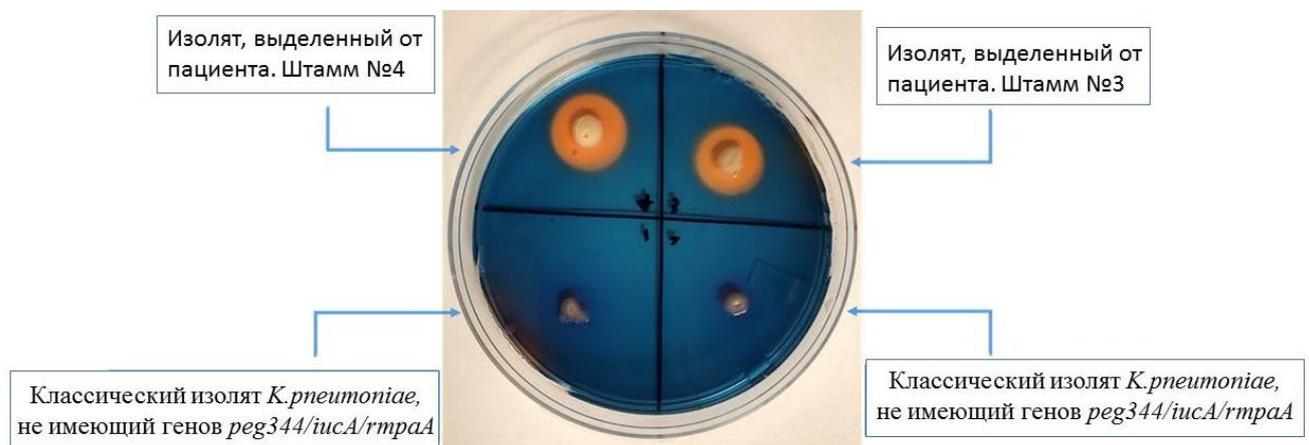


Рисунок 5 – Анализ на продукцию сидерофоров на среде с хромазуролом S
(по Parrott et.al, 2020)

В настоящее время все чаще используют молекулярно-генетические методы для быстрого скрининга ключевых генетических детерминант

вирулентности как более надежного идентификатора гипервирулентности: детекция генов вирулентности, MLST-типирование, полногеномное секвенирование и гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE). В связи с отсутствием мишени, достоверно связанной с вирулентностью, коммерческие тест-системы не производят.

Клиническую роль и эпидемическую значимость изолята можно оценить с помощью MLST-типирования, основанного на анализе нуклеотидных последовательностей конституционных генов. Он позволяет определить сиквенс-тип (ST-тип) штамма и его клональную принадлежность с использованием международных баз данных, сравнить изучаемый изолят со штаммами из разных регионов мира, а также определить родство между ними [57, 11, 73].

Для определения вирулентности *K. pneumoniae* биологическим методом используют экспериментальную модель инфицирования белых аутбредных мышей. В исследовании штаммов, выделенных от лиц с инвазивными инфекциями (абсцесс печени, некротизирующий фасциит, эндофтальмит) с использованием модели заражения инбредных мышей, по величине летальной дозы было выявлено три группы штаммов: авирулентные (сКр) (отсутствие летальности при 10^6 КОЕ), вирулентные (LD_{50} 10^4 – 10^5 КОЕ) и высоковирулентные (LD_{50} $< 10^3$ КОЕ) [100].

Метод матрично-ассоциированной лазерной десорбции / ионизации – времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS) обладает высокой мощностью для идентификации клинически значимых бактерий и также используется для выявления продуктов экспрессии генов устойчивости к АМП и факторов вирулентности [87]. В исследовании Huang Y. были обнаружены четыре пика (m/z 3587, 4745, 5045 и 5149), которые позволяют дифференцировать штаммы *K. pneumoniae* серотипа K1 от штаммов, не принадлежащих к данному серотипу [80].

1.5 Антибиотикорезистентность *K. pneumoniae*

Механизмы лекарственной устойчивости. *K. pneumoniae* обладает природной устойчивостью к следующим АМП: гликопептидам, пенициллинам, линкозамидам, макролидам, стрептограминам, линезолиду, фузидовой кислоте, рифампицину, и даптомицину. Адаптивная резистентность клебсиелл определяется приобретенным генетическим материалом от других устойчивых бактерий или внутренними генетическими перестройками. Приобретенная резистентность может обеспечить защиту штаммов *K. pneumoniae* от всех известных групп АМП [20].

Выявленные на сегодняшний день механизмы устойчивости бактерий к АМП подразделяют на 5 основных групп: активное выведение АМП из бактериальной клетки (эффлюксные насосы *oqxA*, *oqxB* и др.), инактивация молекулы АМП (β -лактамазы), изменение проницаемости микробной клетки (модификация поринов *OmpK35*, *OmpK36* и др.), модификация мишени действия АМП (мутации в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* и др.) и активация метаболического шунта (приобретение генов *dhfR*).

Таблица 3 - Генетические детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам, характерные для *K. pneumoniae*, и их функции

Генетическая детерминанта	Функция	Класс АМП	Источник
<i>Инактивация молекулы АМП</i>			
<i>bla</i>	кодирует бета-лактамазы (<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i>)	β -лактамы	[121]
<i>aac</i> , <i>aad</i> , <i>aph</i>	гены, кодирующие аминогликозид-модифицирующие ферменты	аминогликозиды	[72]
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	ген, кодирующий аминогликозид-ацетилтрансферазу	фторхинолоны аминогликозиды	[75]
<i>Cat</i>	СНЛ-ацетилтрансфераза	хлорамфеникол	[71]

Продолжение таблицы 3

Генетическая детерминанта	Функция	Класс АМП	Источник
<i>Инактивация молекулы АМП</i>			
<i>fosA</i>	фермент, инактивирующий фосфомицин	фосфомицин	[82]
<i>sul</i>	кодирует синтез дигидроптероатсинтазы	сульфаниламиды триметоприм	[159]
<i>tetX</i>	кодирует тетрациклин-инактивирующий фермент	тетрациклины	[117]
<i>Модификация мишени действия АМП</i>			
<i>gyrA, gyrB</i>	кодируют ДНК-гиразу	фторхинолоны	[41]
<i>parC, parE</i>	кодируют топоизомеразу IV	фторхинолоны	[41]
<i>armA, rmtB, rmtC</i>	Кодируют метилтрансферазу (резистентность за счет метилирования 16S рРНК)	аминогликозиды	[72]
<i>murA</i>	фермент MurA или UDP-N-ацетилглюкозаминенолпирувил трансфераза, участвующая в синтезе пептидогликана	фосфомицин	[114]
<i>mgrB</i>	регуляция синтеза ЛПС	полимиксины	[122]
<i>mcr</i>	кодирует фермент фосфатидилэтаноламинотрансферазу, которая нарушает нормальный синтез ЛПС	полимиксины	[112]
<i>pmr</i>	кодируют ферменты, непосредственно участвующие в модификации ЛПС (<i>pmrA, pmrB, pmrC, pmrE</i>)	полимиксины	[132]
<i>Активация эффлюксных насосов</i>			
<i>acrAB-TolC</i>	система эффлюкса	β -лактамы фторхинолоны аминогликозиды тетрациклины хлорамфеникол нитрофураны	[135, 147, 152, 184]
<i>acrAD</i>	эффлюкс-насос	аминогликозиды	[72]
<i>kpnEF</i>	эффлюкс-насос	аминогликозиды тетрациклины	[135]
<i>oqxAB</i>	эффлюкс-насос цитоплазматической мембраны	фторхинолоны тетрациклины нитрофураны	[141, 184]

Продолжение таблицы 3

Генетическая детерминанта	Функция	Класс АМП	Источник
<i>Активация эффлюксных насосов</i>			
<i>qepA</i>	эффлюкс-насос цитоплазматической мембраны	фторхинолоны	[75, 86]
<i>tet</i>	эффлюкс-насос для выведения тетрациклина (<i>tetA, tetB, tetC, tetD, tetE, tetL</i>)	тетрациклины	[44, 177]
<i>Изменение проницаемости микробной клетки (мутации или утрата перечисленных генов)</i>			
<i>ompK35</i>	кодирует пориновый белок наружной мембраны	β -лактамы тетрациклины фторхинолоны хлорамфеникол	[59]
<i>ompK36</i>	кодирует пориновый белок наружной мембраны	β -лактамы	[135]
<i>lamB</i>	кодирует транспорт мальтозы и мальтодекстринов	β -лактамы	[50]
<i>phoE</i>	кодирует транспорт неорганических соединений фосфора	β -лактамы	[88]
<i>kpnO</i>	кодирует транспорт высокомолекулярных полисахаридов для формирования капсулы	β -лактамы аминогликозиды	[160]
<i>Активация метаболического шунта</i>			
<i>dhfR</i>	дегидрофолат-редуктаза	сульфаниламиды триметоприм	[167]

Методы оценки чувствительности к АМП: фенотипические, молекулярно-генетические (ПЦР), масс-спектрометрические (MALDI-TOF MS). К фенотипическим методам относят: метод последовательных (серийных) разведений, диффузионные методы: диско-диффузионный метод (ДДМ) и метод градиентной диффузии (Е-тест), автоматизированный метод и метод определения активности ферментов, разрушающих АМП (метод инактивации карбапенемов - Carbapenem Inactivation Method, CIM) [15, 90].

Молекулярно-генетические методы, в том числе наиболее распространенный - ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ),

используют для обнаружения и идентификации генов резистентности, как в выделенной чистой культуре, так и в образцах биоматериала. Преимущества ПЦР-РВ: высокая специфичность и чувствительность, быстрая скорость реакции (от 1 до 3 часов) [6]. В настоящее время в Российской Федерации доступны коммерческие тест-системы на основе ПЦР-РВ, позволяющие выявлять гены карбапенемаз следующих групп: NDM, OXA-48, KPC, IMP и VIM. Ограничение метода – невозможность детекции редких типов карбапенемаз, которые не входят в тест-системы, невозможность фенотипической оценки экспрессии исследуемых генов [6].

Перспективным методом оценки чувствительности к АМП является MALDI-TOF MS. Анализ спектров с использованием определенных статистических алгоритмов дает возможность выявить участки спектра, которые коррелируют с резистентностью к АМП [157].

По данным центра по контролю и профилактике заболеваний (center for disease control and prevention, CDC) российские штаммы клебсиелл находятся на первом месте в мире по резистентности к цефалоспорином третьего поколения, фторхинолонам, аминогликозидам, защищенному пенициллину – амоксиклаву, карбапенемам, оставаясь более-менее чувствительными к полимиксинам [168].

1.6 Заключение по главе 1

K. pneumoniae в настоящее время является серьезной угрозой для здоровья человека ввиду появления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью и гипервирулентных штаммов, связанных с тяжелыми внебольничными инфекциями [13].

Поскольку определение генов вирулентности для *K. pneumoniae* не является частью лабораторной диагностики, гипервирулентные штаммы могут быть не обнаружены [64]. Фенотипические тесты, например стринг-тест для определения гипермукоидности изолята, имеют низкую чувствительность [38]. Идентификация и диагностика гипервирулентных штаммов является достаточно сложной задачей и требуют проведения

молекулярных исследований для надежного определения данных штаммов [64].

Точные диагностические маркеры для идентификации hνKp необходимы для осуществления оптимальной клинической помощи и эпидемиологического надзора за распространением hνKp, особенно в связи с появлением множественно-устойчивых гипервирулентных штаммов. В зависимости от частоты обнаружения гипервирулентных изолятов, может оказаться необходимой идентификация основных маркеров вирулентности в микробиологических лабораториях, поскольку обнаружение hνKp может представлять значимую информацию для клинического ведения пациентов с инфекциями, вызванными гипервирулентными клебсиеллами [20].

Практическая потребность в быстром лабораторном обнаружении hνKp очевидна. В настоящее время нет однозначных и общепринятых фенотипических и генетических критериев, позволяющих дифференцировать hνKp. Следует также учитывать наиболее важные параметры тяжести течения и исхода заболевания у человека. Но клиническая картина, характерная для hνKp, может быть вызвана и сKp, что требует использования дополнительных маркеров вирулентности [18].

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости разработки комплексного диагностического теста для определения hνKp штаммов в микробиологических лабораториях.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Бактериологические методы

Материалы. Исследованные в работе изоляты *K. pneumoniae* (n = 285), были выделены из проб биологического материала (содержимого абсцесса, крови, желчи, мочи, отделяемого из брюшной полости, мокроты и др.) от госпитализированных пациентов города Санкт-Петербург: СПб ГБУЗ "Городская больница №14", Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова и амбулаторных пациентов. Штаммы *K. pneumoniae* были выделены от лиц со следующими диагнозами: пневмония, флегмоны различной локализации, подпеченочный абсцесс, сепсис, киста поджелудочной железы, синовит, синдром диабетической стопы, ишемическая болезнь сердца (ИБС) и др.

Питательные среды, условия культивирования и хранения бактерий. Культивирование бактерий проводили на плотных питательных средах в течение 18-24 ч при температуре 37 °С. В работе использовали следующие питательные среды: «Среда Эндо» (ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (НИЦФ), Санкт-Петербург, Россия), «ГМФ-агар» (ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии» (НИЦФ), Санкт-Петербург, Россия), «Muller-Hinton broth» (Himedia, Мумбаи, Индия), «Muller-Hinton agar» (Himedia, Мумбаи, Индия).

Выделенные штаммы *K. pneumoniae* хранили в лиофильно высушенном виде при температуре 2-8 °С. Для лиофилизации штаммов использовали среду следующего состава: 1 л фосфатного буферного раствора (ФБР), 10 г желатина и 10 г сахарозы.

Видовая идентификация бактерий. Идентификацию изолятов до вида проводили методом MALDI-TOF MS с использованием системы Microflex LT и программного обеспечения MALDI Biotyper v.30 (Bruker Daltonik, Германия). В качестве критерия надежной видовой идентификации использовали значения score $\geq 2,0$.

Стринг-тест. Гипермукоидность исследуемых штаммов определяли при помощи «стринг-теста» [137] на суточной культуре бактерий. Тест считали положительным, если слизистая «нить» длиной более 5 мм тянулась за бактериологической петлей от поверхности колонии.

Определение чувствительности к антимикробным препаратам.

Чувствительность штаммов оценивали к 9 АМП, которые принадлежали к различным классам: ингибиторозащищенные пенициллины (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат), цефалоспорины III и IV поколения (цефтазидим, цефепим), карбапенемы (меропенем), хинолоны (ципрофлоксацин), сульфаниламиды (триметоприм/сульфаметоксазол), аминогликозиды (амикацин), полимиксины (колистин). Чувствительность к вышеперечисленным антибиотикам (кроме колистина) оценивали при помощи ДДМ на агаре Muller-Hinton agar с помощью дисков (ФБУН НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург) в соответствии с российскими клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2021-01) и рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST Breakpoint tables v 14.0.

Оценку чувствительности к АМП из группы полимиксинов (колистину) проводили с использованием метода серийных разведений в соответствии с российскими клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2021-01) в бульоне Muller-Hinton (приготовленного в соответствии с инструкцией производителя) в полистироловых 96-ти луночных планшетах («Медполимер», РФ). Для приготовления рабочего раствора антибиотика использовали субстанцию колистин сульфата (CAS Number 1264-72-8) в форме порошка (Sigma Aldrich, Германия). Колистин сульфат растворяли в дистиллированной воде (предварительно простерилизованной) до концентрации антибиотика 12,8 мг/мл. Внесение раствора колистина в лунки полистиролового планшета проводили методом последовательных

двукратных серийных разведений (до концентрации 0,032 мкг/мл). В последние две лунки планшета раствор антибиотика не вносили: они служили положительным (K+) и отрицательным (K-) контролями. Интерпретацию результатов определения чувствительности к колистину проводили согласно российским клиническим рекомендациям и рекомендациям EUCAST Breakpoint tables v 14.0.

2.2 Молекулярно-генетические методы

Экстракция ДНК. Бактериальную ДНК экстрагировали из колоний, выращенных на плотной питательной среде, с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Хильден, Германия) и diaGene для выделения из бактериальных клеток геномной ДНК (Диаэм, Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

ПЦР-детекция генов вирулентности. Специфические фрагменты 12 генов вирулентности (гены, кодирующие синтез сидерофоров: аэробактина (*iucA*, *iutA*), сальмохелина (*iroB*), энтеробактина (*entB*), иерсиниабактина (*irp2*); гены регуляторов мукоидного фенотипа (*prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*), предполагаемого транспортера (*peg-344*), резистентности к теллуриду (*terB*), ген карбоксимутуопланктон семейства декарбоксилаз (*peg-589*)) в штаммах *K. pneumoniae* обнаруживали методом ПЦР с электрофоретической детекцией. ПЦР проводили с использованием смеси «Taq M мастер-микс» («Алкор Био», Россия) на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технологии» Россия).

Генетические маркеры для идентификации гипервирулентных штаммов, исследованные в работе, их функции и размер ампликонов указаны в Приложении Г. Праймеры синтезировали в ЗАО «ЕВРОГЕН» (Москва, Россия). Программа амплификации включала предварительную денатурацию при температуре 95 °С в течение 5 минут, с последующими 30 циклами денатурации в течение 40 сек при температуре 95 °С, отжига праймеров (при температуре и времени, оптимальных для каждой используемой пары специфических праймеров) и элонгации в течение 40 сек при температуре 72 °С. Программу завершала финальная элонгация в течение 3 мин при

температуре 72 °С. Визуализацию ПЦР продуктов проводили в 1,5 % агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле. Для электрофореза использовали 25-кратный Трис-ацетатный буфер (ТАЕ), (ООО НПП «ПанЭко», Россия). Процедуру электрофореза продуктов ПЦР проводили в электрофоретической камере для горизонтального электрофореза SE-2 (Helicon, Россия) в 1,5 % агарозном геле (Helicon, Россия) с использованием маркера длины фрагментов ДНК Step100 Long («Биолабмикс», Россия), при напряжении 100 V. Агарозный гель окрашивали раствором этидиума бромидом с концентрацией 10 г/л. Визуализацию (гель-документацию) проводили в проходящем УФ-свете с длиной волны 312 нм с использованием трансиллюминатора (Vilber Lourmat, Франция).

Секвенирование генома. Для секвенирования геномов штаммов *K. pneumoniae* (n=85) отбирали по 500 нг бактериальной ДНК и фрагментировали на приборе Covaris M220. Библиотеки ДНК подготавливали с помощью набора TruSeq DNA Nano (Illumina, США) по протоколу производителя и с расчётом на средний размер вставки 550 п.н. Секвенирование готовых библиотек ДНК осуществляли на приборе MiSeq с помощью набора MiSeq Reagent Kit v3. Чтение проводили с двух сторон по 300 п.н.

2.3 Биологические методы

Лабораторные животные. В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали самок белых инбредных мышей, которых получили из БиоПитомника «Стезар» (поселок Красногвардейский, Суздальский район, Владимирская область, Россия). После карантина в течение 14 дней в виварии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, согласно РД-АПК 3.10.07.02-09 «Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведениях» [16], модельных животных (весом от 19 до 22 г.) содержали в стандартных условиях, в соответствии с требованиями

руководства по содержанию и использованию лабораторных животных [52] и учетом правил, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986), при свободном доступе к воде и корму (Тосненский комбикормовый завод, Ленинградская обл., Россия).

Подготовка бактериальных суспензий для заражения. Культуру *K. pneumoniae* выращивали на плотной питательной среде «ГМФ-агар» (ООО НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия) в течение 24 ч при температуре 37 °С. Изолированные колонии ресуспендировали в физиологическом растворе до плотности 0,5 по стандарту МакФарланда, что соответствовало $1,5 \times 10^8$ колониобразующих единиц (КОЕ) в мл, готовили серийные разведения, соответствующие 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/мл. Лабораторным животным вводили бактериальную культуру внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл.

В исследовании использовали 30 штаммов *K. pneumoniae*, которые были отобраны по следующим параметрам: наличие положительного стринг-теста и капсульных типов, характерных для вирулентных штаммов (K1, K2, K57) (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика штаммов *K. pneumoniae*, которые были исследованы биологическим методом

Штамм	Vir. score	K-тип	ST-тип	Стринг-тест, мм
172	5	K1	ST23	15
64	5	K1	ST23	40
844	5	K1	ST23	40
894	5	K1	ST23	100
880	5	K1	ST23	20
184	5	K1	ST23	120
138	5	K2	ST380	50
1	5	K2	ST65	17
2399	4	K2	ST395	0
480	4	K2	ST86	0
933	4	K2	ST395	30
396	4	K2	ST395	10
847	4	K57	ST23	0
956	4	K57	ST23	0

Продолжение таблицы 4

Штамм	Vir. score	K-тип	ST-тип	Стринг-тест, мм
958	4	K57	ST23	0
2943	4	K57	ST23	0
2946	4	K57	ST23	0
2947	4	K57	ST23	0
537	3	K2	ST86	10
67	3	K2	ST86-1LV	55
766	3	K2	ST86	15
830	3	K2	ST86	55
962	3	K24	ST20	50
60	3	K45	ST874	0
336	3	KL107	ST512	10
988	3	KL107	ST512	20
913	1	K2	ST395	50
778	0	K24	ST11	0
146	0	K2	ST395	20
506	0	K62	ST556	0

Оценка вирулентности бактерий на модели инфекции, обусловленной штаммами K. pneumoniae, у белых мышей

На первом этапе работы аутобредным белым мышам вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозе 1×10^6 КОЕ. Для определения LD₅₀ отбирали штаммы, вызывающие гибель лабораторных животных в максимальной инфицирующей дозе. На втором этапе исследования мышам вводили по 0,1 мл бактериальной культуры в дозах 1×10^2 и 1×10^4 КОЕ. Каждой дозой инфицировали трех мышей.

За лабораторными животными наблюдали в течение 2 недель после заражения. Смерть животного, вызванную штаммами *K. pneumoniae*, подтверждали выделением чистой культуры из паренхиматозных органов (селезенка, легкие, печень) и крови животных. Культура, использованная в группе выживших животных, оценивалась как авирулентная. Гибель животного свидетельствовала о потенциальной вирулентности исследуемого штамма. LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева [4].

2.4 Морфологические методы

Патоморфологические изменения в селезенке и печени изучали у мышей из контрольной и опытной групп на приготовленных гистологических срезах, окрашенных гематоксилином/эозином с увеличениями $\times 40$, $\times 90$. Контрольная группа включала мышей, которые были заражены авирулентным изолятом ($n=3$), а опытная группа – вирулентными ($n=3$).

2.5 Биоинформатические методы

Прочтения готовили к сборке с использованием Trim Galore (version 0.6.7), качество прочтений проверяли программой FastQC (version 0.11.9). Сборку геномов *de novo* производили в программе SPAdes (version 3.15.5) [130]. Качество сборки анализировали с помощью QUAST (version 5.2.0) [53].

Обнаружение локусов вирулентности, ассоциированных с транспозоном ICEKp (*rmpA*, *clb*, *ybt*, *iro*), определение ST-типов изолятов, плазмидных локусов вирулентности (*rmpA*, *rmpA2*, *iuc*, *iro*) и генетических детерминант резистентности к АМП (β -лактамазы, мутации и приобретенные гены) осуществляли с использованием программного обеспечения Kleborate [95]. Определение К серотипов производили с использованием ПО Kaptive [96, 180].

2.6 Разработка экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*

Разработку микрочиповых панелей осуществляли на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации «АриаДНА» («Люмэкс-Маркетинг», Россия).

Специфические последовательности генов вирулентности и антибиотикорезистентности клебсиелл были взяты из базы данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Подбор праймеров осуществляли при помощи программы Oligo v.6 (Molecular Biology Insights, США). Специфичность праймеров проверяли с использованием алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Праймеры, использованные для выявления генетических детерминант вирулентности, для разработки диагностической микрочиповой панели представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Гены и нуклеотидные последовательности для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на микрочиповой панели

Ген	Функция	Нуклеотидная последовательность, 5' - 3'
<i>iucA</i>	Синтез азробактина	F: CGGACGTTGATGTTTTGC
		R: CAATTGCCGCGCATACT
		Probe: CCTGGGCCTAGTGGTGCTGC
<i>MagA</i> K1	Синтез капсулы (серотип K1)	F: CGAAAGTGAACGAATTGATG
		R: GTTTCTGCTGCAGATTCGA
		Probe: CATGCAATAGCCACGTTTTATGAG
<i>Wzy</i> K2	Синтез капсулы (серотип K2)	F: GACCCGATATTCATACTTGACA
		R: CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC
		Probe: CGCTTTACTATTTCATTGCGACAA
<i>uni- rmpA</i>	Регулятор гипермукоидного фенотипа (универсальный праймер для <i>rmpA</i> , <i>rmpA2</i> , <i>crmpA</i>)	F: ATAGATGTCATAATCACACCCTT
		R: TTATTATGGCCTAAAGCTGTTA
		Probe: CGAAAYGTCAAGCCACATCCAT
<i>peg- 344</i>	Предполагаемый транспортер	F: GAAAGGACAGAAAGCCAGTG
		R: TCAAAGATACTCCCCACCAG
		Probe: CCCAGCTATAAAACACGGTAACGC
<i>iroB</i>	Синтез сидерофора сальмохелина	F: ACTTCACTGGCGGAATCC
		R: GACGGCGAACCCATTAT
		Probe: TCGACCATCGGTTTGACGGT
<i>Klebs</i>	Видоспецифичный праймер	F1: TCAGGCATCATGGCGA
		F2: TCTGACATCATGGCGA
		R: GCATCTGCCACACCTTTC
		Probe: FAM- AATAAGCATCCGGGTAAAAAGGG-BHQ1

Синтез олигонуклеотидов для исследования производили в «АлкорБио» (Санкт-Петербург, Россия).

Праймеры, использованные для выявления генетических детерминант антибиотикорезистентности, для разработки диагностической микрочиповой панели представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Гены и нуклеотидные последовательности для оценки резистентности штаммов *K. pneumoniae* на микрочиповой панели

Ген	Механизм резистентности	Нуклеотидная последовательность, 5' - 3'
<i>OXA-48</i>	Карбапенемаза	F: CCAATGGTGA CTATATTATTCGG
		R: CCACACATTATCATCAAGTTCAA
		Probe: CAACCGACCCACCAGCCAATC
<i>NDM</i>	Металло- β -лактамаза	F: GGT TTGGCGATCTGGTTTTC
		R: ATCGGTCCAGGCGGTAT
		Probe: CACTTCSTATCTCGACATGCCG
<i>KPC</i>	Карбапенемаза	F: GCCGCCCAACTCCTTC
		R: CAGGCATGACGGTGGC
		Probe: TGGCGGCGGCGTTATCACT
<i>CTX-M-UNI</i>	β -лактамаза расширенного спектра	F: GCGATGTGCAGTACCAGTAA
		R: TAACGTGTTTCTCCGCAAT
		Probe: CGGCGGTGCTTAAACAGAGC
<i>qnrS1, qnrS2</i>	Белки, экранирующие мишени фторхинолонов	F: TTAAGTCTGACTCTTTCAGTGATG
		R: GTGAGTAATCGTATGTA CTTTTGC
		Probe: TCCTATCCAGCGATTTTCAAACA

Диагностические панели для оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* были апробированы на алюминиевых микрочипах, содержащих 30 микрореакторов объемом 1,2 мкл (рисунок 6).

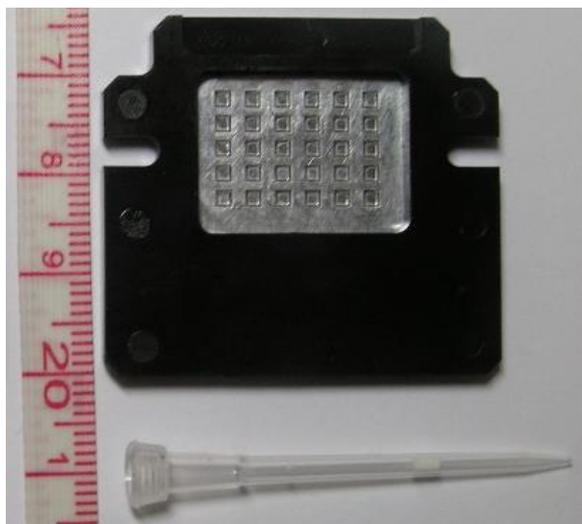


Рисунок 6 – Алюминиевый микрочип на 30 ячеек

Для проверки работоспособности диагностических панелей в качестве положительных контролей использовали штаммы, в которых по результатам полногеномного секвенирования были обнаружены генетические детерминанты вирулентности, выбранные для разработки микрочиповой панели. В качестве отрицательных контролей использовали штаммы, в которых не было обнаружено необходимых генетических детерминант по результатам полногеномного секвенирования. Для проверки видоспецифичного праймера анализировали ДНК, выделенную из чистых культур следующих микроорганизмов: *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Raoultella ornithinolytica*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*.

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием двухканального амплификатора нуклеиновых кислот «АриаДНА» («Люмэкс-Маркетинг», Россия) на алюминиевых микрочипах. ПЦР-смесь объемом 25 мкл включала: 2,5 мкл $\times 10$ ПЦР-буфера, 0,6 мкл смеси дНТФ (10 мМ), 2 мкл смеси олигонуклеотидов (5 пмоль/мкл каждого праймера и 2,5 пмоль/мкл зонда), 0,5 мкл Таq-полимеразы (5 ед/мкл; «СибЭнзим», Россия), 9 мкл ДНК и 10,4 мкл деионизованной воды. В микрореакторы чипа вносили 1,2 мкл ПЦР смеси. Перед внесением смеси реакционную зону микрочипа покрывали герметизирующей жидкостью в объеме 620 мкл.

Анализ проводили в микрочиповом амплификаторе АриаДНА при стандартном режиме термоциклирования: денатурация при 94 °С – 3 мин и отжиг/элонгации при 94 °С – 5 с, 60 °С – 30 с (45 циклов).

2.7 Статистические методы

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel. Для расчета доверительного интервала применяли угловое преобразование Фишера и критерий Вилсона. Статистически значимыми считали различия при доверительном интервале 95 % ($p < 0,05$).

В работе исследовали связь между маркерами вирулентности, которые были определены при помощи фенотипических и молекулярно-генетических методов, и вирулентностью штаммов *K. pneumoniae*, подтвержденной биологическим методом. Связь между вирулентностью исследуемого штамма и наличием признака оценивали с использованием двух статистических критериев: - рангово-бисериального коэффициента корреляции и точного теста Фишера (с последующим вычислением критерия Стьюдента). Связь считали достоверной при полученном критическом уровне значимости $p < 0,05$. Для рангово-бисериального коэффициента корреляции при данном объёме выборки значение критического уровня значимости $p < 0,05$ достигалось при критерии Стьюдента $t > 2,05$. Для расчёта рангово-бисериального коэффициента корреляции все исследуемые штаммы *K. pneumoniae* были проранжированы в соответствии с LD₅₀ в порядке возрастания вирулентности (т.е более высокий ранг присваивался более вирулентному изоляту). Таким образом, значение рангово-бисериального коэффициента корреляции зависело от степени вирулентности штамма. Для расчёта критерия Фишера все изоляты по результатам биопробы на мышах были разделены на две группы – авирулентные и вирулентные (в том числе и гипервирулентные).

Статистически значимые признаки (согласно значению рангово-бисериального коэффициента) были объединены в группы с целью оценки возможности применения в качестве диагностического теста для

прогнозирования вирулентности. Внутри каждой группы признаки вирулентности ранжировали в порядке убывания значения критического уровня значимости (признакам с большей статистической значимостью, присваивали более высокий ранг). Для каждого исследуемого штамма подсчитывали сумму рангов всех признаков, входящих в изучаемую комбинацию. Среднее арифметическое между минимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у вирулентных штаммов, и максимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у авирулентных штаммов, было принято за дискриминатное (разделяющее штаммы на авирулентные и вирулентные). Если при расчёте ранга выявлялись авирулентные изоляты, обладающие рангом, равным или превышающим наименее вирулентный штамм, то они не включались в расчёт дискриминантного значения. Это позволило получить дискриминантное значение, гарантирующее наибольшую чувствительность теста. Специфичность теста при этом снизилась, но при выявлении вирулентных штаммов более важным является показатель чувствительности.

Показатель чувствительности рассчитывали как долю изолятов, классифицированных как вирулентные на основании результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов от изолятов, определённых как вирулентные по результатам биопробы. Показатель специфичности рассчитывали как долю штаммов, классифицированных как авирулентные на основании результатов фенотипических и молекулярно-генетических методов от изолятов, определённых как авирулентные по результатам биопробы.

Сводная информация об объеме и методах, использованных в работе, представлена в таблице 7.

Таблица 7 – Объем проведенных исследований

Методы исследований	Количество штаммов
1. Бактериологические	

1.1. Определение фенотипа гипермукоидности	285
1.2 Чувствительность к 8 АМП диско-диффузионным методом	285
1.3 Чувствительность к колистину методом серийных разведений	285
2. Молекулярно-генетические	
2.1 Детекция генов вирулентности методом ПЦР	
-продукция сидерофора аэробактерина (<i>iucA, iutA</i>)	285
- продукция сидерофора сальмохелина (<i>iroB</i>)	285
-продукция сидерофора энтеробактерина (<i>entB</i>)	285

Продолжение таблицы 7

Методы исследований	Количество штаммов
2. Молекулярно-генетические	
-продукция сидерофора иерсиниабактина (<i>irp2</i>)	285
-регуляторы мукоидного фенотипа (<i>prmpA</i> , <i>prmpA2</i> и <i>crmpA</i>)	285
-предполагаемый транспортер (<i>peg-344</i>)	285
- резистентность к теллуриду (<i>terB</i>)	285
- карбоксимутуопланктон семейства декарбоксилаз (<i>peg-589</i>)	285
2.2 Полногеномное секвенирование	85
3. Биологические	
3.1 Внутрибрюшинное заражение модельных животных	30
4. Биоинформатические методы	
4.1 Детекция генов резистентности к АМП	85
4.2 Детекция генетических детерминант вирулентности	85
4.3 Определение К-типов	85
4.4 Определение ST-типов	85

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 3. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ
ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ
K. PNEUMONIAE

3.1 Оценка чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам

Определение чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к АМП продемонстрировало высокий уровень антибиотикорезистентности изучаемых изолятов. В ходе исследования оценили чувствительность 285 штаммов *K. pneumoniae* к 9 наиболее часто применяемым АМП. Чувствительность к АМП штаммов *K. pneumoniae* представлена на рисунке 7.

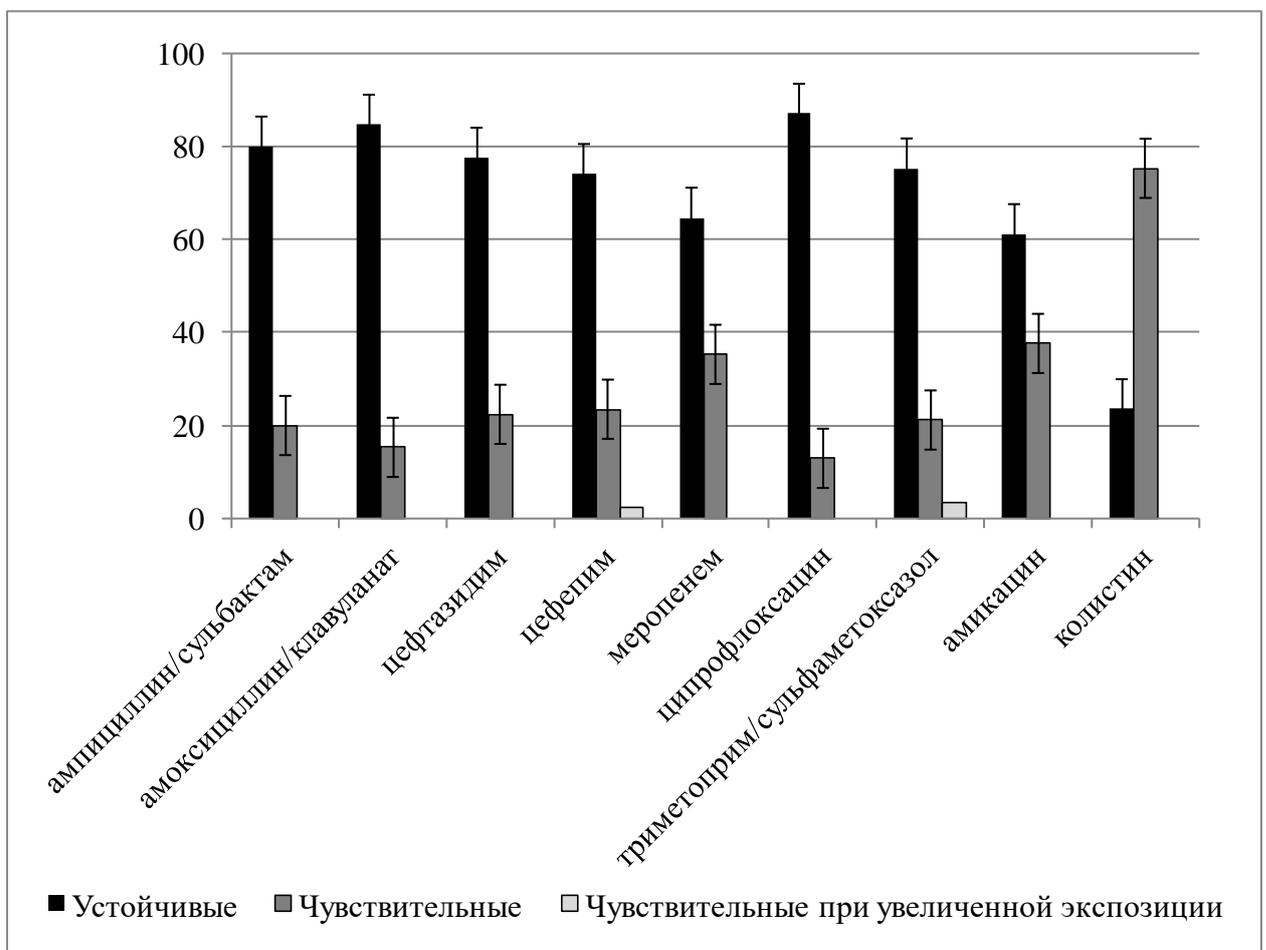


Рисунок 7 – Чувствительность к АМП штаммов *K. pneumoniae*

Исследуемые штаммы *K. pneumoniae* были устойчивы к ципрофлоксацину (87,1 %), амоксициллин/клавуланату (84,7 %),

ампициллин/сульбактаму (80,0 %), цефтазидиму (77,6 %), триметоприм/сульфаметоксазолу (75,3 %), цефепиму (74,1 %), меропенему (64,7 %), амикацину (61,2 %) и колистину (23,5 %). Устойчивость к карбапенемам проявляли 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов.

3.2 Генетические детерминанты резистентности исследованных штаммов *K. pneumoniae*

С использованием ПО Kleborate изучали частоту встречаемости генов БЛРС и карбапенемаз в изолятах *K. pneumoniae*. Результаты исследования представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Частота встречаемости генов БЛРС и карбапенемаз в изолятах *K. pneumoniae*

Ген	абс	%	95 % ДИ
Приобретенные β-лактамазы			
ОХА-1	15	17,6	10,3-26,4
ОХА-1; TEM-1D	15	17,6	10,3-26,4
TEM-1D	11	12,9	6,7-20,9
ОХА-9; TEM-1D	2	2,4	0,2-6,6
БЛРС			
СТХ-М-15	46	54,1	43,5-64,5
СТХ-М-3	1	1,2	0,0-4,6
СТХ-М-55	1	1,2	0,0-4,6
ADC-11 ¹ ; СТХ-М-15; PER-1 ²	1	1,2	0,0-4,6
Карбапенемазы			
NDM-1	15	17,6	10,3-26,4
NDM-1; ОХА-48	6	7,1	2,6-3,4
NDM-5	3	3,6	0,7-8,5
NDM-5; ОХА-48	1	1,2	0,0-4,6
ОХА-48	16	18,8	11,3-27,8
ОХА-66	1	1,2	0,0-4,6
ОХА-232	1	1,2	0,0-4,6
КРС-3	4	4,7	1,3-10,2
КРС-3; NDM-1	6	3,6	2,6-13,4
КРС-2; ОХА-48	1	1,2	0,0-4,6

Примечание: ¹ADC – *Acinetobacter* Derived Cephalosporinase, относятся к ферментам класса C, ² PER - *Pseudomonas* Extended Resistant

Наличие генов карбапенемаз выявлено в 60,2 % штаммов, а БЛРС – в 57,7 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз были гены ОХА-48 и NDM-1, которые были обнаружены в 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно. Среди генов БЛРС наиболее часто (54,1 %) встречался ген СТХ-М-15. Гены β -лактамаз TEM-1D и ОХА-1 были выявлены в 12,9 % и 17,6 % штаммов соответственно. 17,6 % штаммов характеризовались наличием двух генов: TEM-1D и ОХА-1.

По результатам полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae* генетические детерминанты резистентности к группе аминогликозидов были выявлены для 76 % изолятов, к группе фениколов – для 71,7 %, к триметоприму – для 70,7 % штаммов. У 68,3 % и 65,9 % штаммов были обнаружены гены резистентности к фторхинолонам и сульфаниламидам соответственно. В 36,5 % изолятов присутствовал ген резистентности к тетрациклину (*tetA*). Частота встречаемости генов резистентности для разных групп АМП представлена в таблице 9.

Таблица 9 - Частота встречаемости генов резистентности для различных групп АМП

Группа АМП	Гены резистентности, характерные для изолята	абс	%	95 % ДИ
Аминогликозиды	<i>aac(3)-IIa</i>	2	2,4	0,2-6,6
	<i>aac(3)-IIa, aph3-Ia, strB</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(3)-Ia, aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VIb</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, rmtF, strA, strB</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib, rmtF</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, aadA2, strA, strB</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIa, aac(6')-Ib-cr, strA, strB</i>	4	4,7	1,3-10,2
	<i>aac(3)-IIa, rmtF</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IId</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIId, aac(6')-Ib-cr</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(3)-IIId, aac(6')-Ib-cr, rmtC</i>	1	1,2	0,0-4,6

Продолжение таблицы 9

Группа АМП	Гены резистентности, характерные для изолята	абс	%	95 % ДИ
Аминогликозиды	<i>aac(3)-IIId, aph(3')-VI, armA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib, aadA, aph(3')-VI</i>	2	2,4	0,2-6,6
	<i>aac(6')-Ib, aph(3')-VI, rmtF</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib, aph(3')-VIa, rmtF</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib, rmtF</i>	7	8,2	3,4-14,9
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA</i>	2	2,4	0,2-6,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA, aph(3')-VI</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr.v2, aph(3')-VI</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA, aadA2, ant(2'')-Ia, aph(3')-VI, armA</i>	4	4,7	1,3-10,2
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA2, aph(3')-VI, armA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aadA2, rmtB</i>	4	4,7	1,3-10,2
	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VI, armA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VI, aph3-Ia</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VI, armA</i>	4	4,7	1,3-10,2
	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VIa</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Via, rmtF</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aadA, ant(2'')-Ia</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aadA2^</i>	2	2,4	0,2-6,6
	<i>aadA2, aph(3')-VI</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aadA2, aph(3')-VI, aph3-Ia, armA</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>aadA2, aph(3')-VI, armA</i>	5	5,8	1,9-11,8
<i>aph(3')-VI, armA</i>	1	1,2	0,0-4,6	
<i>aph(3')-Via</i>	1	1,2	0,0-4,6	
<i>strA, strB</i>	1	1,2	0,0-4,6	
Фторхинолоны	<i>qnrS1</i>	34	40,0	29,9-50,6
	<i>qnrE2</i>	2	2,4	0,2-6,6
	<i>qnrB1</i>	20	23,5	15,2-33,1
	<i>qnrB2, qnrS1</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>qnrB9</i>	1	1,2	0,0-4,6

Продолжение таблицы 9

Группа АМП	Гены резистентности, характерные для изолята	абс	%	95 % ДИ
Фениколы	<i>catB4</i>	9	10,6	4,9-17,9
	<i>catA1</i>	32	37,6	27,7-48,2
	<i>catB4, catA1</i>	20	23,5	15,2-33,1
Сульфаниламиды	<i>sul1</i>	31	36,5	26,6-46,9
	<i>sul2</i>	7	8,2	3,4-14,9
	<i>sul1, sul2</i>	18	21,2	13,2-30,5
Тетрациклины	<i>tetA</i>	31	36,5	26,6-46,9
Триметоприм	<i>dfrA5</i>	12	14,1	7,6-22,3
	<i>dfrA1</i>	14	16,5	9,4-25,1
	<i>dfrA14</i>	9	10,6	4,9-17,9
	<i>dfrA12</i>	11	12,9	6,7-20,9
	<i>dfrA7</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>dfrA5, dfrA1</i>	6	7,1	2,6-13,4
	<i>dfrA12, dfrA14</i>	1	1,2	0,0-4,6
	<i>dfrA12, dfrA5</i>	6	7,1	2,6-13,4

Все штаммы, обладающие генами резистентности к группе аминогликозидов (за исключением одного), были устойчивы к амикацину по результатам фенотипического исследования. Устойчивость изолятов *K. pneumoniae* к аминогликозидам может быть обусловлена также изменениями в проницаемости клеток вследствие изменений в системах эффлюксных насосов AcrAB-TolC и KpnEF и потери предполагаемого порина *KpnO* [61].

С использованием ПО Kleborate изучали частоту встречаемости хромосомных мутаций в изолятах *K. pneumoniae*, связанных с резистентностью к АМП. Исследовали мутации в генах ДНКгиразы (*gyrA*) и топоизомеразы IV (*parC*), детерминирующие резистентность к фторхинолонам, усечения и точечные мутации в генах *OmpK35* и *OmpK36*, которые приводят к устойчивости к β -лактамным антибиотикам, а также мутации в генах *MgrB* или *PmrB*, отвечающие за резистентность к колистину.

Частота встречаемости перечисленных мутаций в исследованных штаммах *K. pneumoniae* представлена в таблице 10.

Таблица 10 - Частота встречаемости мутаций в штаммах *K. pneumoniae*

Мутация	абс	%	95 % ДИ
Мутации в генах <i>OmpK35</i> и <i>OmpK36</i>			
<i>OmpK35</i> -17%; <i>OmpK36GD</i>	2	2,4	0,2-6,6
<i>OmpK35</i> -21%	2	2,4	0,2-6,6
<i>OmpK35</i> -21%; <i>OmpK36GD</i>	4	4,7	1,3-10,2
<i>OmpK35</i> -22%; <i>OmpK36GD</i>	8	9,4	4,2-16,5
<i>OmpK35</i> -25%; <i>OmpK36GD</i>	8	9,4	4,2-16,5
<i>OmpK35</i> -32%	2	2,4	0,2-6,6
<i>OmpK35</i> -71%; <i>OmpK36GD</i>	1	1,2	0,0-4,6
<i>OmpK35</i> -72%	18	21,2	13,2-30,5
<i>OmpK36GD</i>	5	5,8	1,9-11,8
Мутации устойчивости к колистину			
<i>MgrB</i> -40%	4	4,7	1,3-10,2
<i>PmrB</i> -13%	1	1,2	0,0-4,6
Мутации устойчивости к фторхинолонам			
<i>GyrA</i> -83F; <i>GyrA</i> -87A; <i>ParC</i> -80I	8	9,4	4,2-16,5
<i>GyrA</i> -83I; <i>GyrA</i> -87N; <i>ParC</i> -80I	5	5,8	1,9-11,8
<i>GyrA</i> -83I; <i>ParC</i> -80I	45	52,9	42,3-63,4
<i>GyrA</i> -83Y	2	2,4	0,2-6,6
<i>GyrA</i> -83Y; <i>GyrA</i> -87N; <i>ParC</i> -80I	2	2,4	0,2-6,6
<i>GyrA</i> -87N	1	1,2	0,0-4,6

Примечание: усечения в генах выражены как % длины аминокислоты от стартового кодона; *OmpK36GD* - вариант включает вставку Gly115-Asp116 (GD). *GyrA* 83 и 87 и *ParC* 80 и 84 – мутации в кодонах генов.

Мутации в гене *OmpK* связаны с резистентностью к карбапенемам [25], в нашем исследовании данные мутации наблюдались у 58,9 % штаммов (79,5% из них проявляли резистентность к меропенему).

С использованием программы Kleborate производили оценку индекса резистентности (resistance score) исследованных изолятов к АМП:

3 - наличие устойчивости к колистину и карбапенемаз (независимо от мутаций *OmpK* или наличия БЛРС);

2 - отсутствие устойчивости к колистину, наличие карбапенемаз, (независимо от мутаций *OmpK* или наличия БЛРС);

1 - отсутствие карбапенемаз, наличие БЛРС, (независимо от устойчивости к колистину);

0 – отсутствие карбапенемаз, отсутствие БЛРС, (независимо от устойчивости к колистину).

Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* индексом резистентности 0 обладали 18,7% изолятов, индексом 1 – 18,7 %, индексом 2 – 57,3 %, а индексом 3 - 5,3 %.

3.3 Заключение по главе 3

Результаты исследования изолятов *K. pneumoniae*, которые были выделены из проб биологического материала пациентов, госпитализированных в стационары Санкт-Петербурга, демонстрируют высокий уровень резистентности к разным классам АМП: 84,7 % проявляли множественную резистентность. Среди них устойчивость к карбапенемам демонстрировали 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. Исследуемые штаммы *K. pneumoniae* были устойчивы к ципрофлоксацину (87,1 %), амоксициллин/клавуланату (84,7 %), ампициллин/сульбактаму (80,0 %), цефтазидиму (77,6 %), триметоприм/сульфаметоксазолу (75,3 %), цефепиму (74,1 %) и амикацину (61,2 %). Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов.

Наличие генов карбапенемаз выявлено в 60,2 % штаммов, а БЛРС – в 57,7 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз были гены OXA-48 и NDM-1, которые были обнаружены в 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно. Среди генов БЛРС наиболее часто (54,1 %) встречался ген CTX-M-15. Гены β-лактамаз TEM-1D и OXA-1 были выявлены в 12,9 % и 17,6 % штаммов соответственно. 17,6 % штаммов характеризовались наличием двух генов: TEM-1D и OXA-1.

По результатам полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae* гены резистентности к группе аминогликозидов были

выявлены для 76,0 % изолятов, к группе фениколов - для 71,7 %, к триметоприму – для 70,7 % штаммов. У 68,3 % и 65,9 % штаммов были обнаружены гены резистентности к фторхинолонам и сульфаниламидам соответственно. В 36,5 % изолятов присутствовал ген резистентности к тетрациклину (*tetA*).

В результате работы были обнаружены хромосомные мутации в изолятах *K. pneumoniae*, связанные с резистентностью к АМП. Мутации в генах ДНКгиразы (*gyrA*) и топоизомеразы IV (*parC*), детерминирующие резистентность к фторхинолонам, встречались у 74,1 % изолятов. Усечения и точечные мутации в генах *OmpK35* и *OmpK36*, которые могут приводить к устойчивости к β -лактамным антибиотикам были обнаружены у 58,9 % штаммов. Мутации в генах *MgrB* или *PmrB*, отвечающие за резистентность к колистину, были выявлены у 5,9 % изолятов.

Таким образом, спектр АМП, эффективных в отношении изолятов *K. pneumoniae* сильно ограничен. По-прежнему важен мониторинг устойчивости штаммов клебсиелл к карбапенемам и другим классам АМП для сдерживания распространения карбапенемаз и β -лактамаз и сохранения активности АМП последнего резерва, а также разработки новых комбинированных антибиотиков с ингибиторами БЛРС и карбапенемаз.

ГЛАВА 4. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ ШТАММОВ *K. PNEUMONIAE*, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ

4.1 Характеристика гипермукоидных свойств бактериальных штаммов

Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* (n=285) по результатам теста на гипермукоидность было выявлено 67,1 % (95 % ДИ 56,7-76,6 %) штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % (95 % ДИ 23,5-43,3 %) штаммов с гипермукоидным фенотипом. Изоляты с гипермукоидным фенотипом были причиной следующих заболеваний: перитонита, флегмоны различной локализации, сепсиса, пневмонии.

4.2 Детекция генетических детерминант вирулентности

На первом этапе исследования проводили детекцию генетических детерминант вирулентности методом ПЦР. Характеристика штаммов *K. pneumoniae* по генетическим детерминантам вирулентности представлена на рисунке 8.



Рисунок 8 – Характеристика штаммов *K. pneumoniae* по генетическим детерминантам вирулентности

Анализ детекции генетических детерминант вирулентности показал, что 100 % (95 % ДИ 98,7-100,0 %) штаммов содержали ген *entB*, кодирующий синтез сидерофора энтеробактина. Гены *iucA* и *iutA*, кодирующие синтез сидерофора аэробактина и принадлежащие кластеру *iucABCiutA*, были выявлены у 30,6 % (95 % ДИ 21,3-40,7 %) и 78,8 % (95 % ДИ 69,7-86,9 %) штаммов соответственно. Гены, кодирующие синтез других сидерофоров, таких как сальмохелин (*iroB*) и иерсиниабактин (*irp2*), были обнаружены у 18,8 % (95 % ДИ 11,4-27,9 %) и 80 % (95 % ДИ 70,9-87,8 %) штаммов *K. pneumoniae* соответственно.

Праймер *uni-rmpA* нацелен на гомологичную область всех зарегистрированных вариантов генов *rmpA* (*prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*), регулирующих синтез мукоидного фенотипа. *Uni-rmpA*-позитивные штаммы (81,2 % (95 % ДИ 72,1-88,6 %)) были дополнительно генотипированы по генам *prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*. Гены *prmpA* и *prmpA2*, локализованные на плазмиде, были выявлены у 55,3 % (95 % ДИ 44,8-65,8 %) и 76,5 % (95 % ДИ 66,9-84,8 %) изолятов соответственно. Ген *crmpA*, локализованный на хромосоме, в исследуемых штаммах обнаружен не был (95 % ДИ 0,0-1,3 %).

Гены *tagA* и *wzu*, которые кодируют синтез полисахаридов капсулы, специфичных для капсульных типов К1 и К2 соответственно, были выявлены в 8,2 % (95 % ДИ 3,3-14,8 %) и 30,6 % (95 % ДИ 21,3-40,7 %) штаммов соответственно.

Ген предполагаемого транспортера (*peg-344*) был обнаружен в 65,9 % (95 % ДИ 55,6-75,6 %) изолятов, ген, предполагаемый карбоксимутопланктон семейства декарбоксилаз – *peg-589*, был выявлен в 76,5 % (95 % ДИ 66,9-84,8 %) изолятов, а ген, предположительно связанный с резистентностью к теллуриду – *terB*, присутствовал в 74,1 % (95 % ДИ 64,2-82,7 %) изолятов.

4.3 Определение капсульных типов (К-типов)

По результатам полногеномного секвенирования были идентифицированы капсульные типы. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* (n=85) к типу К1 принадлежало 8,2 % изолятов, а к типу К2 –

24,7 % штаммов. На долю других капсульных типов гипервирулентных штаммов приходилось: K20 – 2,4 %, K57 – 10,6 %, K64 – 2,4%. Остальные штаммы *K. pneumoniae* относились к капсульным типам, которые ассоциируют с сКр (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62). В ходе работы также были выявлены типы KL102, KL107, KL112, для которых соответствующие серологические типы капсул еще предстоит определить.

4.4 Определение сиквенс-типов (ST-типов)

По результатам MLST-типирования для 85 изученных штаммов было обнаружено 18 разнообразных ST-типов, причем для одного штамма сиквенс-тип определить не удалось (NA). В результате исследования были идентифицированы ST-типы, характерные для hvКр: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86 (5,9 %, включая ST86-1LV, в котором один локус не соответствовал типу ST86), ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %). Остальные штаммы *K. pneumoniae* относились к ST-типам, которые ассоциируют с сКр.

Клинические изоляты *K. pneumoniae* с капсульным типом K1 (n=7) принадлежали к ST23. Штаммы капсульного типа K2 принадлежали к следующим типам: ST395 (n=14), ST86 (n=4, включая ST86-1LV), и ST11, ST65 и ST380 (по 1 штамму). Два изолята с типом K20 относились к ST147, два штамма типа K64 принадлежали к ST395, и девять изолятов типа K57 - к ST23.

Исследованные изоляты *K. pneumoniae* капсульного типа K1, принадлежащие ST23 (8,2 %), проявляли положительный фенотипический тест на гипермукоидность, а штаммы капсульного типа K57, принадлежащие ST23 (10,6 %), проявляли отрицательный стринг-тест. Исследованные штаммы капсульных типов K3, K4, K14, K19, K23, K39, K45, K57, K62, демонстрировали отрицательный стринг-тест.

Связь молекулярной характеристики штаммов *K. pneumoniae* с фенотипом гипермукоидности представлена в таблице 11.

Таблица 11 - Связь молекулярной характеристики штаммов *K. pneumoniae* с фенотипом гипермукоидности

Капсульный тип	ST-тип	Положительный стринг-тест			Отрицательный стринг-тест		
		абс	%	95 % ДИ	абс	%	95 % ДИ
K1	ST23	7	8,2	3,4-14,9	0	0	0,0-4,3
K2	ST395	7	8,2	3,4-14,9	7	8,2	3,4-14,9
	ST86	2	2,3	0,2-6,6	1	1,2	0,0-4,6
	ST86-1LV	1	1,2	0,0-4,6	0	0	0,0-4,3
	ST11	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
	ST65	1	1,2	0,0-4,6	0	0	0,0-4,3
	ST380	1	1,2	0,0-4,6	0	0	0,0-4,3
K3	ST13	0	0	0,0-4,3	3	3,5	0,7-8,5
K4	ST37	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
K14	ST37	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
K19	ST15	0	0	0,0-4,3	3	3,5	0,7-8,5
	ST2237	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
K20	ST147	1	1,2	0,0-4,6	1	1,2	0,0-4,6
K23	ST39	0	0	0,0-4,3	6	7,0	2,6-13,4
K24	ST15	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
	ST20	1	1,2	0,0-4,6	0	0	0,0-4,3
	ST86	1	1,2	0,0-4,6	0	0	0,0-4,3
	ST359	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
K39	ST395	0	0	0,0-4,3	6	7,0	2,6-13,4
K45	ST874	0	0	0,0-4,3	2	2,4	0,2-6,6
K57	ST23	0	0	0,0-4,3	9	10,6	4,9-17,9
K62	ST39	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
	ST556	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
K64	ST395	1	1,2	0,0-4,6	1	1,2	0,0-4,6
Другие типы: KL102, KL107	ST307	0	0	0,0-4,3	6	7,0	2,6-13,4
	ST512	2	2,3	0,2-6,6	6	7,0	2,6-13,4
	ST15	0	0	0,0-4,3	1	1,2	0,0-4,6
Всего 85		25	29,4	20,3-39,5	60	70,6	60,5-79,7

4.5 Локусы вирулентности

На основании наличия генов, кодирующих синтез сидерофоров аэробактина (*iuc*), иерсиниабактина (*ybt*) и токсина колибактина (*clb*) производили оценку индекса вирулентности (virulence score) исследуемых штаммов. В соответствии с программой Kleborate [95] индекс вирулентности варьируется от 0 до 5:

0 – отсутствие вышеперечисленных детерминант вирулентности;

1 – наличие генов, кодирующих синтез сидерофора иерсиниабактина;

2 – наличие генов, кодирующих синтез токсина колибактина и сидерофора иерсиниабактина (или только колибактина);

3 – наличие генов, кодирующих синтез сидерофора аэробактина (при отсутствии генов, кодирующих синтез токсина колибактина или сидерофора иерсиниабактина);

4 – наличие генов, кодирующих синтез сидерофоров аэробактина и иерсиниабактина (при отсутствии генов, кодирующих синтез токсина колибактина);

5 – наличие генов, кодирующих синтез всех перечисленных детерминант вирулентности.

Среди 85 исследованных штаммов *K. pneumoniae* индексом вирулентности равным 5 обладали 10,7 % штаммов, индексом 4 – 37,3 %, индексом 3 – 25,3 % штаммов, индексом 2 – 0 %, индексом 1 – 21,3 %, индексом 0 – 5,3 %.

По результатам полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae* была определена частота встречаемости сидерофоров, токсина колибактина, типы линий генов регуляторов мукоидного фенотипа (*rmp*), мобильные генетические элементы и укорочения в генах *rmpA2*. Частота встречаемости вышеперечисленных факторов вирулентности представлена в таблице 12.

Таблица 12 - Частота встречаемости факторов вирулентности по результатам полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae*

Фактор вирулентности	Тип последовательности	абс	%	95 % ДИ
Сидерофор иерсиниабактин	<i>Ybt 1</i> (ICEKp10) <i>ybt 10</i> (ICEKp4) <i>ybt 12</i> (ICEKp4) <i>ybt 14</i> (ICEKp5) <i>ybt 15</i> (ICEKp11) <i>ybt 16</i> (ICEKp12) <i>ybt 17</i> (ICEKp10) <i>ybt 4</i> (plasmid) <i>ybt 5</i> (ICEKp6) <i>ybt 9</i> (ICEKp3)	58	68,2	58,0-77,7
Сидерофор аэробактин	<i>iuc1, iuc2</i>	62	72,9	63,1-81,8
Сидерофор сальмохелин	<i>iro1, iro2</i>	12	14,1	7,6-22,3
Токсин колибактин	<i>clb1, clb2, clb3</i>	9	10,6	4,9-17,9
Регулятор мукоидного фенотипа	<i>rmp1, rmp2</i>	43	50,6	40,0-61,1
Укорочения в генах <i>rmpA2</i>	<i>rmpA2_3</i> -47%	1	1,2	0,0-4,6
	<i>rmpA2_5</i> -54%	6	7,1	2,6-13,4
	<i>rmpA2_6*</i> -47%	16	18,8	11,3-27,8
	<i>rmpA2_6*</i> -49%	1	1,2	0,0-4,6
	<i>rmpA2_6*</i> -55%	2	2,4	0,2-6,6
	<i>rmpA2_6</i> -60%	7	8,2	3,4-14,9
	<i>rmpA2_8*</i> -60%	9	10,6	4,9-17,9
	<i>rmpA2_9</i>	5	5,9	1,9-11,8
	<i>rmpA2_9*</i> -48%	1	1,2	0,0-4,6
<i>rmpA2_9*</i> -55%	2	2,4	0,2-6,6	

Хорошо охарактеризованные детерминанты вирулентности у *K. pneumoniae* включают локусы синтеза поликетидов *ybt* и *clb* (также известные как *pks*), кодирующие сидерофор иерсиниабактин и токсин колибактин соответственно. Эти локусы расположены на мобильном генетическом элементе ICEKp, который является наиболее распространенным генетическим элементом, связанным с вирулентностью

K. pneumoniae. В нашем исследовании локус *clb* был выявлен у 10,6 % изолятов, а *ybt* присутствовал в 68,2 % штаммов и был ассоциирован с одной плазмидой и 7 разнообразными интегративными мобильными элементами ICEKp. Наиболее распространенными мобильными элементами были ICEKp4 (n=10) и ICEKp10 (n=8). Мобильный элемент ICEKp10 вероятно связан с гипервирулентностью изолятов, поскольку несет локус токсина колибактина (*clb*). Следовательно, мобильные генетические элементы, несущие *clb* и *ybt*, свободно циркулируют в популяции *K. pneumoniae*, в том числе среди множественно-устойчивых (MDR) штаммов.

В ходе исследования были идентифицированы локусы *iro* (14,1 %) и *iuc* (72,9 %), ассоциированные с плазмидой. Наиболее распространенным локусом *iuc* был *iuc1* (n=61). Этот локус обычно ассоциирован с плазмидой вирулентности KpVP-1 (pK2044 и pLVPK-подобные плазмиды). Локус *iuc1* присутствовал совместно с локусом *iro1* в 13,3 % штаммов. Линия *iuc2* была обнаружена в одном штамме (ST380, K2). Она ассоциирована с плазмидой KpVP-2 (Kp52.145pII-подобный).

Регулятор мукоидного фенотипа *rmp* связан с гипермукоидностью штаммов *K. pneumoniae* и считается одним из признаков вирулентности hvKp был обнаружен в 50,6 % штаммов.

В результате работы было обнаружено 44 случая (51,8 % штаммов) генотипической конвергенции антибиоткорезистентности и вирулентности, о чем свидетельствовало одновременное наличие генов карбапенемаз или БЛРС и локуса азробактина (*iuc*). Среди данных штаммов встречались как изоляты, относящиеся к гипервирулентным ST-типам (ST11, ST23, ST86), которые приобрели генетические детерминанты устойчивости к АМП, так и MDR штаммы с приобретенными плазмидами вирулентности. По результатам полногеномного секвенирования мы идентифицировали клинические изоляты (n=6), относящиеся к ST307, с приобретенным мобильным интегративным элементом ICEKp4. Данные изоляты обладали также генами β-лактамазы (CTX-M-15) и карбапенемаз (OXA-48, NDM-1).

4.6 Заключение по главе 4

Гипервирулентные изоляты часто характеризуются гипермукоидным фенотипом. Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* по результатам «стринг-теста» было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом. Положительный стринг-тест является прямым сигналом того, что выделенный изолят может являться hvKp.

По результатам полногеномного секвенирования были идентифицированы капсульные типы. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* (n=85) к типу K1 принадлежало 8,2 % изолятов, а к типу K2 – 24,7 % штаммов. На долю других капсульных типов гипервирулентных штаммов приходилось: K20 – 2,4 %, K57 – 10,6 %, K64 – 2,4 %. Остальные клинические изоляты относились к капсульным типам, которые ассоциируют с cKp (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62).

По результатам MLST-типирования для 85 изученных штаммов было обнаружено 18 разнообразных ST-типов. В результате исследования были идентифицированы ST-типы, характерные для hvKp: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86 (5,9 %), ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %). Остальные штаммы *K. pneumoniae* относились к ST-типам, которые ассоциируют с cKp.

В ходе работы была определена частота встречаемости факторов вирулентности *K. pneumoniae*. Локус токсина колибактина (*clb*) был выявлен у 10,6 % штаммов, а локус сидерофора иерсиниабактина (*ybt*) присутствовал в 68,2 % штаммов и был ассоциирован с одной плазмидой и 7 разнообразными интегративными мобильными элементами ICEKp.

Другие немаловажные кластеры генов вирулентности кодируют синтез сидерофоров сальмохелина (*iro*) и аэробактина (*iuc*), часто связаны с инвазивными заболеваниями и распространены среди штаммов hvKp, которые вызывают тяжелые внебольничные инфекции (пневмония и абсцесс печени). В исследуемых штаммах локусы *iro* и *iuc* были выявлены в 14,1 % и 72,9 % изолятов соответственно. Регулятор мукоидного фенотипа *rmp* связан

с гипермукоидностью штаммов *K. pneumoniae* и был обнаружен в 50,6 % штаммов.

В результате работы была обнаружена генотипическая конвергенция вирулентности и антибиоткорезистентности (51,8 % штаммов). Детерминанты вирулентности и детерминанты резистентности к АМП обычно локализуются на плазмидах, поэтому их конвергенция внутри отдельных изолятов не является неожиданной. Мозаичность плазмид создает риск конвергенции факторов вирулентности и антибиоткорезистентности в пределах одной плазмиды. Такие гипервирулентные и антибиоткорезистентные векторы могут распространяться среди клинических изолятов и придавать им способность вызывать трудно поддающиеся лечению инфекции.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* НА БИОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

5.1 Оценка вирулентности бактерий на модели инфекции, обусловленной штаммами *K. pneumoniae*, у белых мышей

На первом этапе работы самок белых аутбредных мышей инфицировали дозой 1×10^6 КОЕ/мл. В случае гибели животных в течение периода наблюдения исследуемые изоляты считали вирулентными для мышей и определяли полуметальную дозу LD₅₀ на следующем этапе исследования. Культура, использованная в группе выживших животных, оценивалась как авирулентная.

Из паренхиматозных органов и крови всех погибших животных была выделена культура *K. pneumoniae* в концентрации 10^6 - 10^7 КОЕ/мл. Для дополнительного подтверждения причины летального исхода было проведено патоморфологическое исследование: из фрагментов селезенки и печени были приготовлены гистологические срезы от животных из контрольной и опытной групп.

У мышей из опытной группы обнаруживались патологические изменения селезенки в виде миелоидной инфильтрации незрелыми миелоидными клеточными элементами красной пульпы, обильных фибриново-лейкоцитарных наложений на поверхности капсулы селезенки и выраженного полнокрывия, а также в виде неравномерного лимфоидного опустошения с сохранением немногочисленных мелких лимфоидных фолликулов без герминативных центров (рисунок 9, Б5). Нормальное строение селезенки у животных из контрольной группы было сохранено (рисунок 9, А3).

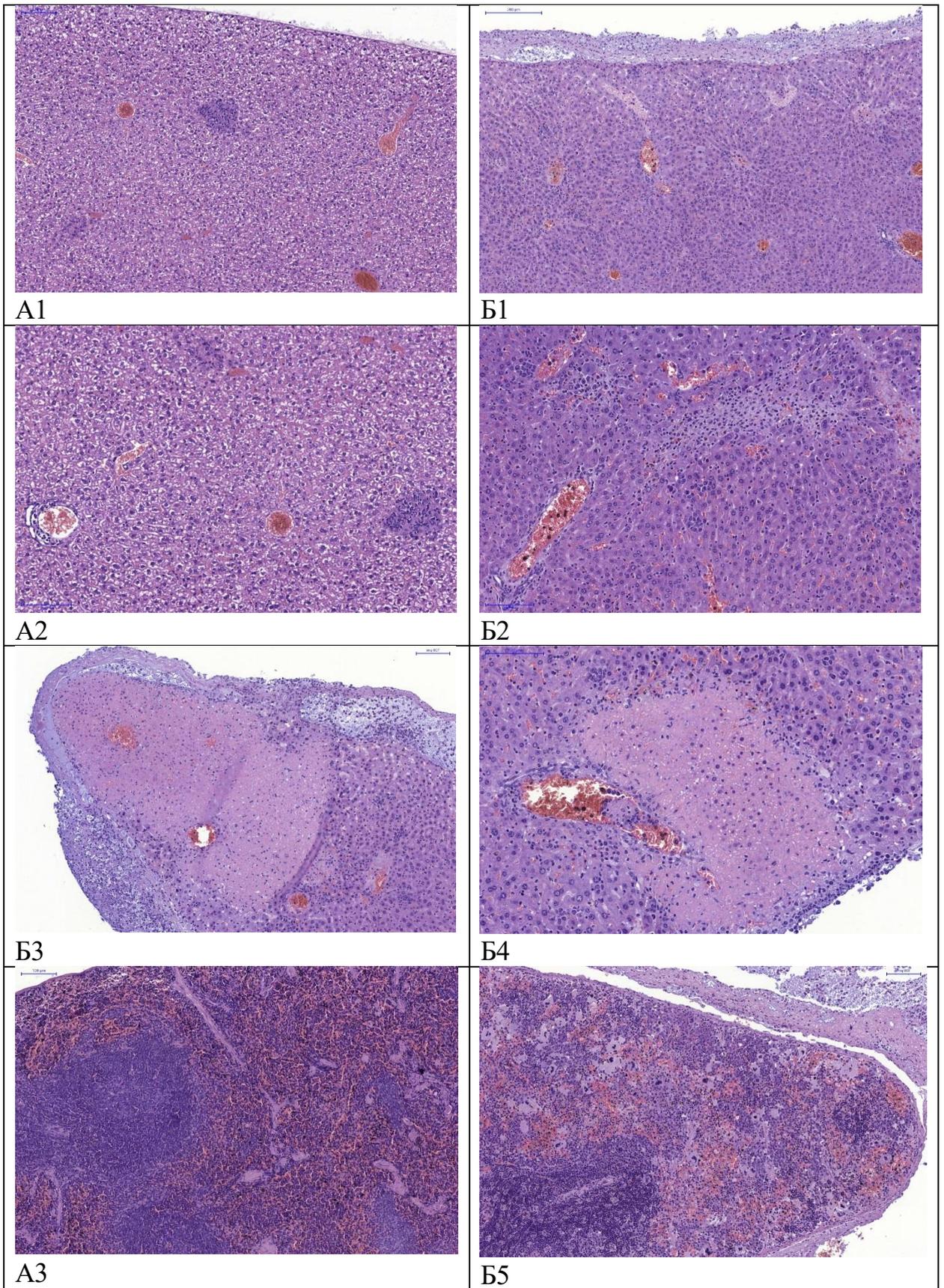


Рисунок 9 - Патологические изменения печени и селезенки у животного из контрольной (А) и опытной (Б) групп.

Окрашивание гематоксилином и эозином, длина масштабного отрезка А1, А2, А3, Б2, Б3, Б4, Б5 – 100 μm , Б1 - 200 μm

У животных из опытной группы на поверхности печени имелись обильные скопления фибрина, инфильтрированного полиморфноядерными лейкоцитами, среди которых были расположены скопления микробной флоры (рисунок 9, Б1, Б3). В субкапсулярных отделах перенхимы печени располагались крупные фокусы некроза со скудной перифокальной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами (рисунок 9, Б3, Б4), а также очаговая лимфо-гистиоцитарная инфильтрация с примесью полиморфноядерных гепатоцитов, расположенная среди групп погибших гепатоцитов, и скопления незрелых миелоидных клеточных элементов в синусоидах (рисунок 9, Б2). У животных из контрольной группы патологических изменений на поверхности капсулы печени не было, имелись распространенная белковая дистрофия гепатоцитов и мелкие гистиоцитарные гранулемы в паренхиме печени (рисунок 9, А1, А2).

Таким образом, у погибших животных из опытной группы было обнаружено наличие крупноочаговых некрозов печени, очагового паренхиматозного гепатита и фибринозно-гнойного перигепатита, а также реактивных изменений селезенки в виде миелоидной инфильтрации красной пульпы и лимфоидного опустошения и фибринозно-гнойного периспленита. У животных из контрольной группы были установлены очаговый гранулематозный гепатит и белковая дистрофия гепатоцитов.

Для определения LD_{50} исследованных изолятов отобрали штаммы, вызывающие гибель лабораторных животных в количестве 1×10^6 КОЕ. На втором этапе работы самкам белых мышей вводили по 0,1 мл бактериальной 1×10^2 и 1×10^4 КОЕ. За лабораторными животными наблюдали в течение 2 недель после инфицирования. Из паренхиматозных органов и крови всех погибших животных была выделена культура *K. pneumoniae*, что подтверждает смерть животного от исследуемого штамма.

Результаты определения значений LD_{50} и характеристика исследованных штаммов представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Результаты определения значений LD₅₀ и характеристика исследованных штаммов

Штамм	К-тип	ST-тип	Стринг-тест, мм	LD ₅₀
172	K1	ST23	15	0,22x10 ³
64	K1	ST23	40	0,46 x10 ⁴
844	K1	ST23	40	0,22x10 ⁵
894	K1	ST23	100	0,22x10 ³
880	K1	ST23	20	1 x10 ³
184	K1	ST23	120	0,46x10 ⁴
138	K2	ST380	50	-
1	K2	ST65	17	0,46x10 ²
2399	K2	ST395	0	1 x10 ⁵
480	K2	ST86	0	1 x10 ¹
933	K2	ST395	30	0,46x10 ²
396	K2	ST395	10	1 x10 ¹
847	K57	ST23	0	-
956	K57	ST23	0	-
958	K57	ST23	0	-
2943	K57	ST23	0	-
2946	K57	ST23	0	-
2947	K57	ST23	0	-
537	K2	ST86	10	0,46x10 ⁴
67	K2	ST86-1LV	55	0,46x10 ²
766	K2	ST86	15	1 x10 ³
830	K2	ST86	55	1 x10 ¹
962	K24	ST20	50	-
60	K45	ST874	0	-
336	KL107	ST512	10	-
988	KL107	ST512	20	-
913	K2	ST395	50	1 x10 ⁵
778	K24	ST11	0	-
146	K2	ST395	20	-
506	K62	ST556	0	-

Примечание: «-» - штамм в максимальной дозе (1×10⁶ КОЕ) не вызывал гибель животных.

Клинические изоляты *K. pneumoniae* по результатам эксперимента были разделены на три группы: авирулентные штаммы (LD₅₀ ≥ 10⁶ КОЕ), вирулентные штаммы (LD₅₀ от 10³ до 10⁵ КОЕ) и гипервирулентные штаммы (LD₅₀ ≤ 10² КОЕ).

Гипервирулентные изоляты *K. pneumoniae* (n=6) (по результатам биологической пробы на мышах) с капсульным типом K2 принадлежали к сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выделены от пациентов с флегмоной рубца, панкреатитом, некротической раной культи ($LD_{50} 1 \times 10^1$ КОЕ), а также синовитом коленного сустава и флегмоной поясничной области ($LD_{50} 1 \times 10^2$ КОЕ). Во всех hvKp изолятах присутствовали гены *rtxA*, *rtxA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора аэробактина (*iuc1*), и гены *peg-344* и *wzyK2*. Один штамм проявлял классический фенотип (отрицательный стринг-тест).

Вирулентные изоляты *K. pneumoniae* (n=10) (по результатам биологической пробы на мышах) с капсульными типами K1 и K2 принадлежали к типам ST23, ST86, ST395 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: флегмоны различной локализации, синовит коленного сустава, пневмония, перитонит, сепсис, ИБС. Для одного изолята был выявлен отрицательный результат стринг-теста.

Авирулентные изоляты *K. pneumoniae* (n=13) (по результатам биологической пробы на мышах) с капсульными типами K2, K24, K45, K57, K62, KL107 принадлежали к ST20, ST23, ST512, ST874 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: атеросклероз, сепсис, флегмона левой голени, трофическая язва стопы, гангрена левого легкого.

Сиквенс-тип ST395 *K. pneumoniae* не считается клоном высокого риска [181], однако, по результатам нашего исследования два штамма ST395/K2 были отнесены к гипервирулентным, два - к вирулентным и один был авирулентным. Авирулентность можно объяснить отсутствием в геноме исследуемого изолята локусов синтеза сидерофоров иерсиниабаткина (*ybt16*) и аэробактина (*iucA*). Следовательно, изоляты ST395 *K. pneumoniae* могут быть гипервирулентными.

По результатам нашей работы все изоляты ST23/K1 были вирулентными (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ), а штаммы ST23/K57 (n = 6) были авирулентными. Следовательно, информации об ST-типе штамма

недостаточно для прогнозирования его вирулентности на биологической модели, важно учитывать капсульный тип исследуемого штамма.

Штамм ST11/K24 *K. pneumoniae*, сиквенс-тип которого обычно относят к hvKp [176], по результатам нашего исследования не вызывал гибель модельных животных, а значит, являлся авирулентным.

По результатам исследования у всех гипервирулентных изолятов присутствовали гены *trpA* и *trpA2*, *wzyK2* и *peg-344*, а также locus сидерофора аэробактина (*iuc1*). Но большая часть из этих признаков встречалась также и у авирулентных штаммов (по результатам биопробы): *peg-344* - у 85,7 % (95 % ДИ 60,1-95,9 %), *iuc1* - у 71,4 % (95 % ДИ 45,4-8,3 %) штаммов, *trpA* и *trpA2* - у 78,5 % (95 % ДИ 52,4-92,4 %) и 92,9 % (95 % ДИ 68,5-98,7 %) штаммов соответственно. Таким образом, только ген *wzyK2* достоверно связан с вирулентностью ($p=0,0084$).

Для 87,5 % (95 % ДИ 63,9-96,5 %) изолятов *K. pneumoniae*, относящихся к гипервирулентным, и для 35,7 % (95 % ДИ 16,3-61,2 %) авирулентных изолятов был характерен гипермукоидный фенотип. Таким образом, не следует определять hvKp, основываясь только на результатах фенотипического теста. Некоторые литературные источники предполагают, что присутствие капсульных типов K1 и K2, а не гиперкапсулы, отвечает за повышенную вирулентность изолятов *K. pneumoniae* [107]. Эти предположения согласуются с результатами нашего исследования: все гипервирулентные и вирулентные изоляты принадлежали к типам K1 или K2, но не все характеризовались положительным стринг-тестом и гиперкапсулой.

Уровень выживаемости мышей при внутрибрюшинном заражении штаммами *K. pneumoniae* в дозах 10^2 , 10^4 , 10^6 КОЕ представлен на рисунках 10-12.

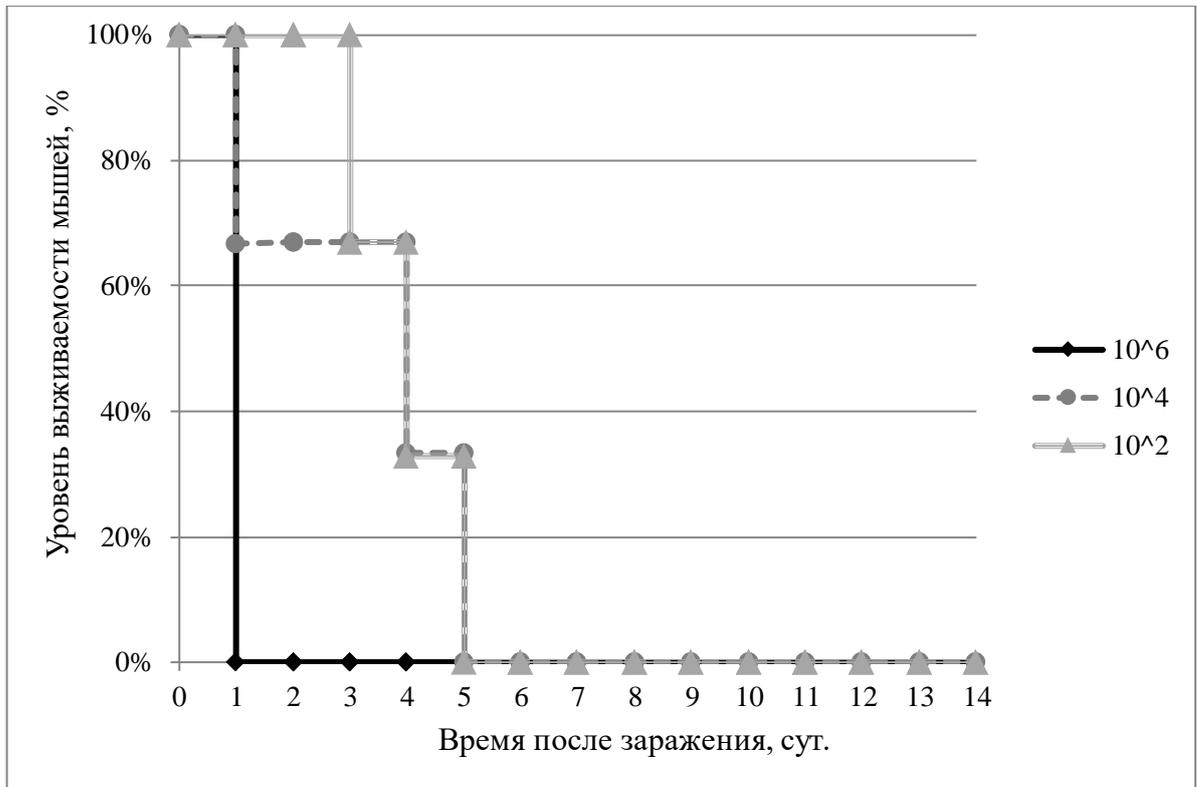


Рисунок 10 – Уровень выживаемости мышей, инфицированных штаммом 480
K. pneumoniae (LD₅₀ 1×10¹ КОЕ)

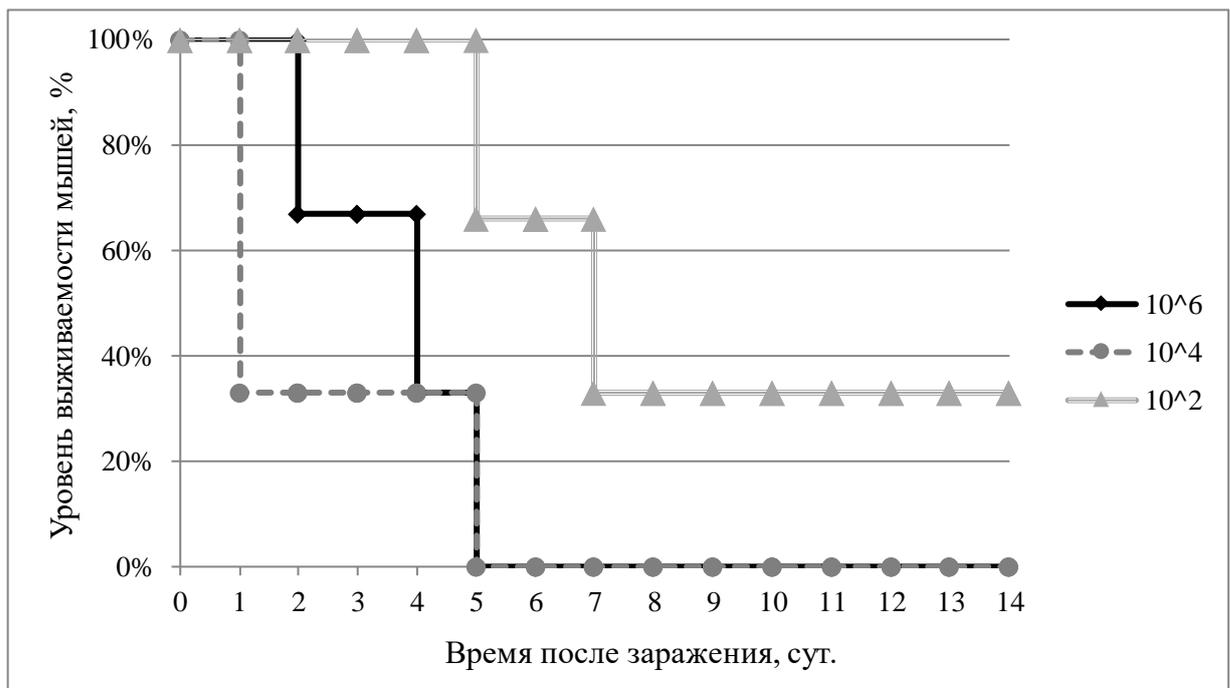


Рисунок 11 – Уровень выживаемости мышей, инфицированных штаммом 67
K. pneumoniae (LD₅₀ 1×10² КОЕ)

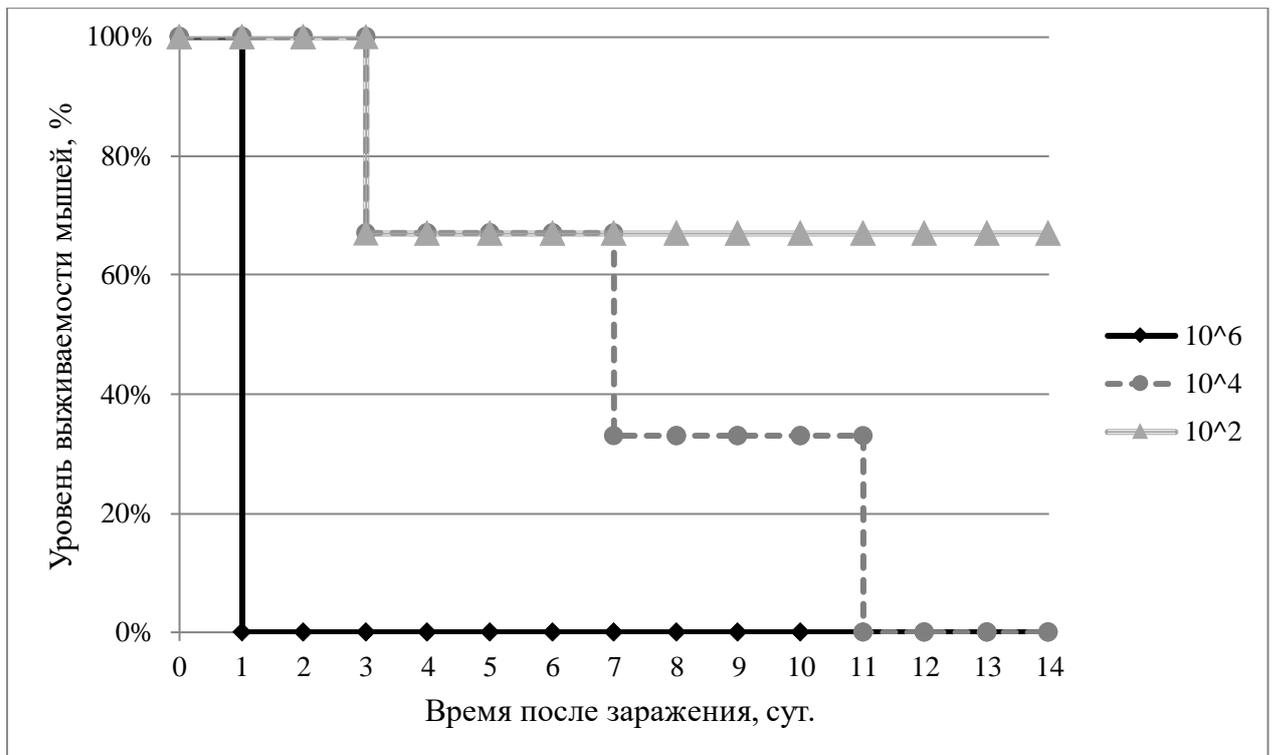


Рисунок 12 – Уровень выживаемости мышей, инфицированных штаммом 172 *K. pneumoniae* (LD₅₀ 1×10³ КОЕ)

По результатам статистического анализа на основании оценки рангово-бисериального коэффициента корреляции, достоверная положительная связь между наличием признака и степенью вирулентности штамма (значением летальной дозы LD₅₀) была выявлена для: генов *peg-344* (t = 3,685), *peg-589* (t = 3,893), *iucA* (t = 2,625), *iroB* (t = 3,224), *iutA* (t = 3,685), *terB* (t = 3,685), *rmpA* (t = 2,681), *rmpA2* (t = 3,500), плазмид ICEKp12 (t = 2,901), ICEKp35 (t = 13,500) и капсульных типов K1 (t = 2,281), K2 (t = 2,281).

Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей и степенью вирулентности штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности - *iro1* (t = 4,293), *iuc1* (t = 3,088), *clb2* (t = 2,281), *clb3* (t = 5,556), *ybt1* (t = 2,281), *ybt14* (t = 13,500), *ybt16* (t = 2,901), *ybt17* (t = 5,556).

По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера, положительная достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих генов: *iroB* (p=0,0002), *iucA* (p=0,0042) и капсульных типов: K1 (p=0,0134), K2

($p=0,0084$), K57 ($p=0,0050$). Для стринг-теста была выявлена положительная достоверная связь между наличием данного фенотипического признака ($p=0,0044$) и вирулентностью штамма. Специфичность стринг-теста для исследуемых изолятов составила 64,3 %, чувствительность - 87,5 %. Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей, определенных по результатам полногеномного секвенирования и вирулентностью штамма, была определена для типов последовательностей различных локусов вирулентности - *iro1* ($p=0,0002$), *clb2* ($p=0,0134$), *ybt1* ($p=0,0135$), и плазмид - ICEKp10 ($p=0,0273$) и ICEKp3 ($p=0,0050$).

Достоверной связи между наличием гена и вирулентностью штамма не было выявлено для следующих генов: *terB* ($p=0,2092$), *iutA* ($p=0,2092$), *peg-344* ($p=0,2092$), *peg-589* ($p=0,0896$), *rmpA* ($p=0,2125$), *rmpA2* ($p=0,4666$) и плазмид ICEKp12 ($p=0,0664$), ICEKp5 ($p=0,5333$). Достоверной связи между наличием типов последовательностей, определенных в результате полногеномного секвенирования, и вирулентностью штамма не было выявлено для следующих типов последовательностей локусов вирулентности: *iro2* ($p=0,4666$), *clb1* ($p=0,4666$), *clb3* ($p=0,5333$), *ybt12* ($p=0,4666$), *ybt14* ($p=0,5333$), *ybt16* ($p=0,0664$), *ybt17* ($p=0,5333$), *iuc1* ($p=0,1123$), *iuc2* ($p=0,4666$), *irp2* ($p=0,3112$).

Для прогнозирования вирулентности изолятов на основании молекулярно-генетических характеристик были рассмотрены серотипы K1 и K2. Специфичность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2, составила 85,7 %, а чувствительность – 100 %.

С целью более точного прогнозирования вирулентности изолятов на основании молекулярно-генетических характеристик, были рассмотрены типы последовательностей сидерофора иерсиниабактерина *ybt14*, *ybt16*, серотипы K1 и K2, ген, кодирующий синтез сидерофора сальмохелина *iroB*, и

локус сидерофора колибактина (*clb3*). Зависимость ранга изолята от степени его вирулентности показана на точечной диаграмме на рисунке 13.

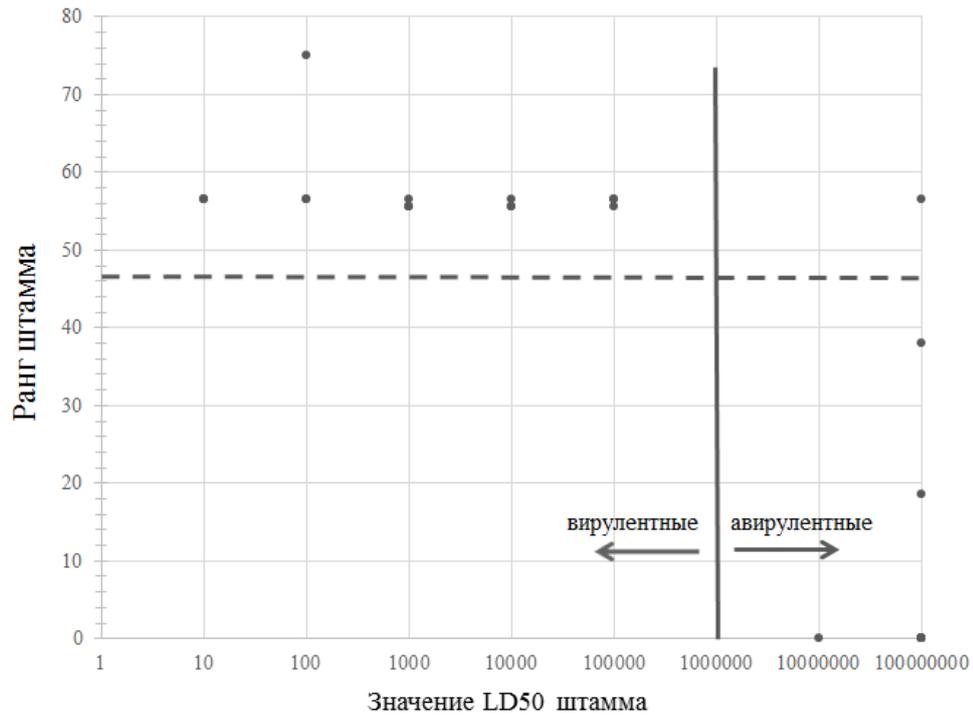


Рисунок 13 – Зависимость ранга штамма от степени вирулентности

На диаграмме точками обозначены штаммы: слева от сплошной линии вирулентные, справа - авирулентные ($LD_{50} > 1 \times 10^6$). Пунктирная линия на диаграмме обозначает дискриминантное значение (согласно значению рангово-бисериального коэффициента) и отделяет авирулентные изоляты (снизу) от вирулентных (сверху). Специфичность потенциального диагностического теста, основанного на вышеуказанных характеристиках, составила 92,8 %, а чувствительность - 100 %.

5.2 Заключение по главе 5

Для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* биологическим методом использовали экспериментальную инфекционную модель на белых аутбредных мышах. В ходе работы было выявлено три группы изолятов в зависимости от величины LD_{50} : авирулентные (отсутствие летальности при 10^6 КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ). Вирулентность исследуемой культуры была подтверждена

высевом соответствующего штамма из крови и паренхиматозных органов погибших животных.

Гипервирулентные изоляты *K. pneumoniae* (по результатам биологической пробы на мышах) характеризовались наличием генов *rmpA*, *rmpA2*, *wzyK2* и *peg-344*, а также локуса сидерофора аэробактина (*iuc1*). Но большая часть из этих признаков встречалась также и у авирулентных штаммов: *peg-344*, *iuc1*, *rmpA* и *rmpA2*. Следовательно, только ген *wzyK2* достоверно связан с вирулентностью. Для 87,5 % изолятов *K. pneumoniae*, относящихся к гипервирулентным, и для 35,7 % авирулентных изолятов был характерен гипермукоидный фенотип. Таким образом, не следует определять hνKp, основываясь только на результатах фенотипического теста.

По результатам статистической обработки полученных данных было обнаружено, что одиночные признаки обладают меньшей специфичностью и чувствительностью, чем совокупность признаков. Несмотря на то, что тест на гипермукоидный фенотип обладал достаточно высокой достоверностью ($p=0,0044$), специфичность и чувствительность данного теста относительно невысокая (64,3 % и 87,5 % соответственно). Наибольшая специфичность и чувствительность была выявлена для совокупности признаков серотипов K1 и K2, гена, кодирующего синтез сидерофора сальмохелина *iroB*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16* – 92,8 % и 100% соответственно. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении серотипов K1 и K2, составила 100%, а специфичность - 85,7 %.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕССНОГО СПОСОБА ОЦЕНКИ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *K. PNEUMONIAE*

6.1 Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки вирулентности

В качестве экспрессного способа оценки вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* были разработаны две диагностические микрочиповые панели на основе ПЦР-РВ. Разработку данных микрочиповых панелей осуществляли на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации «АриаДНА» («Люмэкс-Маркетинг», Россия).

«АриаДНА» - это микрочиповый амплификатор нуклеиновых кислот (НК) в режиме реального времени (регистрационное удостоверение ФСР 2011/12249 от 28.10.2013), который осуществляет проведение термоциклирования и детектирования продуктов ПЦР в режиме реального времени в микрореакторах чипа с использованием двухканального флуоресцентного детектора. Высокая скорость термоциклирования (продолжительность ПЦР из 40–50 циклов составляет 20–30 мин) обусловлена быстрым распределением температур между микрочипом и реакционной смесью, что обеспечивается малым объемом микрореактора и высокой теплопроводностью материала, из которого изготовлен микрочип. Программное обеспечение амплификатора контролирует все параметры, необходимые для проведения ПЦР, и анализирует считываемый сигнал от проб.

Преимущества микрочиповой технологии в ПЦР:

1. Сокращает время анализа и расход реагентов;
2. Высокие скорости нагрева и охлаждения.
3. Возможность снижения трудозатрат и ошибок оператора за счет лиофилизации реактивов в микрочипах.

Микрочипы с лиофилизированными реагентами позволяют избежать сложностей, связанных с хранением при низкой температуре, сокращают количество стадий пипетирования и тем самым снижают риск ложноположительных результатов, которые могут быть вызваны контаминацией проб.

Вирулентность клинических штаммов *K. pneumoniae* (n = 30) была оценена при помощи экспериментальной биологической модели. Молекулярно-генетические характеристики штаммов были изучены с использованием ПЦР и полногеномного секвенирования. Характеристика исследованных штаммов представлена в таблице 14.

По результатам статистической обработки данных молекулярно-генетического исследования изолятов *K. pneumoniae* было определено, что одиночные признаки обладают меньшей специфичностью и чувствительностью, чем совокупность признаков. На основании оценки рангово-бисериального коэффициента корреляции, достоверная положительная связь между наличием признака и степенью вирулентности штамма (значением полулетальной дозы LD₅₀) была выявлена для: генов *peg-344* (t = 3,685), *peg-589* (t = 3,893), *iucA* (t = 2,625), *terB* (t = 3,685), *iutA* (t = 3,685), *rmpA* (t = 2,681), *rmpA2* (t = 3,500), *iroB* (t = 3,224), и капсульных типов K1 (t = 2,281), K2 (t = 2,281). На основании точного теста Фишера, положительная достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для генов: *iroB* (p=0,0002), *iucA* (p=0,0042), и серотипов K1 (p=0,0134) и K2 (p=0,0084).

В статье Russo T.A. [146] было показано, что с высокой вирулентностью у мышей коррелируют наличие у штаммов *K. pneumoniae* генов *peg-344*, *iroB*, *iucA*, *rmpA*, и *rmpA2*, а также высокий уровень продукции сидерофоров (≥ 30 мкг/мл).

Продолжение таблицы 14

Штаммы	Стринг-тест, мм	LD ₅₀ , КОЕ	ST-тип	К-тип	Генетические детерминанты вирулентности									
					<i>iucA</i>	<i>iroB</i>	<i>irp2</i>	<i>entB</i>	<i>iutA</i>	<i>terB</i>	<i>peg-344</i>	<i>peg-589</i>	<i>prmpA</i>	<i>prmpA2</i>
2946	0	>10 ⁶	ST23	K57	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2947	0	>10 ⁶	ST23	K57	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
962	50	>10 ⁶	ST20	K24	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
60	0	>10 ⁶	ST874	K45	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
336	10	>10 ⁶	ST512	KL107	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
988	20	>10 ⁶	ST512	KL107	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
778	0	>10 ⁶	ST11	K24	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
146	20	>10 ⁶	ST395	K2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Примечание: «+» - ген присутствует; «-» - ген отсутствует; LD₅₀ - полужетальная доза, ST-тип – сиквенс-тип, К-тип – капсульный тип; *iucA*, *iutA* – гены, кодирующие синтез сидерофора аэробактерина, *iroB* – ген, кодирующий синтез сидерофора сальмохелина; *irp2* – ген, кодирующий синтез сидерофора иерсиниабактина; *entB* – ген, кодирующий синтез сидерофора энтеробактерина, *terB* – ген резистентности к теллуриту; *peg-344* - ген предполагаемого транспортера, *peg-589* - ген, предполагаемый карбоксимутуопланктон, семейства декарбоксилаз, *prmpA*, *prmpA2* – гены регуляторов мукоидного фенотипа (плазмидная локализация).

Таким образом, на основании статистической обработки данных молекулярно-генетического исследования штаммов *K. pneumoniae* и анализа литературных источников для разработки диагностической микрочиповой панели были выбраны следующие признаки вирулентности: капсульные типы K1 и K2, а также гены *iucA*, *iroB*, *rmpA* и *rmpA2* (в чипе использован праймер *uni-rmpA*, нацеленный на гомологичную область всех зарегистрированных вариантов генов *rmpA*: (*prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*)), *peg-344*. Гены вирулентности, их функции и праймеры указаны в таблице 5.

Топология разработанной 48-луночной микрочиповой панели для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* из клинического материала представлена в таблице 15.

Таблица 15 – Топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты вирулентности

<i>iucA</i>	K1	K2	<i>uni-rmpA</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	Klebs	ВКО
<i>iucA</i>	K1	K2	<i>uni-rmpA</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	Klebs	ВКО
<i>iucA</i>	K1	K2	<i>uni-rmpA</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	Klebs	ВКО
<i>iucA</i>	K1	K2	<i>uni-rmpA</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	Klebs	ВКО
<i>iucA</i>	K1	K2	<i>uni-rmpA</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	Klebs	ВКО
K - (<i>iucA</i> / <i>uni-rmpA</i>)	K- (K1/ K2)	K- (<i>peg-344</i> / <i>iroB</i>)	K- (Klebs, ВКО)	K+ (<i>iucA</i> / <i>uni-rmpA</i>)	K+ (K1/ K2)	K+ (<i>peg-344</i> / <i>iroB</i>)	K+ (Klebs, ВКО)

Примечание: К (+) – положительный контрольный образец; К (-) – отрицательный контрольный образец; ВКО – внутренний контрольный образец. Все контрольные образцы в нижнем ряду включают два канала детектирования FAM/ROX.

Поскольку постановка анализа на разработанной микрочиповой панели рассчитана на выделение культуры из клинического материала, в микрореакторах чипа предусмотрен видоспецифичный праймер на подтверждение принадлежности изолята к виду *K. pneumoniae* (на микрочиповой панели обозначен как «Klebs»).

6.2 Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности

Для лечения инфекций, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*, наиболее часто используют β -лактамы антибиотики (БЛА) и фторхинолоны. Основным механизмом резистентности штаммов *K. pneumoniae* к β -лактамам антибиотикам – это ферменты β -лактамазы. Анализ информации о функции β -лактамаз позволяет сделать следующий вывод: выявление в штаммах генов β -лактамаз без определения их принадлежности к конкретной подгруппе не имеет смысла для клинической практики [20, 79, 118]. В соответствии с этим для разработки микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности были выбраны гены β -лактамаз различных подгрупп: БЛРС - СТХ-M-UNI (в чипе использован универсальный праймер на все типы СТХ-M), гены карбапенемаз OXA-48 и KPC, а также металло- β -лактамазы NDM.

Устойчивость к фторхинолонам может быть опосредована генами плазмидной устойчивости к хинолонам, включая *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* [84, 127, 136]. Гены устойчивости кодируют белки семейства пентапептидных повторов, взаимодействующие с ферментами ДНК-гиразой и топоизомеразой IV, препятствуя ингибированию фторхинолонов [66]. Ген *qnrS* имеет 60 % аминокислотной идентичности с геном *qnrA* [139]. Для диагностической микрочиповой панели был выбран ген *qnrS*. Гены антибиотикорезистентности, их функции и праймеры указаны в таблице 6.

Топология разработанной 48-луночной микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* из чистой культуры представлена в таблице 16.

Таблица 16 – Топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты резистентности к АМП

NDM	NDM	NDM	NDM	NDM	NDM	NDM	ВКО
KPC	KPC	KPC	KPC	KPC	KPC	KPC	ВКО
OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48	ВКО
CTX-M-uni	CTX-M-uni	CTX-M-uni	CTX-M-uni	CTX-M-uni	CTX-M-uni	CTX-M-uni	ВКО
<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	<i>qnrS</i>	ВКО
К - (NDM / KPC)	К- (OXA -48)	К- (CTX- M-uni)	К- (<i>qnrS</i> , ВКО)	К (+) (NDM / KPC)	К+ (OXA -48)	К+ (CTX- M-uni)	К+ (<i>qnrS</i> , ВКО)

Примечание: К (+) – положительный контрольный образец; К (-) – отрицательный контрольный образец; ВКО – внутренний контрольный образец. Все контрольные образцы в нижнем ряду включают два канала детектирования FAM/ROX.

6.3 Проверка работоспособности диагностической микрочиповой панели

На первом этапе исследования проверяли работоспособность разработанной микрочиповой панели. Диагностическая панель для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* была апробирована на 85 клинических изолятах на алюминиевых микрочипах, содержащих 30 микрореакторов. Анализ проводили в микрочиповом амплификаторе «АриаДНА» при стандартном режиме термоциклирования.

Уровень совпадения результатов, полученных на разработанной микрочиповой панели и при помощи стандартной ПЦР, составил 96 % (82 из 85 образцов).

В коммерческом варианте диагностической микрочиповой панели в каждой ячейке будут лиофилизированы праймеры выбранных тест-систем (таблица 5), смесь дезокинуклеотидтрифосфатов, Таq-полимеразы. В ячейках

К (+) будет лиофилизирована соответствующая каждому искомому гену плазида (бактериальный вектор, в который вставлен участок ДНК, соответствующий ПЦР-продукту). В ячейках с ВКО тоже лиофилизирована плазида, но отличная от других, для контроля выделения. При постановке анализа пробу смешивают с буфером в нужном объеме и вносят в свои ячейки, включая ячейку с ВКО, согласно шаблону. В ячейки К (+) и К (-) вносится буфер и вода.

Апробация диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты резистентности будет проведена в ходе дальнейшей работы, совместно с «Люмэкс-Маркетинг».

6.4 Определение чувствительности тест-систем для выявления генетических детерминант вирулентности

Для определения чувствительности тест-систем для выявления генетических детерминант вирулентности использовали последовательные десятикратные разведения ДНК штаммов *K. pneumoniae*, начиная со 100 нг/мкл. Значимыми принимались значения порогового цикла не более 35.

Результаты определения чувствительности тест-систем для выявления генетических детерминант вирулентности представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Чувствительность тест-систем на выявление генов вирулентности

Тест-система	Чувствительность, пг/мкл ДНК
<i>uni-rmpA</i>	10
K1	10
K2	10
<i>peg344</i>	0,1
<i>iroB</i>	10
<i>iucA</i>	10
Видовая (klebs)	10

Примеры результатов определения чувствительности некоторых тест-систем на основе универсальной платформы для микрочиповой ПЦР-амплификации «АриаДНА» представлены на рисунках 14-16.

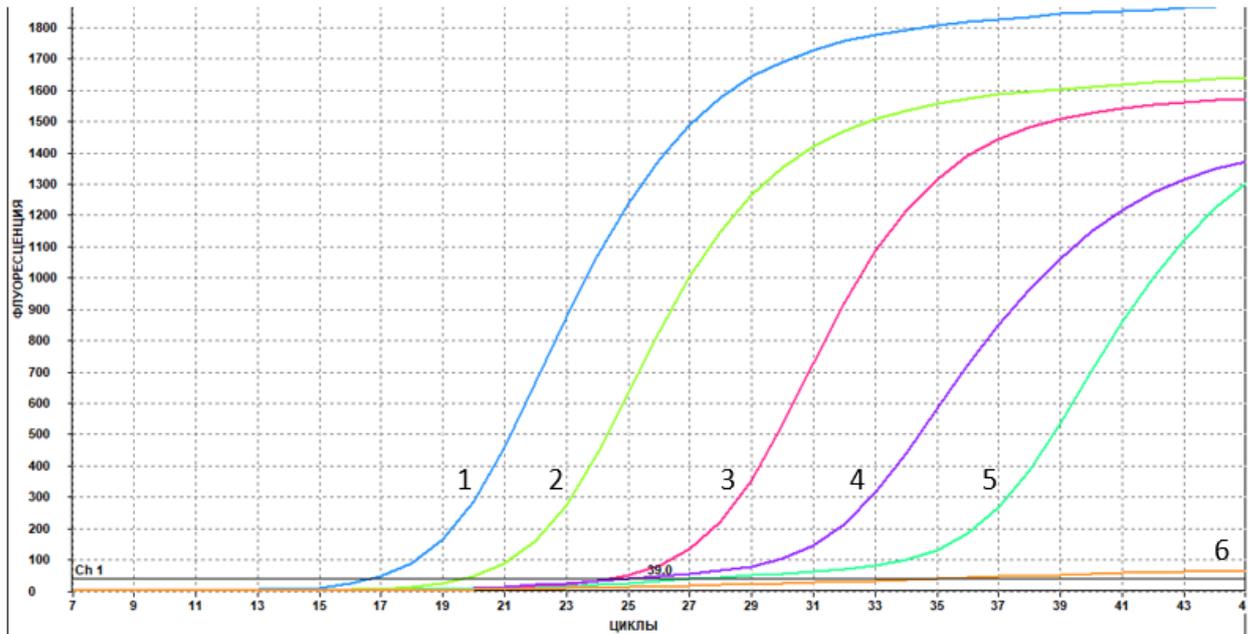


Рисунок 14 – Определение чувствительности тест-системы для обнаружения капсульного типа K1 (концентрация ДНК, нг/мкл: **1** — 10^5 ; **2** — 10^4 ; **3** — 10^3 ; **4** — 10^2 ; **5** — 10; **6** — 1)

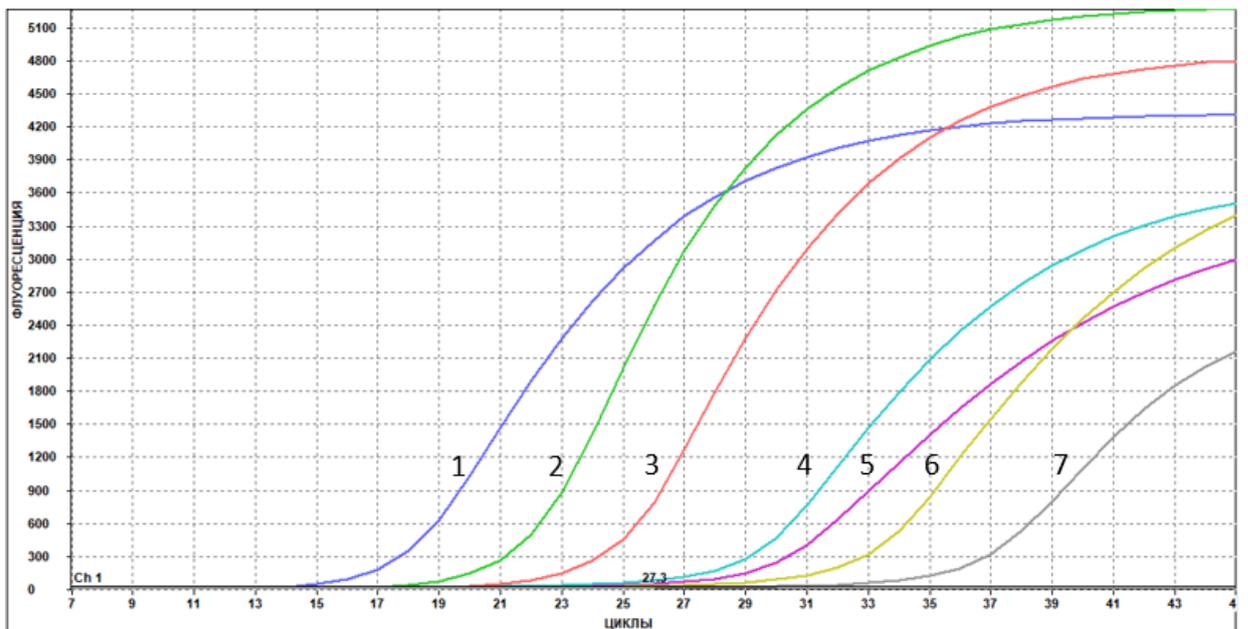


Рисунок 15 – Определение чувствительности тест-системы для обнаружения предполагаемого транспортера *reg344* (концентрация ДНК, нг/мкл: **1** — 10^5 ; **2** — 10^4 ; **3** — 10^3 ; **4** — 10^2 ; **5** — 10; **6** — 1; **7** — 10^{-1})

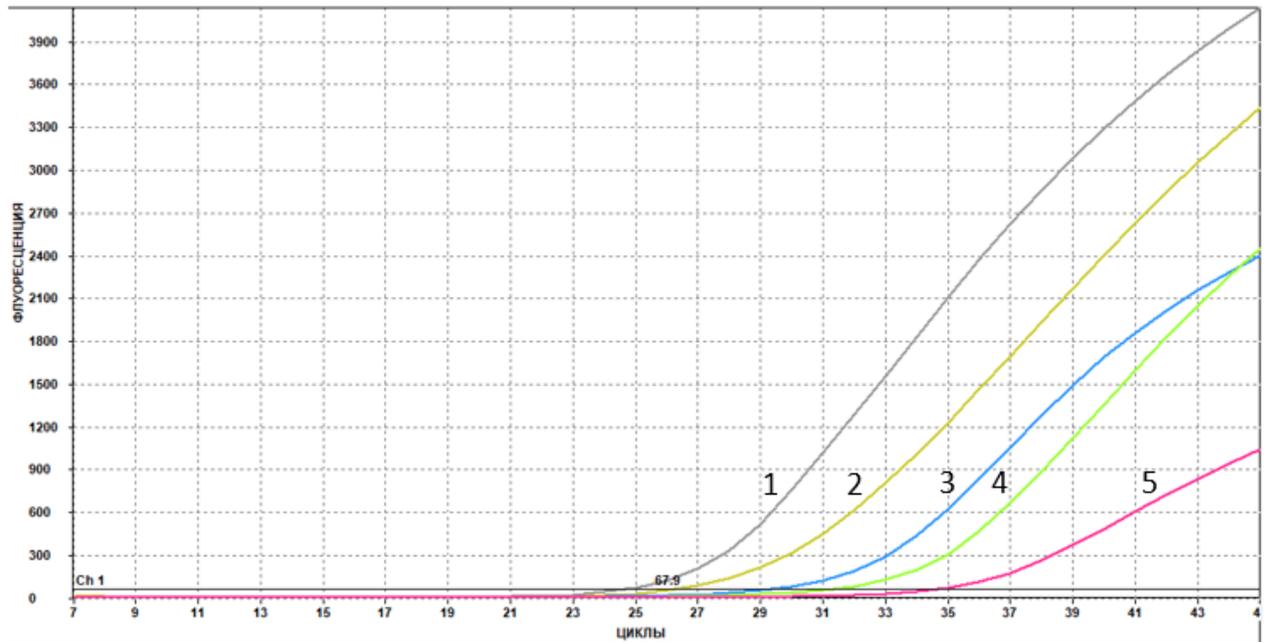


Рисунок 16 – Определение чувствительности тест-системы для обнаружения принадлежности изолята к виду *K. pneumoniae* (концентрация ДНК, нг/мкл: 1 — 10^5 ; 2 — 10^4 ; 3 — 10^3 ; 4 — 10^2 ; 5 — 10)

6.5 Интерпретация результатов определения генетических детерминант вирулентности на микрочиповой панели

Результат исследования считается достоверным, если ПЦР-сигналы регистрируются для внутренних и положительных контрольных образцов и не регистрируется для отрицательных контрольных образцов. Для интерпретации полученных результатов была разработана модель, реализованная с помощью программного пакета Microsoft Excel.

Модель представляет собой электронную таблицу, повторяющую топологию чипа (кроме последней строки и последнего столбца, где на чипе располагаются контрольные образцы). Пользователь вносит названия исследуемых штаммов и обнаруженные в данных штаммах гены (+/-). Согласно внесенной в столбец “score” формуле, рассчитывается значение условного коэффициента (рисунок 17).

№ п/п	Штамм	Признаки							Score	Результат
		<i>iucA</i>	<i>iroB</i>	K1	K2	<i>uni-rmp</i>	<i>peg-344</i>	Klebs		
1									0	-
2									0	-
3									0	-
4									0	-
5									0	-

Рисунок 17 – Модель для интерпретации полученных результатов в Microsoft Excel

При полученном значении условного коэффициента больше 30 штамм расценивается как вирулентный, что отражается в столбце «результат» символом «+». При полученном значении условного коэффициента меньше 30 штамм расценивается как авирулентный, что отражается в столбце «результат» символом «-».

На рисунке 18 приведен пример заполненной модели в Microsoft Excel для пяти штаммов с различным набором признаков вирулентности, по которым программа рассчитала значение условного коэффициента и отнесла штамм к вирулентным (первые три штамма в примере) или авирулентным (четвертый и пятый штаммы).

№ п/п	Штамм	Признаки							Score	Результат
		<i>iucA</i>	<i>iroB</i>	K1	K2	<i>uni-rmp</i>	<i>peg-344</i>	Klebs		
1	9520	+	+	+	-	+	+	+	94	+
2	2232	+	+	-	+	+	+	+	110	+
3	6145	+	-	-	+	+	-	+	42	+
4	1785	-	+	-	-	+	+	+	9	-
5	3633	-	-	-	-	-	-	-	0	-

Рисунок 18 – Пример заполненной модели для интерпретации результатов в Microsoft Excel

По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера (п. 5.1) каждому из выбранных признаков вирулентности присвоен ранг от 1 до 6. В разработанной математической модели условный

коэффициент рассчитывается на основании точного теста Фишера и присвоенного ранга гена. Признаки, которые вносят наибольший вклад в вирулентность штаммов, имеют наибольший ранг.

6.6 Заключение по главе 6

В результате исследования была разработана и апробирована диагностическая микрочиповая панель для выявления генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* и разработана топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты резистентности к АМП на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА». Данная платформа осуществляет быструю ПЦР-амплификацию и последующую детекцию продуктов реакции в режиме реального времени, а время анализа одного образца, включая пробоподготовку, составляет приблизительно 60–70 мин.

Разработанные диагностические микрочиповые панели позволяют провести комплексную экспресс-диагностику, отражающую наличие в клиническом образце или выделенном штамме *K. pneumoniae* генетических детерминант вирулентности или резистентности к АМП.

Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты вирулентности включает следующие признаки: капсульные типы K1 и K2, а также гены *iucA*, *iroB*, *rmpA* и *rmpA2* (в чипе использован праймер *uni-rmpA*, нацеленный на гомологичную область всех зарегистрированных вариантов генов *rmpA*: (*prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*)), *peg-344*. Данные признаки были выбраны по результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера и по результатам анализа литературных источников.

Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты антибиотикорезистентности включает гены β-лактамаз различных подгрупп: БЛРС - СТХ-M-UNI (в чипе использован универсальный праймер на все типы СТХ-M), гены карбапенемаз OXA-48 и KPC, а также металло-β-лактамазы NDM, а также ген, отвечающий за резистентность к фторхинолонам - *qnrS*. Данные гены были выбраны на основании

рекомендаций по лечению инфекций, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*, и литературных источников.

Для интерпретации результатов анализа проб ДНК с использованием диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты вирулентности была разработана модель, реализованная с помощью программного пакета Microsoft Excel. Модель представляет собой электронную таблицу, в которую пользователь вносит обнаруженные в штаммах признаки вирулентности. Согласно введенной в таблицу формуле, рассчитывается значение условного коэффициента, на основании которого исследуемый штамм расценивается как вирулентный или авирулентный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в медицинских учреждениях наблюдается тенденция увеличения частоты встречаемости гипервирулентных клинических изолятов *K. pneumoniae* [110]. Данная тенденция и вспышки инфекций, обусловленных данным микроорганизмом, зарегистрированные в России, Иране и Китае [51, 154, 163, 183], указывают на то, что карбапенемазопродуцирующие штаммы hvKp приобретают все большую распространенность.

Идентификация hvKp как инфекционного агента имеет большое значение. В случае, когда инфекция вызвана hvKp штаммами, необходимо проведение дополнительных исследований (магнитно-резонансная томография (МРТ) или компьютерная томография (КТ)) для выявления трудно диагностируемых очагов инфекции [129]. Выявление скрытых очагов инфекции крайне важно, поскольку режим дозирования АМП специфичен для каждого очага (менингита, абсцесса головного мозга, предстательной железы, эндофтальмита). Для достижения оптимального результата лечения необходимы адекватные концентрации АМП [111].

Гипермукоидный фенотип штаммов *K. pneumoniae* может представлять трудности при лечении абсцессов. Повышенная вязкость штаммов может создавать препятствия для чрескожного дренирования и повышать вероятность закупорки катетера [133, 145, 165, 185]. Инфекция, вызванная hvKp штаммами, может быть связана с рецидивами [39, 67, 74, 175], а значит может потребоваться более длительный курс лечения, для того чтобы максимизировать показатели излечения и минимизировать рецидивы. Таким образом, определение маркеров вирулентности может представлять важную информацию для клинического ведения пациентов с hvKp-инфекциями [23].

В результате проведенного исследования было изучено 285 штаммов *K. pneumoniae*, полученных из проб биологического материала от

госпитализированных пациентов города Санкт-Петербург. Изоляты были выделены из различных видов клинического материала – желчи, крови, содержимого абсцесса, мочи, отделяемого из брюшной полости, мокроты.

Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* 84,7 % проявляли множественную резистентность. Среди них устойчивость к карбапенемам демонстрировали 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. Исследуемые штаммы *K. pneumoniae* были устойчивы к ципрофлоксацину (87,1 %), амоксициллин/клавуланату (84,7 %), ампициллин/сульбактаму (80,0 %), цефтазидиму (77,6 %), триметоприм/сульфаметоксазолу (75,3 %), цефепиму (74,1 %) и амикацину (61,2 %). Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов.

По результатам полногеномного секвенирования штаммов *K. pneumoniae* гены резистентности к группе аминогликозидов были выявлены для 76,0 % изолятов, к группе фениколов - для 71,7 %, к триметоприму – для 70,7 % штаммов. У 68,3 % и 65,9 % штаммов были обнаружены гены резистентности к фторхинолонам и сульфаниламидам соответственно. У 36,5 % изолятов присутствовал ген резистентности к тетрациклину (*tetA*).

Наличие генов карбапенемаз выявлено в 60,2 % штаммов, а БЛРС – в 57,7 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз были гены OXA-48 и NDM-1, которые были обнаружены в 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно. Среди генов БЛРС наиболее часто (54,1 %) встречался ген CTX-M-15. Гены β -лактамаз TEM-1D и OXA-1 были выявлены в 12,9 % и 17,6 % штаммов соответственно. 17,6 % штаммов характеризовались наличием одновременно двух генов: TEM-1D и OXA-1.

В результате работы были обнаружены хромосомные мутации в изолятах *K. pneumoniae*, связанные с резистентностью к АМП. Мутации в генах ДНКгиразы (*gyrA*) и топоизомеразы IV (*parC*), детерминирующие резистентность к фторхинолонам, встречались в 74,1 % изолятов. Усечения и точечные мутации в генах *OmpK35* и *OmpK36*, которые могут приводить к

устойчивости к β -лактамам антибиотикам были обнаружены в 58,9 % штаммов. Мутации в генах *MgrB* или *PmrB*, отвечающие за резистентность к колистину, были выявлены в 5,9 % изолятов.

Гипервирулентные изоляты часто характеризуются гипермукоидным фенотипом. Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* по результатам «стринг-теста» было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом. Положительный стринг-тест является прямым сигналом того, что выделенный изолят может быть hvKp.

По результатам полногеномного секвенирования были идентифицированы капсульные типы. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* к типу K1 принадлежало 8,2 % изолятов, а к типу K2 – 24,7 % штаммов. На долю других капсульных типов гипервирулентных штаммов приходилось: K20 – 2,4 %, K57 – 10,6 %, K64 – 2,4%. Остальные изоляты относились к капсульным типам, которые ассоциируют с cKp (K3, K14, K15, K19, K23, K24, K39, K45, K62).

По результатам MLST-типирования для 85 изученных штаммов было обнаружено 18 разнообразных ST-типов. В результате исследования были идентифицированы ST-типы, характерные для hvKp: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86 (5,9 %), ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %). Остальные штаммы *K. pneumoniae* относились к ST-типам, которые ассоциируют с cKp.

В ходе работы была определена частота встречаемости факторов вирулентности *K. pneumoniae*. Локусы синтеза поликетидов *ybt* и *clb* кодируют сидерофор иерсиниабактин и токсин колибактин соответственно. Локус *clb* был выявлен у 10,6 % изолятов, а *ybt* присутствовал в 68,2 % штаммов и был ассоциирован с одной плазмидой и 7 разнообразными интегративными мобильными элементами ICEKp.

Другие немаловажные кластеры генов вирулентности кодируют синтез сидерофоров сальмохелина (*iro*) и аэробактина (*iuc*), часто связаны с инвазивными заболеваниями и распространены среди штаммов hvKp, которые вызывают тяжелые внебольничные инфекции (пневмония и абсцесс

печени). В исследуемых штаммах локусы *iro* и *iuc* были выявлены в 14,1 % и 72,9 % изолятов соответственно. Регулятор мукоидного фенотипа *trp* связан с гипермукоидностью штаммов *K. pneumoniae*, что является признаком вирулентности hvKp, и был обнаружен в 50,6 % штаммов.

При оценке вирулентности изолятов *K. pneumoniae* на модели системной инфекции белых аутбредных мышей было выделено три группы штаммов в зависимости от величины летальной дозы: авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ). Вирулентность была подтверждена высеvom исследуемого штамма из крови и паренхиматозных органов погибших мышей, а также по результатам патоморфологического исследования.

Гипервирулентные по результатам биологической пробы на мышах штаммы *K. pneumoniae* ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ) с капсульным типом K2 принадлежали к сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выделены от пациентов с флегмоной рубца, панкреатитом, некротической раной культи ($LD_{50} 1 \times 10^1$ КОЕ), а также синовитом коленного сустава и флегмоной поясничной области ($LD_{50} 1 \times 10^2$ КОЕ). Во всех hvKp изолятах присутствовали гены *trpA*, *trpA2*, ген, кодирующий синтеза сидерофора аэробактина (*iuc1*), и гены *reg-344* и *wzyK2*. Большая часть из этих признаков встречалась также и у авирулентных штаммов (по результатам биопробы): *reg-344*, *iuc1*, *trpA* и *trpA2*. Следовательно, только ген *wzyK2* достоверно связан с вирулентностью. Для 87,5 % изолятов *K. pneumoniae*, относящихся к гипервирулентным, и для 35,7 % авирулентных изолятов был характерен гипермукоидный фенотип. Таким образом, не следует определять hvKp, основываясь только на результатах фенотипического теста.

По результатам статистического анализа достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для генов *iucA* ($p=0,0042$), *iroB* ($p=0,0002$) и капсульных типов K1 ($p=0,0134$), K2 ($p=0,0084$), K57 ($p=0,0050$). Достоверная связь между наличием фенотипического

признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ($p=0,0044$).

В результате исследования была разработана и апробирована диагностическая микрочиповая панель для выявления генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* и разработана топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты резистентности к АМП на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА». Разработанные диагностические микрочиповые панели позволяют провести комплексную экспресс-диагностику, отражающую наличие в клиническом образце или выделенном штамме *K. pneumoniae* генетических детерминант вирулентности или резистентности к АМП.

Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты вирулентности включает следующие признаки вирулентности: капсульные типы K1 и K2, а также гены *iucA*, *iroB*, *rmpA* и *rmpA2* (в чипе использован праймер *uni-rmpA*, нацеленный на гомологичную область всех зарегистрированных вариантов генов *rmpA*: (*prmpA*, *prmpA2* и *crmpA*)), *peg-344*. Данные признаки были выбраны по результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера и по результатам анализа литературных источников.

Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты антибиотикорезистентности включает гены β -лактамаз различных подгрупп: БЛРС - СТХ-М-UNI (в чипе использован универсальный праймер на все типы СТХ-М), гены карбапенемаз OXA-48 и KPC, а также металло- β -лактамазы NDM, а также ген, отвечающий за резистентность к фторхинолонам - *qnrS*. Данные гены были выбраны на основании рекомендаций по лечению инфекций, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*, и литературных источников.

Для интерпретации результатов анализа проб ДНК с использованием диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты

вирулентности была разработана модель, реализованная с помощью программного пакета Microsoft Excel. Модель представляет собой электронную таблицу, в которую пользователь вносит обнаруженные в штаммах признаки вирулентности. Согласно введенной в таблицу формуле, рассчитывается значение условного коэффициента, на основании которого исследуемый штамм расценивается как вирулентный или авирулентный.

Проведенные исследования показали, что фенотипический тест для определения гипермукоидности штамма обладает низкой чувствительностью. Идентификация и диагностика hνKp штаммов является достаточно сложной задачей и требуют проведения молекулярных исследований для надежного определения данных штаммов.

ВЫВОДЫ

1. Среди штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов Санкт-Петербурга, на основании фенотипического теста на гипермукоидность выявлено 67,1 % изолятов с классическим фенотипом и 32,9 % изолятов с гипермукоидным фенотипом. В результате оценки чувствительности штаммов к АМП выявлено, что 84,7 % проявляли множественную резистентность. Устойчивость к карбапенемам демонстрировали 64,7 % изолятов, а к колистину - 23,5 %. Чувствительными ко всем тестируемым препаратам были 8,2 % штаммов.

2. На основании молекулярно-генетической характеристики, были определены ассоциированные с плазмидой локусы *iuc* (78,9 %) и *iro* (14,1 %). Локус *ybt* был характерен для 68,2 % изолятов и был ассоциирован с 7 различными интегративными мобильными элементами ICEKp и одной плазмидой, а локус *clb* присутствовал в 10,6 % штаммов. Наличие генов карбапенемаз выявлено у 60,2 % штаммов, а БЛРС – у 57,7 %. Наиболее распространены среди карбапенемаз были гены OXA-48 и NDM-1, которые были обнаружены у 18,8 % и 17,6 % штаммов соответственно. Среди генов БЛРС наиболее часто (54,1 %) встречался ген CTX-M-15. Гены β -лактамаз TEM-1D и OXA-1 были выявлены у 12,9 % и 17,6 % штаммов соответственно.

3. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* идентифицировано 18 сиквенс-типов и 16 капсульных типов. На долю капсульных типов hvKp штаммов приходилось: K1 - 8,2 %, K2 - 24,7 %, K20 – 2,4 %, K57 – 10,6 %, K64 – 2,4 %. Остальные изоляты относились к капсульным типам, которые ассоциируют с cKp. По результатам MLST-типирования были идентифицированы ST-типы, характерные для hvKp: ST23 (18,8 %), ST307 (7,0 %), ST86 (5,9 %), ST11 (1,2 %), ST65 (1,2 %). Также были

распространены следующие типы: ST395 (25,8 %), ST512 (9,3 %). Остальные изоляты относились к ST-типам, которые ассоциируют с сКр.

4. На модели инфицирования белых аутбредных мышей гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ) с капсульным типом K2 принадлежали к сиквенс-типам ST65, ST-86 и ST86-1LV, ST395, и были выделены от пациентов с флегмоной рубца, некротической раной культи, панкреатитом, а также синовитом коленного сустава. Во всех hvКр изолятах присутствовали гены *rtxA*, *rtxA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора аэробактина *iucA*, гены *peg-344* и *wzyK2*.

5. Диагностическая микрочиповая панель для выявления генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* включает следующие признаки: капсульные типы K1 и K2, а также гены *iucA*, *iroB*, *rtxA* и *rtxA2*, *peg-344*. Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты антибиотикорезистентности включает следующие гены: СТХ-М, ОХА-48, КРС, NDM, *qnrS*. Данные панели разработаны на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА» и позволяют провести комплексную экспресс-диагностику, отражающую наличие в клиническом образце или выделенном штамме *K. pneumoniae* генетических детерминант вирулентности или резистентности к АМП.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Созданная в результате исследования коллекция штаммов *K. pneumoniae*, электронный каталог и три Базы данных: «Генотип и фенотип вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19», «Генетические детерминанты и фенотипические характеристики антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*», «Генетические детерминанты и фенотипические характеристики вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*» могут быть использованы для анализа фенотипических и генетических характеристик штаммов, выделенных в клинической практике.

2. Разработанный способ ускоренной диагностики генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на микрочиповом амплификаторе «АриаДНА» может быть использован для прогнозирования тяжести инфекционного процесса.

3. Разработанная топология диагностической микрочиповой панели на генетические детерминанты резистентности штаммов *K. pneumoniae* к АМП может быть использована для создания тест-системы, предназначенной для оценки чувствительности штамма и дальнейшего назначения адекватной антимикробной терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Вследствие того, что данная тема исследования будет сохранять свою актуальность, необходимо расширять существующую коллекцию штаммов для последующего мониторинга вирулентности и антибиотикорезистентности выделяемых изолятов *K. pneumoniae*.

В дальнейшем предполагается продолжить биологические методы исследования на более разнообразной и многочисленной выборке изолятов *K. pneumoniae* для повышения специфичности разработанной модели за счет усовершенствования ее алгоритма.

Дополнительно запланированы исследования генетических детерминант вирулентности с целью повышения прогностической ценности разработанной модели для оценки штамма как вирулентного или авирулентного.

Необходимо проверить работоспособность и провести апробацию диагностической микрочиповой панели на выявление генетических детерминант резистентности к АМП на клинических изолятах *K. pneumoniae*.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ,
ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

- BLAST – basic local alignment search tool
- CAS – азурол хрома S
- СС – клональный комплекс
- CDC – centers for disease control and prevention (центр по контролю и профилактике заболеваний)
- SIM – метод инактивации карбапенемов
- cKp – классические штаммы *K. pneumoniae*
- CTX-M – ген бета-лактамазы *bla*_{CTX-M}
- ESCMID – European congress of clinical microbiology and infectious diseases
- EUCAST – Европейский комитет по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам
- ICE – интегрированные хромосомные элементы
- HPI – «остров» высокой патогенности *Yersinia*
- hνKp – гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*
- K, KL –капсульный тип
- KPC – ген бета-лактамазы *bla*_{KPC}
- LD₅₀ – полуметалетальная доза
- MALDI-TOF – масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией
- MDR – множественная устойчивость
- MLST – мультилокусное сиквенс-типирование
- NDM – ген бета-лактамазы *bla*_{NDM}
- NCBI – национальный центр биотехнологической информации
- OXA48 – ген бета-лактамазы *bla*_{OXA-48}
- PFGE – гель-электрофорез в пульсирующем поле

pLVPK – большая плаزمида *K. pneumoniae*, ассоциированная с вирулентностью

ST – сиквенс-тип

Taq полимераза – термостабильная ДНК-зависимая-ДНК-полимераза бактерии *Thermus aquaticus*

TEM – ген бета-лактамазы *bla*_{TEM}

АМП – антимикробный препарат

БЛА – β-лактамы антибиотики

БЛРС – β-лактамы расширенного спектра действия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГМФ – гидролизат говяжьего мяса ферментированного

ДДМ – диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИНДП – инфекции нижних дыхательных путей

ИОХВ – инфекции в области хирургического вмешательства

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

КАИК – катетер-ассоциированные инфекции кровотока

КОЕ – колониеобразующая единица

КТ – компьютерная томография

ЛПС – липополисахарид

МАКМАХ – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

мкл – микролитр

мкМ – микрометр

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МПК – минимальная подавляющая концентрация

МРТ – магнитно-резонансная томография

НИЦФ – Научно-исследовательский центр фармакотерапии

НК – нуклеиновая кислота

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в режиме реального времени

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ЦНС – центральная нервная система

УФ – ультрафиолет

ФБР – фосфатный буферный раствор

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Агеевец, В.А. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* / В.А. Агеевец, И.В. Агеевец, С.В. Сидоренко // Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12, № 3. – С. 450–460.
2. 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.
3. Алексеева, А.Е. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия / А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, Л.А. Солнцев, Н.А. Гординская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62, № 11. – С. 699-704.
4. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: Наука, 1962. – 180 с.
5. 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. – № 3. – С. 196-200.
6. Белобородов, В.Б. Методические рекомендации «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов» (обновление 2022 г.) / В.Б. Белобородов, О.В. Голощапов, В.Г. Гусаров, А.В. Дехнич, М.Н. Замятин, Н.А. Зубарева, С.К. Зырянов, Д.А. Камышова, Н.Н. Климко, Р.С. Козлов, В.В. Кулабухов, М.А. Петрушин, Ю.С. Полушин, Д.А. Попов, В.А. Руднов, С.В. Сидоренко, Д.В. Соколов, И.В. Шлык, М.В. Эйдельштейн, С.В. Яковлев // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2022 - Т. 19, № 2. – С. 84-114.

7. Белова, И.В. Современные молекулярно-генетические технологии в изучении госпитальных штаммов / И.В. Белова, А.Г. Точилина, О.В. Ковалишена, И.Ю. Широкова, Е.В. Беляева, Л.Ю. Послова, Г.Б. Ермолина, И.В. Соловьева // *Соврем. технол. мед.* – 2019 – Т. 11, № 4. – С. 126–134.

8. 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. – Т. 2. – С. 11–16.

9. Комисарова, Е.В. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* – новая инфекционная угроза / Е.В. Комисарова, Н.В. Воложанцев // *Инфекционные болезни.* – 2019 – Т. 17, № 3. – С. 81–89.

10. Кузьменков, А.Ю. AMRmap: интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности / А.Ю. Кузьменков, И.В. Трушин, А.А. Авраменко, М.В. Эйдельштейн, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // *КМАХ.* – 2017. – Т. 19, № 2. – С. 84-90.

11. Лазарева, И.В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз в Санкт-Петербурге и некоторых других регионах Российской Федерации / И.В. Лазарева, В.А. Агеевец, Т.А. Ершова, Л.П. Зуева, А.Е. Гончаров, М.Г. Дарьина, Ю.С. Светличная, А.Н. Усков, С.В. Сидоренко // *Антибиотики и химиотерапия.* – 2016. – Т. 61, №11–12. – С. 28–38.

12. Лев А.И. Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03/ Лев Анастасия Игоревна. – Оболенск, 2018. – 182 с.

13. Малыгин, А.С. Антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из крови больных COVID-19 / А.С. Малыгин, С.С. Андреев, С.В. Царенко, М.А. Петрушин // *Медицина.* – 2021. – Т. 9, № 2. – С. 63-74.

14. Поздеев, О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О.К. Поздеев, Р.В. Федоров. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.
15. Попов, Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз / Д.А. Попов // КМАХ. – 2019. – № 2. – С. 125-133.
16. Методические рекомендации по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений РД-АПК 3.10.07.02-09. – М.: Министерство сельского хозяйства Российской Федерации, 2009. – 29 с.
17. Скачкова, Т.С. Изучение генетического разнообразия штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения / Т.С. Скачкова, О.Ю. Шипулина, Г.А. Шипулин, А.А. Шеленков, Ю.Г. Янушевич, Ю.В. Михайлова, М.Н. Замятин, В.Г. Гусаров, Н.В. Петрова, Н.Н. Лашенкова, В.С. Фомина, Д.А. Шагин // КМАХ. – 2019. – Т. 21, № 1. – С. 69-74.
18. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016» / М. В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Н.В. Иванчик, Е.Ю. Склеенова, Э.Р. Шайдуллина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 147-159.
19. Чеботарь, И.В. Использование MALDI-TOF-технологии для идентификации возбудителей септических состояний в педиатрической практике / И.В. Чеботарь, О.А. Пономаренко, А.В. Лазарева, О.В. Карасева, А.Л. Горелик, Ю.А. Бочарова, Р.Ф. Тепаев // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 68-74.
20. Чеботарь, И.В. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном / И.В. Чеботарь, Ю.А. Бочарова, И.В. Подопригора, Д.А. Шагин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22, № 1. – С. 4-19.

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 // *Int J Antimicrob Agents*. – 2014. – Vol. 44. – P. 152-155.

22. Alcantar-Curiel, M.D. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation / M.D. Alcantar-Curiel, D. Blackburn, Z. Saldana, C. Gayosso-Vazquez, N.M. Iovine, M.A. De la Cruz, J.A. Giron // *Virulence*. – 2013. – Vol. 4, No. 2. – P. 129-138.

23. Ang, M. Prognostic factors and outcomes in endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis / M. Ang, A. Jap, S.P. Chee // *Am J Ophthalmol*. – 2011. – Vol. 151, No. 2. – P. 338–344.e2.

24. Arakawa, Y. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2) / Y. Arakawa, M. Ohta, R. Wacharotayankun, M. Mori, N. Kido, H. Ito, T. Komatsu, T. Sugiyama, N. Kato // *Infect Immun*. – 1991. – Vol. 59, No. 6. – P. 2043-2050.

25. Ardanuy, C., Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems / C. Ardanuy, J. Liñares, M.A. Domínguez, S. Hernández-Allés, V.J. Benedí, L. Martínez-Martínez // *Antimicrob Agents Chemother*. – 1998. – Vol. 42, No. 7. - P. 1636-1640.

26. Bachman, M.A. Genome-wide identification of *Klebsiella pneumoniae* fitness genes during lung infection / M.A. Bachman, P. Breen, V. Deornellas, Q. Mu, L. Zhao, W. Wu, J.D. Cavalcoli, H.L.T. Mobley // *mBi*. – 2015. – No. 6. – e00775-15.

27. Bachman, M.A. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia / M.A. Bachman, S. Lenio, L. Schmidt, J.E. Oyler, J.N. Weiser // *MBio*. – 2012. – Vol. 3, No. 6. – e00224-11.

28. Bachman, M.A. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2 / M.A. Bachman, J.E. Oyler, S.H. Burns, M. Caza, F. Lepine, C.M. Dozois, J.N. Weiser // *Infect Immun.* – 2011. – Vol. 79, No. 8. – P. 3309-3316.
29. Bodena, D. Bacterial contamination of mobile phones of health professionals in Eastern Ethiopia: antimicrobial susceptibility and associated factors / D. Bodena, Z. Teklemariam, S. Balakrishnan, T. Tesfa // *Trop Med Health.* – 2019. – Vol. 47. – P. 1-10.
30. Boucher, H.W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! / H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett // *Clinical Infectious Diseases.* – 2009. – Vol. 48, No. 1. – P. 1-12.
31. Brizendine, K.D. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infection following solid organ transplantation / K.D. Brizendine, S.S. Richter, E.D. Cober, D. van Duin // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2015. – Vol. 59, No 1. – P. 553-557.
32. Bryers, J.D. Medical biofilms / J.D. Bryers // *Biotechnol Bioeng.* – 2008. – Vol. 100, No. 1, – P.1-18.
33. Bulger, J. Metabolite Transporter PEG344 Is Required for Full Virulence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain hvKP1 after Pulmonary but Not Subcutaneous Challenge / J. Bulger, U. MacDonald, R. Olson, J. Beanan, T.A. Russo // *Infection and Immunity.* – 2017. – Vol. 85, No. 10. – e00093-17.
34. Bullen, J.J. Iron binding proteins and infection / J.J. Bullen, H.J. Rogers, E. Griffiths // *Br J Haematol.* – 1972. – No. 23. – P. 389-392.
35. Bushell, S.R. *Wzi* is an outer membrane lectin that underpins group 1 capsule assembly in *Escherichia coli* / S.R. Bushell, I.L. Mainprize, M.A. Wear, H. Lou, C. Whitfield, J.H. Naismith // *Structure.* – 2013. – Vol. 21, No. 5. – P. 844-853.
36. Carniel, E. The *Yersinia* high-pathogenicity island: An iron-uptake island / E. Carniel // *Microbes Infect.* – 2001. – Vol. 3, No. 7. – P. 561–569.

37. Casewell, M. Hands as route of transmission for *Klebsiella* species / M. Casewell, I. Phillips // Br Med J. – 1977. – Vol. 2., No. 6098. – P. 1315-1317.
38. Catalan-Najera, J.C. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? / J.C. Catalan-Najera, U. Garza-Ramos, H. Barrios-Camacho // Virulence. – 2017. – Vol. 12. – P. 1-13.
39. Chang, C.M. *Klebsiella pneumoniae* psoas abscess: predominance in diabetic patients and grave prognosis in gas-forming cases / C.M. Chang, W.C. Ko, H.C. Lee, Y.M. Chen, Y.C. Chuang // J Microbiol Immunol Infect. – 2001. – Vol. 34, No. 3. – P. 201–206.
40. Chaudhary, P. Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract infected patients / P. Chaudhary, D. Bhandari, K. Thapa, P. Thapa, D. Shrestha, H.K. Chaudhary, A. Shrestha, H. Parajuli, B.P. Gupta // J. Nepal Health Res. Counc. – 2016. – Vol. 14, No. 33. – P. 111-115.
41. Chen, F.J. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* / F.J. Chen, T.L. Lauderdale, M. Ho, H.J. Lo // Microb Drug Resist. – 2003. – Vol. 9, No. 3. – P. 265-271.
42. Chen, Y.T. Prevalence and characteristics of *pks* genotoxin gene cluster-positive clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan / Y.T. Chen, Y.C. Lai, M.C. Tan, L.Y. Hsieh, J.T. Wang, Y.R. Shiau, H.Y. Wang, A.C. Lin, J.F. Lai, I.W. Huang, T.L. Lauderdale // Sci Rep. – 2017. – No. 7. – P. 43120.
43. Chen, Y.T. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43 / Y.T. Chen, H.Y. Chang, Y.C. Lai, C.C. Pan, S.F. Tsai, H.L. Peng // Gene. – 2004. – No. 337. – P. 189-198.
44. Chiu, S.K. Roles of *ramR* and *tet(A)* mutations in conferring tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates / S.K. Chiu, L.Y. Huang, H. Chen, Y.K. Tsai, C.H. Liou, J.C. Lin, L.K. Siu, F. Y. Chang, K.M. Yeh // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – Vol. 61, No. 8. – P. e00391-17.

45. Choby, J.E. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives / J.E. Choby, J. Howard-Anderson, D.S. Weiss // The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine. – 2020. – Journal of Internal Medicine. – Vol. 287. – P. 283–300.

46. Chou, H.C. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection / H.C. Chou, C.Z. Lee, L.C. Ma, C.T. Fang, S.C. Chang, J.T. Wang // Infect Immun. – 2004. – Vol. 72, No. 2. – 3783-3792.

47. Cortes, G. Role of the htrA gene in *Klebsiella pneumoniae* virulence / G. Cortes, B. de Astorza, V.J. Benedi, S. Alberti // Infect Immun. – 2002. – Vol. 70, No. 9. – P. 4772-4776.

48. Cubero, M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air-liquid interface / M. Cubero, S. Marti, M.A. Dominguez, A. Gonzalez-Diaz, D. Berbel, C. Ardanuy // PLoS One. – 2019. – Vol. 14, No. 9. – e0222628.

49. Cuevas-Ramos, G. *Escherichia coli* induces DNA damage *in vivo* and triggers genomic instability in mammalian cells / G. Cuevas-Ramos, C.R. Petit, I. Marcq, M. Boury, E. Oswald, J.P. Nougayrede // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – Vol. 107, No. 25. – P. 11537-11542.

50. Garcia-Sureda, L. Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance / L. Garcia-Sureda, C. Juan, A. Domenech-Sanchez, S. Alberti // Antimicrob. Agents Chemother. – 2011. – No. 55. – P. 1803–1805.

51. Gu, D. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study / D. Gu, N. Dong, Z. Zheng, D. Lin, M. Huang, L. Wang, E-W. Chan, L. Shu, J. Yu, R. Zhang, S. Chen // The Lancet Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 18. – No.1. – P. 37-46.

52. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition / National Research Council. – Washington, DC: The National Academies Press, 2011. – 246 c.

53. Gurevich, A. QCAST: quality assessment tool for genome assemblies / A. Gurevich, V. Saveliev, N. Vyahhi, G. Tesler // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29, No. 8. – P. 1072-1075.
54. Davis, T.J. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment / T.J. Davis, J.M. Matsen // *J Infect Dis*. – 1974. – Vol. 130, No. 4. – P. 402-405.
55. De Majumdar, S. Elucidation of the *RamA* regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation / S. De Majumdar, J. Yu, M. Fookes, S.P. McAteer, E. Llobet, S. Finn, S. Spence, A. Monaghan, A. Kissenpfennig, R.J. Ingram, J. Bengoechea, D.L. Gally, S. Fanning, J.S. Elborn, T. Schneiders // *PLoS Pathog*. – 2015. – Vol. 11. – P. e1004627.
56. Decre, D. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France / D. Decre, C. Verdet, A. Emirian, T. Le Gourrierec, J.C. Petit, G. Offenstadt, E. Maury, S. Brisse, G. Arlet // *J Clin Microbiol*. – 2011. – Vol. 49. – P. 3012–3014.
57. Diancourt, L. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates / L. Diancourt, V. Passet, J. Verhoef, P.A. Grimont, S. Brisse // *J. Clin. Microbiol*. – 2005. – Vol. 43, No. 8. – P. 4178-4182.
58. Doebbeling, B.N. Epidemics: identification and management / B.N. Doebbeling // *Prevention and control of nosocomial infections*. – 1993. – Vol. 2. – P. 177-206.
59. Domenech-Sanchez, A. Role of *Klebsiella pneumoniae* *OmpK35* porin in antimicrobial resistance / A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, S. Hernandez-Alles, M. del Carmen Conejo, A. Pascual, J.M. Tomas, S. Albertí, V.J. Benedí // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2003. – Vol. 47, No. 10. – P. 3332-3335.
60. Du, P. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / P. Du, Y. Zhang, C. Chen // *Lancet Infect Dis*. – 2018. – Vol. 18, No. 1. – P. 23-24.

61. Effah, C.Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health / C.Y. Effah, T. Sun, S. Liu, Y. Wu // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2020. – Vol. 19, No. 1. – P. 1-9.

62. Eger, E. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 420 with a chromosomally inserted virulence plasmid / E. Eger, S.E. Heiden, K. Becker, A. Rau, K. Geisenhainer, E.A. Idelevich, K. Schaufler // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. 22, No. 17. – 9196.

63. El Fertas-Aissani, R. 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 // *Pathol Biol (Paris)*. – 2013. – No. 61. – P. 209–216.

64. European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries [Электронный ресурс] / ECDC, Stockholm. – 2021. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/risk-assessment-emergence-hypervirulent-klebsiella-pneumoniae-eu-eea> (дата обр. 25.05.2023).

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

66. Ferjani, S. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a Tunisian hospital / S. Ferjani, M. Saidani, F.S. Amine, I. Boutiba-Ben Boubaker // *Microb Drug Resist*. – 2015. – Vol. 21, No. 2. – P. 158-166.

67. Fierer, J. Recurring *Klebsiella pneumoniae* pyogenic liver abscesses in a resident of San Diego, California, due to a K1 strain carrying the virulence plasmid / J. Fierer, L. Walls, P. Chu // *J Clin Microbiol*. – 2011. – Vol. 49, No. 12. – P. 4371–4373.

68. 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 // Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – No. 103. – P. 16502–16507.
69. Frirdich, E. Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae* / E. Frirdich, C. Whitfield // J Endotoxin Res. – 2005. – Vol. 11. – P. 133–144.
70. Follador, R. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides / R. Follador, E. Heinz, K.L. Wyres, M.J. Ellington, M. Kowarik, K.E. Holt, N.R. Thomson // Microb Genom. – 2016. – Vol. 2, No. 8. – P. e000073.
71. Gaffney, D.F. Chloramphenicol acetyltransferases determined by R plasmids from Gramnegative bacteria / D.F. Gaffney, T.J. Foster, W.V. Shaw // J Gen Microbiol. – 1978. – Vol. 109. – P. 351-358.
72. Garneau-Tsodikova, S. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives / S. Garneau-Tsodikova, K.J. Labby // Medchemcomm. – 2016. – Vol. 7, No. 1. – P.11-27.
73. Guo, C. MLST-based inference of genetic diversity and population structure of clinical *Klebsiella pneumoniae*, China / C. Guo, X. Yang, Y. Wu, H. Yang, Y. Han, R. Yang, L. Hu, Y. Cui, D. Zhou // Sci Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 7612.
74. Harada, S. Familial spread of a virulent clone of *Klebsiella pneumoniae* causing primary liver abscess / S. Harada, K. Tateda, H. Mitsui, Y. Hattori, M. Okubo, S. Kimura, K. Sekigawa, K. Kobayashi, N. Hashimoto, S. Itoyama, T. Nakai, T. Suzuki, Y. Ishii, K. Yamaguchi // J Clin Microbiol. – 2011. – Vol. 49, No. 6. – P. 2354–2356.
75. Heidary, M. Detection of *acrA*, *acrB*, *aac (6')-Ib-cr*, and *qepA* genes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* / M. Heidary, A. Bahramian, A. Hashemi, M. Goudarzi, V.F. Omrani, G. Eslami, H. Goudarzi // Acta Microbiol Immunol Hung. – 2017. – Vol. 64, No. 1. – P. 63-69.

76. Hetland, M.A.K. Within-patient and global evolutionary dynamics of *Klebsiella pneumoniae* ST17 / M.A.K. Hetland, J. Hawkey, E. Bernhoff, R.J. Bakksjø, H. Kaspersen, S.I. Rettedal, A. Sundsfjord, K.E. Holt, I.H. Löhr // Microbial genomics. – Vol. 9, No. 5. – P. mgen001005.

77. Holt, K.E. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health / K.E. Holt, H. Wertheim, R.N. Zadoks, N.R. Thomson // Proc Natl Acad Sci USA. – 2015. – Vol. 112. – P. E3574–81.

78. Hsu, C.R. The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited / C.R. Hsu, T.L. Lin, Y.C. Chen, H.C. Chou, J.T. Wang // Microbiology. – 2011. – Vol. 157, No. 12. – P. 3446-3457.

79. Huang, T.S. Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* on the basis of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry by using supervised machine learning approach / T.S. Huang, SS.J. Lee, C.C. Lee, F.C. Chang // PloS one. – 2020. – Vol. 15, No. 2. – P. e0228459.

80. Huang, Y. Rapid Detection of K1 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS / Y. Huang, J. Li, D. Gu, Y. Fang, E.W. Chan, C. Sand, R. Zhang // Front. Microbiol. – 2015. – No. 6. – P. 1435.

81. Ikeda, M. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan / M. Ikeda, M. Mizoguchi, Y. Oshida, K. Tatsuno, R. Saito, M. Okazaki, S. Okugawa, K. Moriya // Int J Gen Med. – 2018. – Vol. 11. – P. 293–299.

82. Ito, R. Widespread fosfomycin resistance in Gram-negative bacteria attributable to the chromosomal *fosA* gene / R. Ito, M. Mustapha, A.D. Tomich, J.D. Callaghan, C.L. McElheny, R.T. Mettus, R.M.Q. Shanks, N. Sluis-Cremer, Y. Doi // mBio. – 2017. – Vol. 8, No. 4. – P. e00749-17.

83. Izquierdo, L. The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence / L. Izquierdo, N.

Coderch, N. Piqué, E. Bedini, M.M. Corsaro, S. Merino, S. Fresno, J.M. Tomás, M. Regué // *J. Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185. – P. 7213-7221.

84. Jacoby, G.A. Plasmid-mediated quinolone resistance / G.A. Jacoby, J. Strahilevitz, D.C. Hooper // *Microbiol Spectr.* – 2014. – Vol. 2, No. 5. – P. 10.1128.

85. Jarvis, W.R. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* / W.R. Jarvis, V.P. Munn, A.K. Highsmith, D.H. Culver, J.M. Hughes // *Infect Control.* – 1985. – Vol. 6, No. 2. – P. 68-74.

86. Jomehzadeh, N. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in southwest Iran / N. Jomehzadeh, K. Ahmadi, M.A. Bahmanshiri // *J Clin Lab Anal.* – 2022. – Vol. 36, No. 7. – P. e24342.

87. Josten, M. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry / M. Josten, J. Dischinger, C. Szekat, M. Reif, N. Al-Sabti, H.G. Sahl, M. Parcina, I. Bekeredjian-Ding, G. Bierbaum // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – No. 304. – P. 1018–1023.

88. Kaczmarek, F.M. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*(ACT-1) beta-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 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2006. – No. 50. – P. 3396–3406.

89. Kauffmann, F. On the serology of the *Klebsiella* Group / F. Kauffmann, // *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica.* – 1949. – Vol. 26. – P. 381–406.

90. Khan, Z.A. Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing / Z.A. Khan, M.F. Siddiqui, S. Park // *Diagnostics.* – 2019. – Vol. 9, No. 49. – P. 2-17.

91. Kong, H. Clinical and microbiological characteristics of pyogenic liver abscess in a tertiary hospital in East China / H. Kong, F. Yu, W. Zhang, X. Li // *Medicine (Baltimore)*. – 2017. – Vol. 96, No. 37. – P. e8050.
92. Kuzmenkov, A.Yu. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance / A.Yu. Kuzmenkov, I.V. Trushin, A.A. Avramenko, M.V. Edelstein, A.V. Dekhnich, R.S. Kozlov // *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. – 2017. – Vol. 19, No. 2. – P. 84-90.
93. Lai, Y.C. *RmpA2*, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level / Y.C. Lai, H.L. Peng, H.Y. Chang // *J Bacteriol.* – 2003. – Vol. 185, No. 3. – P. 788-800.
94. Lam, M.M.C. Convergence of virulence and MDR in a single plasmid vector in MDR *Klebsiella pneumoniae* ST15 / M.M.C. Lam, K.L. Wyres, R.R. Wick, L.M. Judd, A. Fostervold, K.E. Holt, I.H. Löhr // *J Antimicrob Chemother.* – 2019. – Vol. 74, No. 5. – P. 1218-1222.
95. Lam, M.M. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations / M.M. Lam, R.R. Wick, K.L. Wyres, C.L. Gorrie, L.M. Judd, A.W. J. Jenney, S. Brisse, K.E. Holt // *Microbial Genomics*. – 2018. – Vol. 4, No. 9. – P. 1–14.
96. Lam, M.M.C. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex / M.M.C. Lam, R.R. Wick, L.M. Judd, K.E. Holt, K.L. Wyres // *Microbial Genomics*. – 2022. – Vol. 8, No. 3. – P. 000800.
97. Lam, M.M.C. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* / M.M.C. Lam, K.L. Wyres, L.M. Judd, R.R. Wick, A. Jenney, S. Brisse, K.E. Holt // *Genome Med.* – 2018. – Vol. 10, No. 1. – P. 77.

98. Lawlor, M.S. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model / M.S. Lawlor, J. Hsu, P.D. Rick, V.L. Miller // *Mol Microbiol.* – 2005. – No. 58. – P.1054–1073.
99. Lawlor, M.S. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection / M.S. Lawlor, C. O'Connor, V.L. Miller. // *Infect. Immun.* – 2007. – Vol. 75. – P.1463–1472.
100. Lazareva, I. The emergence of hypervirulent *bla*NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital / I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, M. Lebedeva, P. Starkova, D. Likholetova, V. Gostev, V. Moiseenko, V. Egorenkov, A. Navatskaya, G. Mitroshina, E. Myasnikova, I. Tsvetkova, Y. Lobzin, S. Sidorenko // *Infect. Genet. Evol.* – 2020. – Vol. 85. – 104527.
101. Lee, C.H. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis / C.H. Lee, C.C. Chang, J.W. Liu, R.F. Chen, K.D. Yang // *Virulence.* – 2014. – Vol. 15, No. 5(6). – P. 673-679.
102. Lee, C-R. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms / C-R. Lee, J.H. Lee, K.S. Park, J.H. Jeon, Y.B. Kim, C-J. Cha, B.C. Jeong, S.H. Lee // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* – 2017. – Vol. 7. – P. 483.
103. Lee, I.R. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population / I.R. Lee, J.S. Molton, K.L. Wyres, C. Gorrie, J. Wong, C. Hoh, J. Teo, S. Kalimuddin, D. Lye, S. Archuleta, K. Holt, Y. Gan // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 29316.
104. Lery, L.M. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor / L.M. Lery, L. Frangeul, A. Tomas, V. Passet, A.S. Almeida, S. Bialek-Davenet, V. Barbe, J.A. Bengoechea, P. Sansonetti, S. Brisse, R. Tournebize // *BMC Biol.* – 2014. – Vol. 12. – P. 41.

105. Lev, A.I. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles / A.I. Lev, E.I. Astashkin, A.A. Kislichkina, E.V. Solovieva, T.I. Kombarova, O.V. Korobova, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, V.E. Malikov, A.G. Bogun, A.I. Borzilov, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, N.K. Fursova // Path. Global Health. – 2018. – Vol. 112, No. 3. – P. 142-151.

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

107. Lin, J.C. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess / J.C. Lin, F.Y. Chang, C.P. Fung, J.Z. Xu, H.P. Cheng, J.J. Wang, L.Y. Huang, L.K. Siu // Microbes Infect. – 2004. – Vol. 6, No. 13. – P. 1191–1198.

108. Lin, Y.C. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain / Y.C. Lin, M.C. Lu, H.L. Tang, H.C. Liu, C.H. Chen, K.S. Liu, C. Lin, C.S. Chiou, M.K. Chiang, C.M. Chen, Y.C. Lai // BMC Microbiol. – 2011. – No. 11. – P. 50-58.

109. Liu, C. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor / C. Liu, J. Guo // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2019. – Vol. 18, No. 1. – P. 4.

110. Liu, C. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* is emerging as an increasingly prevalent *K. pneumoniae* pathotype responsible for nosocomial and healthcare-associated infections in Beijing, China / P. Du, N. Xiao, F. Ji, T.A. Russo, J. Guo // Virulence. – 2020. – Vol. 11, No. 1. – P. 1215-1224.

111. Liu, Y.C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis / Y.C. Liu, D.L. Cheng, C.L. Lin // Arch Intern Med. – 1986. – Vol. 146, No. 10. – P. 1913–1916.

112. Liu, Y.Y. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study / Y.Y. Liu, Y. Wang, T.R. Walsh, L.X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B. Dong, X. Huang, L.F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang, J.H. Liu, J. Shen // *Lancet Infect Dis.* – 2016. – Vol. 16, No. 2. – P. 161-168.
113. Louden, B.C. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection / B.C. Louden, D. Haarmann, A.M. Lynne // *J Microbiol Biol Educ.* – 2011. – No. 12. – P. 1e3.
114. Lu, P.L. Characterisation of fosfomycin resistance mechanisms and molecular epidemiology in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates / P.L. Lu, Y.J. Hsieh, J.E. Lin, J.W. Huang, T.Y. Yang, L. Lin, S.P. Tseng // *Int J Antimicrob Agents.* – 2016. – Vol. 48, No. 5. – P. 564-568.
115. Luo, Y. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China / Y. Luo, Y. Wang, L. Ye, J. Yang // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – Vol. 20, No. 11. – P. O818-O824.
116. Ma, L.C. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection / L.C. Ma, C.T. Fang, C.Z. Lee, C.T. Shun, J.T. Wang // *J. Infect. Dis.* – 2005. – Vol. 192. – P. 117-128
117. Markley, J.L. Tetracycline-inactivating enzymes / J.L. Markley, T.A. Wencewicz // *Front Microbiol.* 2018. – No. 9. – P. 1058.
118. Meletis, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives / G. Meletis // *Ther Adv Infect Dis.* – 2016. – Vol. 3, No. 1. – P. 15-21.
119. Miethke, M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2007. – No. 71. – P. 413–451.
120. Munoz-Price, L.S. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases / L.S. Munoz-Price, L. Poirel, R.A.

Bonomo, M.J. Schwaber, G.L. Daikos, M. Cormican, G. Cornaglia, J. Garau, M. Gniadkowski, M.K. Hayden, K. Kumarasamy, D.M. Livermore, J.J. Maya, P. Nordmann, J.B. Patel, D.L. Paterson, J. Pitout, M.V. Villegas, H. Wang, N. Woodford, J.P. Quinn // *Lancet Infect Dis.* – 2013. – Vol. 13. – P. 785-796.

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

122. Nishida, S. Genomic analysis of a pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 identified in Japan in 2016 / S. Nishida, Y. Ono // *Int J Antimicrob Agents.* – 2019. – Vol. 55, No. 4. – 105854.

123. Nougayrede, J.P. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells / J.P. Nougayrede, S. Homburg, F. Taieb, M. Boury, E. Brzuszkiewicz, G. Gottschalk, C. Buchrieser, J. Hacker, U. Dobrindt, E. Oswald // *Science.* – 2006. – Vol. 313, No. 5788. – P. 848-851.

124. Paczosa, M.K. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense / M.K. Paczosa, J. Meccas // *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* – 2016. – Vol. 80, No. 3. – P. 629-661.

125. Palacios, M.A. serendipitous mutation reveals the severe virulence defect of a *Klebsiella pneumoniae fepB* mutant / M. Palacios, C.A. Broberg, K.A. Walker, V.L. Miller // *mSphere.* – 2017. – Vol. 2, No. 4. – e00341-17.

126. Palacios, M. Identification of two regulators of virulence that are conserved in *Klebsiella pneumoniae* classical and hypervirulent strains / T.A. Miner, D.R. Frederick, V.E. Sepulveda, J.D. Quinn, K. A. Walker, V.L. Miller // *MBio.* – 2018. – No. 9. – P. e01443.

127. Pasom, W. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS*, *qnrB*, and *qnrA*, in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a teaching hospital, Thailand / W. Pasom, A. Chanawong, A. Lulitanond, C. Wilailuckana, S. Kenprom, P. Puang-Ngern // *Jpn J Infect Dis.* – 2013. – Vol. 66, No. 5. – P. 428-432.

128. Passet, V. Association of tellurite resistance with hypervirulent clonal groups of *Klebsiella pneumoniae* / V. Passet, S. Brisse // J Clin Microbiol. – 2015. – Vol. 53. – P. 1380–1382.

129. Patel, P.K. Brief report on hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / P.K. Patel, T.A. Russo, A.W. Karchmer // Open Forum Infect Dis. – 2014. – Vol. 1, No. 1. – P. ofu028.

130. Prjibelski, A. Using SPAdes de novo assembler / A. Prjibelski, D. Antipov, D. Meleshko, A. Lapidus, A. Korobeynikov // Current Protocols in Bioinformatics. – 2020. – Vol. 70, No. 1 – P. e102.

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

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

133. Pomakova, D.K. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and underrecognized pathogenic variant / D.K. Pomakova, C.B. Hsiao, J.M. Beanan, R. Olson, U. MacDonald, Y. Keynan, T.A. Russo // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2012. – Vol. 31, No. 6. – P. 981–989.

134. Popa, L.I. Multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 clone survival chain from inpatients to hospital effluent after chlorine treatment / L.I. Popa, I. Gheorghe, I.C. Barbu, M. Surleac, S. Paraschiv, L. Măruțescu, M. Popa, G.G. Pîrcălăbioru, D. Talapan, M. Niță, A. Streinu-Cercel, A. Streinu-Cercel, D. Oțlea, M.C. Chifiriuc // Front Microbiol. – 2021. –Vol. 11. – P. 610296.

135 Pulzova, L. Alterations in outer membrane permeability favor drug-resistant phenotype of *Klebsiella pneumoniae* / L. Pulzova, L. Navratilova, L. Comor //Microbi Drug Resist. – 2017. – Vol. 23, No. 4. – P. 413-420.

136. Redgrave, L.S. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success / L.S. Redgrave, S.B. Sutton, M.A. Webber, L.J. Piddock // Trends Microbiol. – 2014. – Vol. 22, No. 8 – P. 438–445.
137. Regueiro, V. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells / V. Regueiro, M.A. Campos, J. Pons, S. Alberti, J.A. Bengoechea // Microbiology. – 2006. – No. 152. – P. 555-566.
138. Riser, E. A new serotyping method for *Klebsiella* species: evaluation of the technique/ E. Riser, P. Noone, M.L. Bonnet // J. clin. Path. – 1976. – No. 29. – P. 305-308.
139. Robicsek, A. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance / A. Robicsek, G.A. Jacoby, D.C. Hooper // Lancet Infect Dis. – 2006. – Vol. 6. – P. 629–640.
140. Rocha, J. Common and distinctive genomic features of *Klebsiella pneumoniae* thriving in the natural environment or in clinical settings / J. Rocha, I. Henriques, M. Gomila, C.M Manaia // Sci Rep. – 2022. – Vol. 12. – 10441.
141. Rodriguez-Martinez, J.M. Contribution of *OqxAB* efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* / J.M. Rodriguez-Martinez, P. Diaz de Alba, A. Briales, J. Machuca, M. Lossa, F. Fernandez-Cuenca, J. Rodriguez Bano, L. Martínez-Martínez, A. Pascual // J Antimicrob Chemother. – 2013. – Vol. 68, No. 1. – P. 68-73.
142. Rosen, D.A. *Klebsiella pneumoniae* *FimK* promotes virulence in murine pneumonia / D.A. Rosen, J.K Hilliard, K.M. Tiemann, E.M Todd, S.C. Morley, D.A. Hunstad // J. Infect Dis. – 2016. – Vol. 213, No. 4. – P. 649-658.
143. Russo, T.A. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* / T.A. Russo, R. Olson, U. Macdonald, D. Metzger, L.M. Maltese, E.J. Drake, A.M. Gulick // Infect Immun. – 2014. – Vol. 82, No. 6. – P. 2356–2367.

144. Russo, T.A. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *ex vivo* and *in vivo* / T.A. Russo, R. Olson, U. MacDonald, J. Beanan, B.A. Davidson // *Infect Immun.* – 2015. – Vol. 83, No. 8. – P. 3325–3333.

145. Russo, T.A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / Russo T.A., C.M. Marr // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. – Vol. 32, No. 3. – P. e00001-19.

146. Russo, T.A. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae* / T.A. Russo, R. Olson, C.T. Fang, N. Stoesser, M. Miller, U. MacDonald, A. Hutson, J.H. Barker, R.M. La Hoz, J.R. Johnson // *J Clin Microbiol.* – 2018. – V. 56, No. 9. – P. e00776-18.

147. Ruzin, A. Influence of transcriptional activator *RamA* on expression of multidrug efflux pump *AcrAB* and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* / A. Ruzin, M.A. Visalli, D. Keeney, P.A. Bradford // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2005. – Vol. 49, No. 3. – P. 1017-1022.

148. Salzman, T.C. Hand contamination of personnel as a mechanism of cross-infection in nosocomial infections with antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella aerobacter* / T.C. Salzman, J.J. Clark, L. Klemm // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1967. – Vol. 7. – P. 97-100.

149. Sanikhani, R. Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis / R. Sanikhani, M. Moeinirad, F. Shahcheraghi, A. Lari, S. Fereshteh, A. Sepehr, A. Salimi, F. Badmasti // *Iran J Microbiol.* – 2021. – Vol. 13, No. 3. – P. 257-265.

150. Savard, P. Combating the spread of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a battle that infection prevention should not lose / P. Savard, T.M. Perl // *Clin Microbiol Infect.* – 2014. – Vol. 20, No. 9. – P.854-861.

151. Schrol, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation / C. Schrol, K.B. Barken, K.A. Krogfelt, C. Struve // *BMC Microbiol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 179.

152. Schwarz, S. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol / S. Schwarz, C. Kehrenberg, B. Doublet, A. Cloeckaert // FEMS Microbiol Rev. 2004. – Vol. 28, No. 5. – P. 519-542.

153. Schwyn, B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores / B. Schwyn, J.B. Neilands // Analytical Biochem. – 1987. – No. 160. – P. 47-56.

154. Shaidullina, E. Antimicrobial Resistance and Genomic Characterization of OXA-48- and CTX-M-15-Co-Producing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 Recovered from Nosocomial Outbreak / E. Shaidullina, A. Shelenkov, Y. Yanushevich, Y. Mikhaylova, D. Shagin, I. Alexandrova, O. Ershova, V. Akimkin, R. Kozlov, Edelstein M. // Antibiotics (Basel). – 2020. – Vol. 9, No. 12. – P. 862.

155. Shaikh, S. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment / S. Shaikh, J. Fatima, S. Shakil, S.M. Rizvi, M.A. Kamal // Saudi Journal of Biological Sciences. – 2015. – Vol. 22, No. 1. – P. 90-101.

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

157. Singhal, N. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis / N. Singhal, M. Kumar, P.K. Kanaujia, J.S. Virdi // Frontiers in Microbiology. – 2015. – Vol. 6. – P. 1-16.

158. Siu, L.K. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome / L.K. Siu, K.M. Yeh, J.C. Lin, C.P. Fung, F.Y. Chang // Lancet Infect Dis. – 2012. – Vol. 12. – P. 881–887.

159. Soge, O.O. New antibiotic resistance genes associated with CTX-M plasmids from uropathogenic Nigerian *Klebsiella pneumoniae* / O.O. Soge, B.A. Adeniyi, M.C. Roberts // J Antimicrob Chemother. – 2006. – Vol. 58, No. 5. – P. 1048-1053.

160. Srinivasan, V.B. Functional characterization of a novel outer membrane porin *KpnO*, regulated by *PhoBR* two-component system in *Klebsiella pneumoniae*

NTUH-K2044 / V.B. Srinivasan, M. Venkataramaiah, A. Mondal, V. Vaidyanathan, T. Govil, G. Rajamohan // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, No. 7. – P. e41505.

161. Struve, C. Application of a novel multiscreening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection / C. Struve, C. Forestier, K.A. Krogfelt // Microbiology. – 2003. – No. 149. – P. 167–176.

162. Su, K. Genome-wide identification of genes regulated by *RcsA*, *RcsB*, and *RcsAB* phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 / K. Su, X. Zhou, M. Luo, X. Xu, P. Liu, X. Li, J. Xue, S. Chen, W. Xu, Y. Li, J. Qiu // Microb Pathog. – 2018. – No. 123. – P. 36-41.

163. Tabrizi, A.M.A. Outbreak of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* harbouring *bla*(VIM-2) among mechanically-ventilated drug-poisoning patients with high mortality rate in Iran / A.M.A.Tabrizi, F. Badmasti, F. Shahcheraghi, O. Azizi // Journal of global antimicrobial resistance. – 2018. – Vol. 15. – P. 93-98.

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

165. Tan, Y.M. An appraisal of surgical and percutaneous drainage for pyogenic liver abscesses larger than 5 cm / Y.M. Tan, A.Y. Chung, P.K. Chow, P.C. Cheow, W.K. Wong, L.L. Ooi, K.C. Soo // Ann Surg. – 2005. – Vol. 241, No. 3. – P. 485–490.

166. Tang, H.L. Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation / H.L. Tang, M.K. Chiang, W.J. Liou, Y.T. Chen, H.L. Peng, C.S. Chiou, K.S. Liu, M.C. Lu, K.C. Tung, Y.C. Lai // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2010. – No. 29. – P. 689–698.

167. Tang, Y. A putative multireplicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes *bla*KPC-2, *bla*CTX-M-14 and *bla*TEM-1 and trimethoprim resistance gene *dfrA25* from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type (ST) 11 strain in China / Y.

Tang, P. Shen, W. Liang, J. Jin, X. Jiang // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, No. 2. – P. e0171339.

168. The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy [Электронный ресурс] / ResistanceMap: Antibiotic resistance – USA., 2020. – URL: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>. (дата обр. 23.05.2023).

169. Togawa, A. Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia patients: A retrospective cohort study / A. Togawa, H. Toh, K. Onozawa, M. Yoshimura, C. Tokushige, N. Shimono, T. Takata, K. Tamura // J Infect Chemother. – 2015. – Vol. 21. – P. 531–537.

170. Touati, A. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria / A. Touati, A. Mairi, Y. Baloul, R. Lalaoui, S. Bakour, L. Thighilt, A. Gharout, J.M. Rolain / J. Glob. Antimicrob. Resist. – 2017. – Vol. 9. – P. 17-18.

171. Tsai, Y.K. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins *OmpK35* and *OmpK36* play roles in both antimicrobial resistance and virulence / Y.K. Tsai, C.P. Fung, J.C. Lin, J.H. Chen, F.Y. Chang, T.L. Chen, L.K. Siu // Antimicrob Agents Chemother. – 2011. – Vol. 55, No. 4. – P.1485-1493.

172. Ulrich, N. Effectiveness of healthcare worker screening in hospital outbreaks with gram-negative pathogens: a systematic review / N. Ulrich, P. Gastmeier, R.P. Vonberg // Antimicrob Resist Infect Control. – 2018. – Vol. 7. – P. 36.

173. Walker, K.A. A *Klebsiella pneumoniae* regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity / K.A. Walker, T.A. Miner, M. Palacios, D. Trzilova, D.R. Frederick, C.A. Broberg, V.E. Sepúlveda, J.D. Quinn, V.L. Miller // mBio. – 2019. – Vol. 10, No. 2. – P. e00089-19.

174. Walker, K.A. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae* / K.A. Walker, V.L. Miller // Curr. Opin. Microbiol. – 2020. – Vol. 54. – P. 95–102.

175. Wang, J.H. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan / J.H. Wang, Y.C. Liu, S.S. Lee, M.Y. Yen, Y.S. Chen, J.H. Wang, S.R. Wann, H.H. Lin // Clin Infect Dis. – 1998. – Vol. 26. – P. 1434–1438.

176. Wang, T.C. Virulence among different types of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with multi-locus sequence type (MLST)-11, Serotype K1 or K2 strains / T.C. Wang, J.C. Lin, J.C. Chang, Y.W. Hiaso, C.H. Wang, S.K. Chiu, C.P. Fung, F.Y. Chang, L.K.Siu // Gut Pathog. – 2021. – Vol. 13, No. 1. – P. 40.

177. Wang, W. High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps *Tet(A)* and *Tet(A)-I* with two start codons / W. Wang, Q. Guo, X. Xu, Z.K. Sheng, X. Ye, M. Wang // J Med Microbiol. – 2014. – Vol. 63, No. 11. – P. 1454-1459.

178. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Электронный ресурс] / WHO bacterial priority pathogens list, 2024. URL: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (дата обр. 23.09.2024).

179. Wu, H. Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae* / H. Wu, D. Li, H. Zhou, Y. Sun, L. Guo, D. Shen // Microb. Pathog. – 2017. – Vol. 104. – P. 254–262.

180. Wyres, K.L. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data / K.L. Wyres, RR Wick, C. Gorrie, A. Jenney, R. Follador, N. Thompson, K.E. Holt // Microbial Genomics. – 2016. – Vol. 2, No. 12. – P. e000102.

181. Wyres, K.L. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* / K.L. Wyres, M.M.C. Lam, K.E. Holt // Nat. Rev. Microbiol. – 2020. – Vol. 18, No. 6. – P. 344–359.

182. Xu, L. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* / L. Xu, X. Sun, X. Ma // Ann Clin Microbiol Antimicrob. – 2017. – Vol. 16, No. 1. – P. 6-18.

183. Xu, M. High prevalence of KPC-2-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing meningitis in Eastern China / M. Xu, Y. Fu, Y. Fang, H. Xu,

H. Kong, Y. Liu, Y. Chen, L. Li // *Infect Drug Resist.* – 2019. – Vol.12. – P. 641-653.

184. Xu, Q. Efflux Pumps *AcrAB* and *OqxAB* contribute to nitrofurantoin resistance in an uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate / Q. Xu, J. Jiang, Z. Zhu, T. Xu, Z.K. Sheng, M. Ye, X. Xu, M. Wang // *Int J Antimicrob Agents.* – 2019. – Vol. 54, No. 2. – P. 223-227.

185. Yang, C.S. Endogenous *Klebsiella* endophthalmitis associated with pyogenic liver abscess / C.S. Yang, H.Y. Tsai, C.S. Sung, K.H. Lin, F.L. Lee, W.M. Hsu // *Ophthalmology.* – 2007. – Vol. 114, No 5. – P. 876–880.

186. Yang, Q. Emergence of ST11-K47 and ST11-K64 hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in bacterial liver abscesses from China: a molecular, biological, and epidemiological study / Q. Yang, X. Jia, M. Zhou, H. Zhang, W. Yang, T. Kudinha, Y. Xu // *Emerg Microbes Infect.* – 2020. – Vol. 9, No. 1. – 320-331.

187. Yu, W.L. Chuang 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. // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2008. – No. 62. – P. 1-6.

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

189. Zhu, J. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / J. Zhu, T. Wang, L. Chen, H. Du // *Front Microbiol.* – 2021. – Vol. 8, No. 12. – P. 642484.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Лихачев, И.В. Апробация отечественных тест-полосок, предназначенных для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам методом градиентной диффузии (Е-ТЕСТ) / И. В. Лихачев, Л.А. Краева, **А.А. Самойлова**, Е.В. Рогачева, Л.А. Кафтырева, С.А. Егорова, Н.В. Михайлов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 9. – С. 557-561. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-9-557-561>.

2. **Самойлова, А.А.** Апробация отечественного набора «МПК-МИКРО», предназначенного для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов методом серийных микроразведений / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева, В.Н. Вербов, Н.В. Михайлов, Е.В. Зуева // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 231-236.

3. Лихачев, И.В. Разработка Е-тестов для выявления потенцирующего эффекта антимикробных соединений в отношении полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* / И.В. Лихачев, Л.А. Кафтырева, **А.А. Самойлова**, Л.А. Краева, Н.В. Михайлов // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2024. – Т. 26, № 1. – С. 98-103. DOI: 10.36488/смас.2024.1.98-103

4. **Самойлова, А.А.** Геномный анализ вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, Н.В. Михайлов, А.Т. Сайтова, Д.Е. Полев, М.А. Вашукова, С.А. Гордеева, Е.В. Смирнова, Л.И. Белятич, А.С. Долгова, А.В. Шабалина // Инфекция и иммунитет. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 339–350. DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-GAO-15645>

5. **Самойлова, А.А.** Определение чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS / А.А. Самойлова, И.В. Лихачёв, Е.В. Зуева, Л.А. Краева, Е.В. Рогачёва, Н.В.

Михайлов // Бактериол. – 2020. – Т. 5, № 3. – С. 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-8-13.

6. **Самойлова, А.А.** Фенотипическая и генотипическая оценка резистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева, Н.В. Михайлов, С.А. Егорова, Е.А. Шилинг // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2022. – № 1. – С. 25-31. DOI: 10.14427/jirai.2022.1.25

7. **Самойлова, А.А.** Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, И.В. Лихачев, Н.В. Михайлов, Д.Д. Светлов // Бактериология. – 2024. – Т. 9, № 2. – С. 21–28. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-21-28.

8. **Самойлова, А.А.** Разработка отечественных наборов для определения чувствительности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным препаратам / А.А. Самойлова, И.В. Лихачев, Е.В. Рогачева // Материалы всероссийской научно-практической интернет-конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора с международным участием. – 2020. – С. 180-185.

9. Хайруллина, А.Р. Типы карбапенемаз изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильных стационарах г. Санкт-Петербург. Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы / А.Р. Хайруллина, **А.А. Самойлова**, К.А. Дмитриев, Л.А. Краева, Д.П. Гладин // Сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского; IV Всероссийской научно-практической конференции; VI Всероссийского симпозиума. – 2021. – С. 159.

10. Лихачев, И.В. Разработка Е-тестов с азидотимидином, *in vitro* потенцирующим эффект антимикробных препаратов в отношении штаммов *Klebsiella pneumoniae* // И.В. Лихачев, **А.А. Самойлова** // Тезисы XXIII

международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – 2021. – С. 27.

11. **Samoilova, A.A.** Development of E-tests with substances in vitro potentiate the effect of antimicrobial drugs for multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains / A.A. Samoilova, I.V. Likhachev, L.A. Kraeva, E.V. Rogacheva // ESCMID eLearning. – 2021. – P. 1153.

12. **Samoilova, A.A.** Phenotypical and genotypical assessment of resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemase / A.A. Samoilova, I.V. Likhachev, E.V. Rogacheva // International conference on Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 5. – № 2. – P. 2.

13. Светлов, Д.Д. Определение генетических детерминант гипервирулентности для штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Д.Д. Светлов, **А.А. Самойлова**, Е.Б. Аронова // Биотехнологии и безопасность в техносфере: сборник материалов II Национальной научной конференции студентов и молодых ученых. – 2022. – С. 85-88

14. **Самойлова, А.А.** Оценка чувствительности полирезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* к колистину / А.А. Самойлова, И.В. Лихачев // Тезисы XXIV международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии. – 2022. – С. 34.

15. Светлов, Д.Д. Разработка мультиплексной ПЦР для обнаружения генов вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Д.Д. Светлов, **А.А. Самойлова**, Н.В. Михайлов // Материалы Всероссийской ежегодной научно-практической конференции «Нерешенные вопросы этиотропной терапии актуальных инфекций». – 2022. – С.269-270.

16. **Самойлова, А.А.** Связь генетических детерминант и фенотипических характеристик гипервирулентности у клинических штаммов *K. pneumoniae* / А.А. Самойлова, Л.А. Краева, Д.Д. Светлов // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2023. – Т. 15. – № 1. – С. 85-86.

17. **Самойлова, А.А.** Оценка вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели / А.А. Самойлова, Д.Д. Светлов, И.В. Лихачев // Проблемы медицинской микологии. – 2024. – Т. 26, № 2. – С. 200.

18. Краева, Л.А. База данных генотипа и фенотипа вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19 / Л.А. Краева, **А.А. Самойлова**, Е.В. Рогачева // База данных. Свид. о рег. 2023621900, 07.06.2023. Заявка № 2023621578 от 29.05.2023.

19. Краева, Л.А. База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Л.А. Краева, **А.А. Самойлова**, Е.А. Богумильчик // База данных. Свид. о рег. 2023621899, 07.06.2023. Заявка № 2023621577 от 29.05.2023.

20. Краева, Л.А. База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* / Л.А. Краева, **А.А. Самойлова**, Светлов Д.Д. // База данных. Свид. о рег. 2023621898, 07.06.2023. Заявка № 2023621576 от 29.05.2023.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Свидетельство о регистрации базы данных «База данных генотипа и фенотипа вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



RU2023621900

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ

Номер регистрации (свидетельства): 2023621900 Дата регистрации: 07.06.2023 Номер и дата поступления заявки: 2023621578 29.05.2023 Дата публикации и номер бюллетеня: 07.06.2023 Бюл. № 6 Контактные реквизиты: Краева Людмила Александровна +7(904)6102154	Автор(ы): Краева Людмила Александровна (RU), Самойлова Анна Андреевна (RU), Рогачева Елизавета Владимировна (RU) Правообладатель(и): Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) (RU)
---	--

Название базы данных:

База данных генотипа и фенотипа вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных COVID-19

Реферат:

Назначение: глубокое генетическое изучение штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с разной тяжестью течения COVID-19 на предмет их вирулентности и антибиотикорезистентности, подтверждение полученных данных в фенотипических тестах. Область применения: лабораторная диагностика в бактериологии, персонализированная медицина, фармакология, эпидемиология, обучение бактериологов и врачей-инфекционистов. Функциональные возможности базы данных: позволяет изучать генетические детерминанты и фенотипические характеристики вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*, исследовать эпидемиологическое состояние, оценивать изменение генотипа и фенотипа в разных медицинских учреждениях с целью сравнительной характеристики изменчивости данного вида и прогнозирования возможности развития бактериальных осложнений при выявлении указанных бактерий. База данных содержит эпидемиологические данные, характеристику вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*, основанную на результатах полногеномного секвенирования, оценку чувствительности к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и рекомендациями EUCAST (версия 12.0). База данных состоит из характеристики вирулентных свойств и чувствительности к антибиотикам 22 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов с COVID-19 разной степени тяжести течения заболевания.

Вид и версия системы управления базой данных: Excel

Объем базы данных: 12,0 КБ

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Свидетельство о регистрации базы данных «База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



RU2023621899

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ

Номер регистрации (свидетельства): 2023621899 Дата регистрации: 07.06.2023 Номер и дата поступления заявки: 2023621577 29.05.2023 Дата публикации и номер бюллетеня: 07.06.2023 Бюл. № 6 Контактные реквизиты: Краева Людмила Александровна +7(904)6102154	Автор(ы): Краева Людмила Александровна (RU), Самойлова Анна Андреевна (RU), Богумильчик Елена Александровна (RU) Правообладатель(и): Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) (RU)
---	--

Название базы данных:

База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Реферат:

Назначение: изучение антибиотикочувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae* к известным антимикробным препаратам, анализ генотипических детерминант бактерий и установления причины выявленных фенотипических характеристик, оценка распространенности генов наиболее часто встречающихся карбапенемаз. Область применения: лабораторная диагностика в бактериологии, биотехнология, персонализированная медицина, фармакология, эпидемиология, ветеринария, обучение бактериологов и биологов. Функциональные возможности базы данных: позволяет изучать генетические детерминанты и фенотипические характеристики антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*, исследовать эпидемиологическое состояние, оценивать изменение генотипа и фенотипа в течение различных промежутков времени с целью сравнительной характеристики изменчивости данного вида. База данных содержит эпидемиологические данные, результаты оценки чувствительности к антимикробным препаратам диско-диффузионным методом и методом серийных микроразведений штаммов *K. pneumoniae* в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» и рекомендациями EUCAST (версия 12.0) и результаты выявления генов карбапенемаз молекулярно-генетическим методом с использованием коммерческих наборов. База данных состоит из характеристики чувствительности 85 штаммов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам, применяемым по отношению к данному виду, и характеристики наличия генов карбапенемаз.

Вид и версия системы управления базой данных: Excel

Объем базы данных: 20,0 КБ

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Свидетельство о регистрации базы данных «База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик вирулентности штаммов

Klebsiella pneumoniae»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



RU2023621898

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
**ГОСУДАРСТВЕННАЯ РЕГИСТРАЦИЯ БАЗЫ ДАННЫХ, ОХРАНЯЕМОЙ
АВТОРСКИМИ ПРАВАМИ**

<p>Номер регистрации (свидетельства): 2023621898 Дата регистрации: 07.06.2023 Номер и дата поступления заявки: 2023621576 29.05.2023 Дата публикации и номер бюллетеня: 07.06.2023 Бюл. № 6 Контактные реквизиты: Краева Людмила Александровна +7(904)6102154</p>	<p>Автор(ы): Краева Людмила Александровна (RU), Самойлова Анна Андреевна (RU), Светлов Даниил Дмитриевич (RU) Правообладатель(и): Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера) (RU)</p>
---	---

Название базы данных:
**База данных генетических детерминант и фенотипических характеристик вирулентности штаммов
Klebsiella pneumoniae**

Реферат:

База данных содержит эпидемиологические данные, результаты выявления генов вирулентности и результаты «стринг-теста» исследуемых штаммов *K. pneumoniae*. База данных состоит из характеристики наличия генов вирулентности 85 штаммов *K. pneumoniae* и фенотипических характеристик вирулентности. Назначение: изучение гипервирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, анализ генотипических детерминант бактерий и установления причины выявленных фенотипических характеристик. Область применения: лабораторная диагностика в бактериологии, биотехнология, персонализированная медицина, фармакология, эпидемиология, ветеринария, обучение бактериологов и биологов. Функциональные возможности базы данных: позволяет изучать генетические детерминанты и фенотипические характеристики вирулентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, исследовать эпидемиологическое состояние, оценивать изменение генотипа и фенотипа в течение различных промежутков времени с целью сравнительной характеристики изменчивости данного вида.

Вид и версия системы управления базой данных: Excel

Объем базы данных: 20,0 КБ

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Исследуемые гены, последовательности олигонуклеотидов и условия отжига праймеров

Ген	Праймер	Последовательность олигонуклеотидов (5'-3')	Размер, п.н.	Условия отжига	Источник
1	2	3	4	5	6
<i>uni-rmpA</i>	forward	CAGTТААСТGGRCTACCTCTG	250	Температура 60°, 30 сек	[66]
	reverse	CATAGATGTCATAATCACACCTCT			
<i>prmpA</i>	forward	GAGTAGTTAATAAATCAATAGCA	332	Температура 60°, 30 сек	[66]
	reverse	CAGTAGGCATTGCAGCACTGC			
<i>prmpA2</i>	forward	GTGCAATAAGGATGTTACAT	455	Температура 60°, 30 сек	[66]
	reverse	GGATGCCCTCCCTCCTGGAG			
<i>crmpA</i>	forward	GTAATAGAGATATAAATATCATATTGA	588	Температура 50°, 30 сек	[66]
	reverse	CATCTTTTCATCAACCATTTC			
<i>peg-344</i>	forward	AAAGGACAGAAAGCCAGTG	411	Температура 53°, 30 сек	[68]
	reverse	CAATGACGAGGGGGATAATC			
<i>iucA</i>	forward	GCATAGGCGGATACGAACAT	556	Температура 56°, 30 сек	[91]
	reverse	CACAGGGCAATTGCTTACCT			
<i>iroB</i>	forward	CAAAAAAGCAGCAGAGGC	585	Температура 59°, 50 сек	[68]
	reverse	TCACTGGCGGAATCCAACAC			

Продолжение Приложения Г

1	2	3	4	5	6
<i>terB</i>	forward	TATCGCTGTTGCCAGTGAC	288	Температура 59°, 30 сек	[68]
	reverse	CGGACAGCACTCTTCTCATC			
<i>peg-589</i>	forward	TGAACCCCTGAAGGTCTATC	236	Температура 55°, 30 сек	[68]
	reverse	GTGATGAATAAACTACTGCGG C			
<i>entB</i>	forward	GTCAACTGGGCCTTTGAGCCG TC	400	Температура 60°, 30 сек	[19]
	reverse	TATGGGCGTAAACGCCGGTG AT			
<i>irp2</i>	forward	GCTACAATGGGACAGCAACG AC	230	Температура 59°, 30 сек	[68]
	reverse	GCAGAGCGATACGGAAAATG C			
<i>iutA</i>	forward	GGGAAAGGCTTCTCTGCCAT	920	Температура 60°, 45 сек	[19]
	reverse	TTATTCGCCACCACGCTCTT			