

*На правах рукописи*

Самойлова Анна Андреевна

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

1.5.11. Микробиология

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2025

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в лаборатории медицинской бактериологии.

**Научный руководитель: Краева Людмила Александровна**, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова».

**Официальные оппоненты:**

**Царев Виктор Николаевич**, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Жуховицкий Владимир Григорьевич**, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Ростовский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «23» апреля 2025г в 16.00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.010 в ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства образования Российской Федерации по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (117198, г.Москва, ул. Миклухо-Макляя, д.6)

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах  
<https://www.rudn.ru/science/dissovet>  
<http://vak.minobrnauki.gov.ru>

Автореферат разослан «   » \_\_\_\_\_ 2025 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета ПДС 0300.010  
кандидат медицинских наук, доцент

Подопригора Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

*Klebsiella pneumoniae* является одной из наиболее частых причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) (Сухорукова М.В. и др., 2019), входит в группу «ESKAPE» - возбудителей — микроорганизмов, связанных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих серьезную проблему для здравоохранения (Boucher H.W. et al., 2009). В опубликованном в 2024 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) «Списке приоритетных глобальных патогенов» штаммы *K. pneumoniae* отнесены в группу возбудителей с «критическим уровнем приоритетности» (WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024).

В настоящее время штаммы *K. pneumoniae* представлены двумя патотипами: классическим и гипервирулентным (Lee C-R. et al., 2017). 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 (Paczosa M.K. et al., 2016).

Для сКр штаммов характерны множественная, экстремальная устойчивость и панрезистентность, обусловленные наличием генов  $\beta$ -лактамаз (TEM-, OXA-48-, NDM- CTXM-, и KPC-типов), интегронов и других генетических детерминант (Paczosa M.K. et al., 2016; Shaikh S. et al., 2015). 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* (Kuzmenkov A.Yu. et al., 2017).

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* (hvКр, hypervirulent *K. pneumoniae*) вызывают инвазивные внебольничные инфекции с частотой смертности от 3 % до 55 % (Kong H. et al., 2017; Shon A.S. et al., 2013). Штаммы hvКр вызывают пневмонию, бактериемию, абсцесс печени, а также могут метастазировать в другие органы, в центральную нервную систему (Shon A.S. et al., 2013). Публикации последних 5 лет указывают на возрастание частоты выделения множественно-резистентных hvКр (Choby J.E. et al., 2020; Gu D. et al., 2018). Заболевания, вызываемые подобными патогенами, наиболее опасны и трудно поддаются лечению. Это свидетельствует о необходимости разработки комплексного диагностического теста для определения hvКр штаммов в микробиологических лабораториях.

После регистрации первых случаев инвазивных инфекций, вызванных hvКр 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* (Catalan-Najera J.C. et al., 2017). 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 (Сухорукова М.В. и др., 2019).

Серьезную угрозу представляет появление штаммов клебсиелл с конвергенцией множественной резистентности и гипервирулентности. При сочетании резистентности к антимикробным препаратам (АМП) и вирулентности в hvKp, такие штаммы могут вызывать трудно поддающиеся лечению инфекции (European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries, 2021).

Первые случаи множественно-резистентных hvKp в России описаны в 2018 году в Москве - было обнаружено 19 изолятов, демонстрирующих уровень вирулентности на мышах  $LD_{50} \leq 10^4$  (Lev A.I. et al., 2018). Выявленные hvKp штаммы относились к клональной группе ST23 и обладали плазмидой, близкой к гипервирулентной плазмиде pLVPK (Chen Y.T. et al., 2004), а также две плазмиды, несущие гены приобретенной резистентности, в том числе OXA-48-карбапенемазу (Lev A.I. et al., 2018).

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 cKp 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 (Regueiro V. et al., 2006). 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 (Russo T.A. et al., 2018; Walker K.A. et al., 2020), что делает стринг-тест значимым диагностическим инструментом, но недостаточным для достоверной дифференцировки cKp 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 полуметальной 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) (Lazareva I. et al., 2020).

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 ( $\geq 30$  мкг/мл) (Russo T.A. et al., 2018).

Клиническая диагностика и идентификация гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* сложны и требуют молекулярного тестирования для надежной

идентификации данных штаммов (European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries).

#### **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 СТХ-М-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 полулетальной 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 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 *hν*Kp изолятах присутствовали гены *rmpA*, *rmpA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора аэробактерина (*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.).

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные из проб биологического материала от стационарных пациентов, 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 азробактина (*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.

#### **Апробация результатов исследования**

Материалы и результаты исследований были представлены на 9 международных и Всероссийских конференциях.

#### **Внедрение результатов исследования в практику**

- Создана рабочая коллекция штаммов *K. pneumoniae* ( $n = 285$ ), выделенных из проб биологического материала от стационарных пациентов в 2020-2022 гг.

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

- Разработана диагностическая микрочиповая панель для выявления генетических детерминант вирулентности штаммов *K. pneumoniae* на основе универсальной платформы для микрочиповой амплификации «АриаДНА».

#### **Степень достоверности результатов исследования**

Достоверность диссертационного исследования подтверждена использованием достаточного количества экспериментов, современных методов исследования, соответствующих поставленным задачам, воспроизводимостью результатов и применением методов статистического анализа.

#### **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.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена на базе Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера с 2020 по 2024 гг.

**Бактериальные штаммы.** 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 стационарных пациентов со следующей ведущей патологией: пневмониями, флегмонами и абсцессами различной локализации, синдромом полиорганной недостаточности, сепсисом в сочетании с артритами, синовитами, сахарным диабетом, ишемической болезнью сердца (ИБС) и др.

Для выполнения работы была разработана схема проведения исследования, которая представлена на рисунке 1.

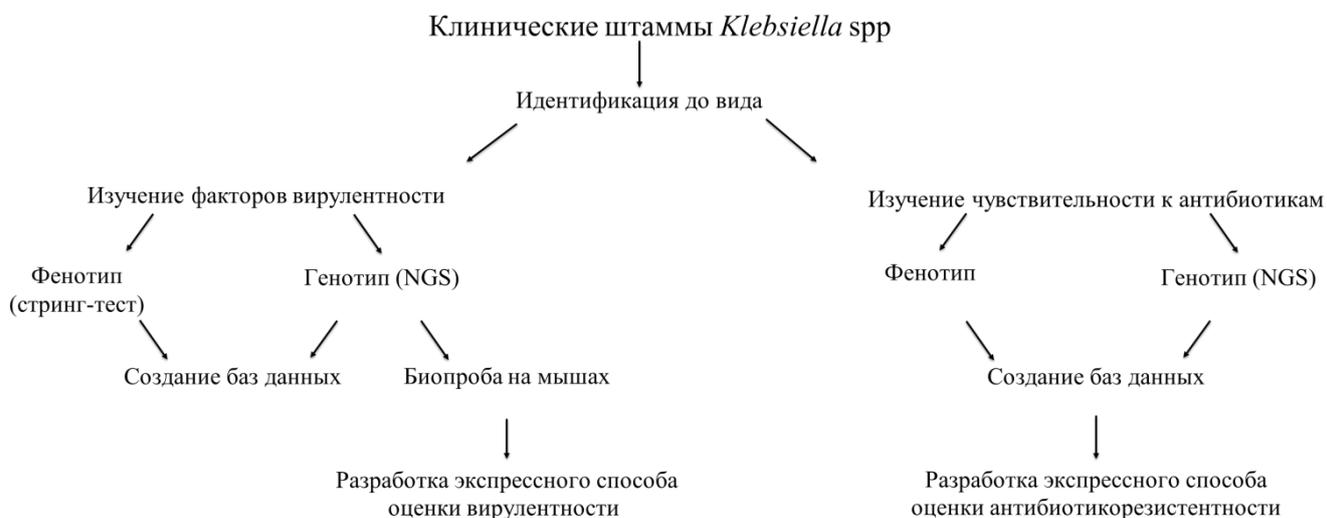


Рисунок 1 - Дизайн исследования

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  $\geq 2,0$ .

Определение чувствительности к АМП. Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* оценивали к 9 АМП, которые принадлежали к различным классам: ингибиторозащищенные пенициллины (ампициллин/сульбактам, амоксициллин/клавуланат), цефалоспорины III и IV поколения (цефтазидим, цефепим), карбапенемы (меропенем), хилолоны (ципрофлоксацин), сульфаниламиды (триметоприм/сульфаметоксазол), аминогликозиды (амикацин), полимиксины (колистин). Чувствительность к вышеперечисленным АМП (кроме колистина) оценивали при помощи диско-диффузионного метода (ДДМ) на агаре Muller-Hinton, оценку чувствительности к колистину проводили с использованием метода серийных разведений 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.

Секвенирование генома. Для секвенирования геномов штаммов *K. pneumoniae* отбирали по 500 нг бактериальной ДНК и фрагментировали на приборе Covaris M220. Секвенирование готовых библиотек ДНК осуществляли на приборе MiSeq с помощью набора MiSeq Reagent Kit v3. Чтение проводили с двух сторон по 300 п.н.

Биоинформатические методы. 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 ( $\beta$ -лактамазы, мутации и приобретенные гены) осуществляли с использованием программного обеспечения Kleborate. Определение К серотипов производили с использованием ПО Kaptive.

Биологические методы. В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали самок белых аутбредных мышей. На первом этапе работы мышам инфицировали дозой  $1 \times 10^6$  КОЕ/мл. В случае гибели животных в течение периода наблюдения исследуемые изоляты считали вирулентными для мышей и определяли полумлетальную дозу LD<sub>50</sub> на следующем этапе исследования: мышам вводили по 0,1 мл бактериальной культуры в дозах  $1 \times 10^2$  и  $1 \times 10^4$  КОЕ. Каждой дозой инфицировали трех мышей. Культура, использованная в группе выживших животных, оценивалась как авирулентная. 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.

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. Подбор праймеров осуществляли при помощи программы Oligo v.6. Специфичность праймеров проверяли с использованием алгоритма BLAST. Диагностические панели для оценки

вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* были апробированы на алюминиевых микрочипах, содержащих 30 микрореакторов объемом 1,2 мкл.

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 % ( $p < 0,05$ ). Связь между вирулентностью исследуемого штамма (подтвержденной биологическим методом) и наличием признака оценивали с использованием двух статистических критериев: - рангово-бисериального коэффициента корреляции и точного теста Фишера.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Фенотипическая и генотипическая характеристика антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae*

Определение чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к АМП продемонстрировало высокий уровень антибиотикорезистентности изучаемых изолятов. Чувствительность к АМП штаммов *K. pneumoniae* представлена на рисунке 2. 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.

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*).

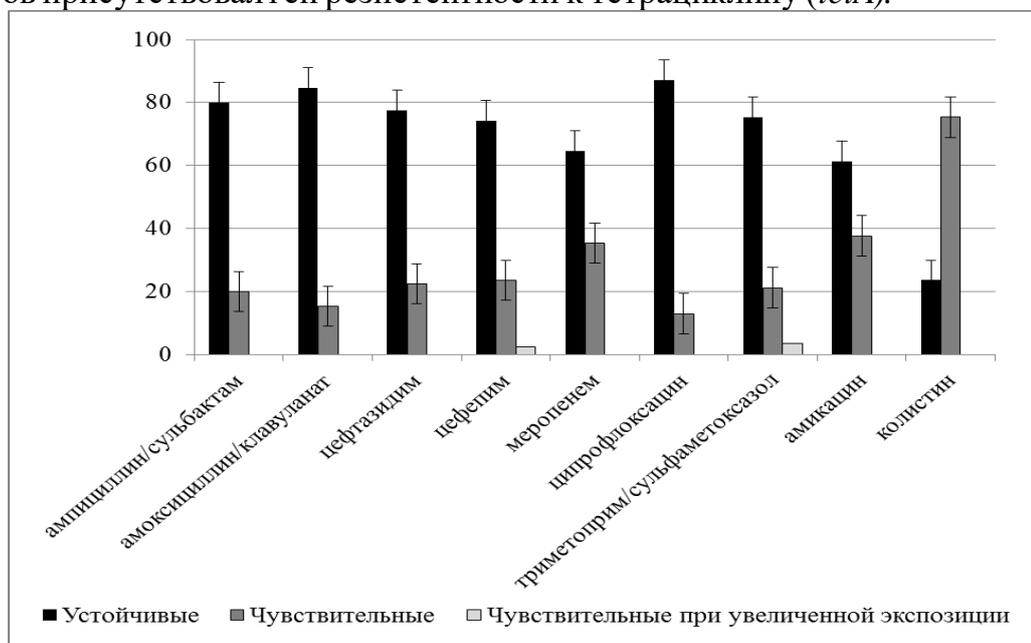


Рисунок 2 – Чувствительность к АМП штаммов *K. pneumoniae*

Наличие генов карбапенемаз выявлено у 60,2 % штаммов, а  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра действия (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  $\beta$ -лактамаз TEM-1D и OXA-1 были выявлены у 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 у 74,1 % изолятов. Усечения и точечные мутации в генах *OmpK35* и *OmpK36*, которые могут приводить к устойчивости к  $\beta$ -лактамам 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  $\beta$ -лактамаз и сохранения активности АМП последнего резерва, а также разработки новых комбинированных антибиотиков с ингибиторами БЛРС и карбапенемаз.

#### **Характеристика гипермукоидных свойств бактериальных штаммов**

Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* (n=285) по результатам теста на гипермукоидность было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом. Изоляты с гипермукоидным фенотипом были причиной следующих заболеваний: перитонита, флегмоны различной локализации, сепсиса, пневмонии.

#### **Генетические детерминанты вирулентности штаммов *K. pneumoniae***

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 hvKp штаммов приходилось: K20 – 2,4 %, K57 – 10,6 %, K64 – 2,4%. Остальные штаммы *K. pneumoniae* 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.

Охарактеризованные детерминанты вирулентности у *K. pneumoniae* включают локусы синтеза поликетидов *ybt* и *clb*, 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 у 68,2 % штаммов и был ассоциирован с одной плазмидой и 7 разнообразными интегративными мобильными элементами ICEKp. Следовательно, мобильные генетические элементы, несущие *clb* и *ybt*, свободно циркулируют в популяции *K. pneumoniae*, в том числе среди MDR штаммов.

В ходе исследования были идентифицированы локусы *iro* (14,1 %) и *iuc* (72,9 %), ассоциированные с плазмидой. Локус *iuc1* присутствовал совместно с локусом *iro1* в 13,3 % штаммов. Регулятор мукоидного фенотипа *rmp* связан с гипермукоидностью штаммов *K. pneumoniae* и считается одним из признаков вирулентности hvKp был обнаружен у 50,6 % штаммов.

#### Изучение вирулентных штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели

При оценке изолятов на модели инфицирования мышей было выявлено три группы штаммов в зависимости от величины полулетальной дозы: гипервирулентные ( $LD_{50} \leq 10^2$  КОЕ), вирулентные ( $LD_{50}$  от  $10^3$  до  $10^5$  КОЕ) и авирулентные (отсутствие летальности при  $10^6$  КОЕ). Результаты определения значений полулетальной дозы  $LD_{50}$  и характеристика исследованных штаммов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты определения значений  $LD_{50}$  и характеристика исследованных штаммов

Штамм	К-тип	ST-тип	Стринг-тест, мм	$LD_{50}$
172	K1	ST23	15	$0,22 \times 10^3$
64	K1	ST23	40	$0,46 \times 10^4$
844	K1	ST23	40	$0,22 \times 10^5$
894	K1	ST23	100	$0,22 \times 10^3$
880	K1	ST23	20	$1 \times 10^3$
184	K1	ST23	120	$0,46 \times 10^4$
138	K2	ST380	50	-
1	K2	ST65	17	$0,46 \times 10^2$
2399	K2	ST395	0	$1 \times 10^5$
480	K2	ST86	0	$1 \times 10^1$
933	K2	ST395	30	$0,46 \times 10^2$
396	K2	ST395	10	$1 \times 10^1$
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	$0,46 \times 10^4$
67	K2	ST86-1LV	55	$0,46 \times 10^2$
766	K2	ST86	15	$1 \times 10^3$
830	K2	ST86	55	$1 \times 10^1$
962	K24	ST20	50	-
60	K45	ST874	0	-
336	KL107	ST512	10	-
988	KL107	ST512	20	-
913	K2	ST395	50	$1 \times 10^5$
778	K24	ST11	0	-
146	K2	ST395	20	-
506	K62	ST556	0	-

Примечание: «-» - штамм в максимальной дозе ( $1 \times 10^6$  КОЕ) не вызывал гибель животных

Гипервирулентные изоляты *K. pneumoniae* (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 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 hvKp изолятах присутствовали гены *rmpA*, *rmpA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора азробактина (*iucI*), и гены *peg-344* и *wzyK2*. Один штамм проявлял классический фенотип (отрицательный стринг-тест).

По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера, положительная достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих капсульных типов: K1 ( $p=0,0134$ ), K2 ( $p=0,0084$ ), K57 ( $p=0,0050$ ) и генов: *iucA* ( $p=0,0042$ ), *iroB* ( $p=0,0002$ ). Положительная достоверная связь между наличием фенотипического признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ( $p=0,0044$ ). Чувствительность стринг-теста для исследуемой группы штаммов составила 87,5 %, специфичность – 64,3 %. Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей, определенных на основании полногеномного секвенирования и вирулентностью штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности - *ybt1* ( $p=0,0135$ ), *clb2* ( $p=0,0134$ ), *iro1* ( $p=0,0002$ ) и плазмид - ICEKp3 ( $p=0,0050$ ), ICEKp10 ( $p=0,0273$ ).

По результатам статистического анализа на основании оценки рангово-бисериального коэффициента корреляции, достоверная положительная связь между наличием признака и степенью вирулентности штамма (значением  $LD_{50}$ ) была выявлена для: капсульных типов K1 ( $t = 2,281$ ), K2 ( $t = 2,281$ ), генов *iucA* ( $t = 2,625$ ), *iutA* ( $t = 3,685$ ), *iroB* ( $t = 3,224$ ), *rmpA* ( $t = 2,681$ ), *rmpA2* ( $t = 3,500$ ), *peg-344* ( $t = 3,685$ ), *terB* ( $t = 3,685$ ), *peg-589* ( $t = 3,893$ ) и плазмид ICEKp35 ( $t = 13,500$ ), ICEKp12 ( $t = 2,901$ ).

Для прогнозирования вирулентности штаммов на основе молекулярно-генетических признаков были рассмотрены капсульные типы K1 и K2. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2 составила 100%, а специфичность - 85,7 %.

По результатам статистической обработки полученных данных было обнаружено, что одиночные признаки обладают меньшей специфичностью и чувствительностью, чем совокупность признаков. Несмотря на то, что стринг-тест 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.

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

В результате исследования была разработана и апробирована диагностическая микрочиповая панель для выявления генетических детерминант вирулентности *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.

Преимущества микрочиповой технологии в ПЦР:

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

Разработанные микрочиповые панели для оценки степени вирулентности и резистентности штаммов *K. pneumoniae* позволяют дифференцировано подойти к оценке патогенного потенциала конкретного штамма и назначению адекватной антимикробной терапии.

#### **Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки вирулентности**

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*. Топология разработанного 48-луночного микрочипа для оценки вирулентности клебсиелл из клинического материала представлена в таблице 2.

Таблица 2

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

### Разработка диагностической микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности

Для лечения инфекций, обусловленных штаммами *K. pneumoniae*, наиболее часто используют  $\beta$ -лактамы антибиотики (БЛА) и фторхинолоны. Основной механизм устойчивости *K. pneumoniae* к  $\beta$ -лактамам АМП – это ферменты-гидролазы, получившие название  $\beta$ -лактамаз. Анализ информации о функции  $\beta$ -лактамаз позволяет сделать следующий вывод: обнаружение у выделенных изолятов генов  $\beta$ -лактамаз без определения их принадлежности к конкретной подгруппе не имеет смысла для клинической практики (Чеботарь И.В. и др., 2020).

В соответствии с этим для разработки микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности были выбраны гены  $\beta$ -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- $\beta$ -лактамазы NDM. Устойчивость к фторхинолонам может быть опосредована генами плазмидной устойчивости к хинолонам, включая *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* (Pasom W., 2013). Для диагностической микрочиповой панели был выбран ген *qnrS*. Топология разработанной 48-луночной микрочиповой панели для оценки антибиотикорезистентности штаммов *K. pneumoniae* из чистой культуры представлена в таблице 3.

Таблица 3

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.

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

### **Интерпретация результатов определения генетических детерминант вирулентности на микрочиповой панели**

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. По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера 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.

Разработанная 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 введенной в столбец “score” формуле, рассчитывается значение условного коэффициента, на основании которого исследуемый штамм расценивается как вирулентный или авирулентный. Пример заполненной модели для интерпретации результатов в Microsoft Excel представлен на рисунке 3.

№ 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 3 – Пример заполненной модели для интерпретации 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 «-».

### **ВЫВОДЫ**

1. Среди штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из проб биологического материала от стационарных пациентов, 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 cKp.

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 культы, панкреатитом, а также синовитом коленного сустава. Во всех hvKp изолятах присутствовали гены *rmpA*, *rmpA2*, ген, кодирующий синтез сидерофора азробактина *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*, *rmpA* и *rmpA2*, *peg-344*. Диагностическая микрочиповая панель на генетические детерминанты антибиотикорезистентности включает следующие гены: CTX-M, OXA-48, KPC, 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 совершенствования 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*.

#### **Аннотация диссертации**

**Самойловой Анны Андреевны**

#### **«Биологические основы идентификации вирулентных и резистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*»**

*Klebsiella pneumoniae* является одной из наиболее частых причин инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). В опубликованном в 2024 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) «Списке приоритетных глобальных патогенов» штаммы *K. pneumoniae* отнесены в группу возбудителей с «критическим уровнем приоритетности».

Серьезную угрозу представляет появление штаммов клебсиелл с конвергенцией множественной резистентности и гипервирулентности. При сочетании резистентности к антимикробным препаратам (АМП) и вирулентности в *hνKp*, такие штаммы могут вызывать трудно поддающиеся лечению инфекции.

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

В результате определения чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к АМП выявлен высокий уровень антибиотикорезистентности изучаемых изолятов: 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. По результатам полногеномного секвенирования наличие генов карбапенемаз выявлено у 60,2 % штаммов, а β-лактамаз расширенного спектра действия (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.

Среди исследованных изолятов *K. pneumoniae* (n=285) по результатам теста на гипермукоидность было выявлено 67,1 % штаммов с классическим фенотипом и 32,9 % штаммов с гипермукоидным фенотипом. 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.

По результатам полногеномного секвенирования локусы синтеза поликетидов *ybt* и *clb* были характерны для 68,2 % и 10,6 % изолятов соответственно, а ассоциированные с плазмидой вирулентности локусы *iuc* и *iro* для 72,9 % и 14,1 %. Регулятор мукоидного фенотипа *rmp* был обнаружен у 50,6 % штаммов.

При оценке изолятов на модели инфицирования белых аутбредных мышей было выявлено три группы штаммов в зависимости от величины полулетальной дозы: гипервирулентные ( $LD_{50} \leq 10^2$  КОЕ), вирулентные ( $LD_{50}$  от  $10^3$  до  $10^5$  КОЕ) и авирулентные (отсутствие летальности при  $10^6$  КОЕ). Вирулентность была подтверждена высевом исследуемого микроорганизма из паренхиматозных органов и крови погибших животных, а также по результатам патоморфологического исследования.

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.

### Summary

#### of the dissertation « Biological bases for identification of virulent and resistant *Klebsiella pneumoniae* strains»

*Klebsiella pneumoniae* is one of the most common causes of healthcare-associated infections (HAI). In the "List of Priority Global Pathogens" published in 2024 by the World Health Organization (WHO), *K. pneumoniae* strains are classified as pathogens with a "critical priority level".

The emergence of *Klebsiella spp.* strains with convergence of multiple resistance and hypervirulence poses a serious threat. When combined with antimicrobial resistance and virulence in hvKp, such strains can cause difficult-to-treat infections.

The aim of the study: to develop a rapid method for assessing the virulence and antibiotic resistance of clinical *K. pneumoniae* strains based on the study of genetic determinants and phenotypic characteristics of bacteria.

As a result of determining the susceptibility of *K. pneumoniae* strains to antibiotics, a high level of antibiotic resistance was revealed in the studied isolates: 84.7% of the isolates had multidrug resistance (MDR). Resistance to carbapenems was demonstrated by 64.7% of isolates, and to colistin - 23.5%. 8.2% of the strains were susceptible to all tested drugs. According to the results of whole genome sequencing, the presence of carbapenemase genes was detected in 60.2% of the strains, and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) - in 57.7%. The most common carbapenemases were the OXA-48 and NDM-1 genes, which were found in 18.8% and 17.6% of the strains, respectively. Among the ESBL genes, the CTX-M-15 gene was most frequently encountered (54.1%).

Among the studied *K. pneumoniae* isolates (n=285), the hypermucoid test revealed 67.1% of strains with a classical phenotype and 32.9% of strains with a hypermucoid phenotype. According to the results of MLST typing, 18 different ST types were found for

85 studied strains. The study identified ST types characteristic of hvKp: ST23 (18.8%), ST307 (7.0%), ST86 (5.9%), ST11 (1.2%), ST65 (1.2%). The remaining *K. pneumoniae* strains belonged to ST types that are associated with cKp.

According to the results of whole-genome sequencing, the polyketide synthesis loci *ybt* and *clb* were characteristic of 68.2% and 10.6% of isolates, respectively, and the virulence plasmid-associated loci *iuc* and *iro* were found in 72.9% and 14.1%. The mucoid phenotype regulator *rmp* was detected in 50.6% of strains.

When evaluating isolates on the infection model of white outbred mice, three groups of strains were identified depending on the lethal dose: hypervirulent ( $LD_{50} \leq 10^2$  CFU), virulent ( $LD_{50}$  from  $10^3$  to  $10^5$  CFU) and avirulent (no lethality at  $10^6$  CFU). Virulence was confirmed by identification of *K. pneumoniae* strains from parenchymatous organs and blood of dead animals, as well as by the results of pathomorphological examination.

Diagnostic microarray panel was developed and tested to identify genetic determinants of virulence of *K. pneumoniae* strains, and the topology of a diagnostic microarray panel for genetic determinants of resistance to antibiotics was developed based on the universal platform for microarray amplification "AriaDNA". The developed diagnostic microarray panels allow for comprehensive express diagnostics reflecting the presence of genetic determinants of virulence or resistance to antibiotics in a clinical sample or isolated strain of *K. pneumoniae*.

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

cKp – классические штаммы *K. pneumoniae*

hvKp – гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*

K, KL – капсульный тип

$LD_{50}$  – полуметалетальная доза

MDR – множественная устойчивость

pLVPK - большая плазида *K. pneumoniae*, ассоциированная с вирулентностью

ST – сиквенс-тип

WHO – world health organization

АМП – Антимикробный препарат

БЛА –  $\beta$ -лактамы антибиотики

БЛРС –  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДДМ - диско-диффузионный метод

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБС – ишемическая болезнь сердца

КОЕ – колониеобразующая единица

МАКМАХ – Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

ПЦР — полимеразная цепная реакция

#### 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 // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 231-236.

3. Лихачев, И.В. Разработка E-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 // Клини. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. – 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 E-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.