


Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске

А.В. Бардашева¹, Н.В. Фоменко², Т.В. Калымбетова², И.В. Бабкин¹, С.О. Кретьен³, Е.В. Жираковская¹,
Н.В. Тикунова¹, В.В. Морозова¹ 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² АО «Вектор-Бест», Новосибирск, Россия

³ Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия


 morozova@niboch.nsc.ru

Аннотация. Проанализированы 72 клинических штамма *Klebsiella* spp., изолированных в Новосибирске из образцов, полученных от людей. Проведена видовая идентификация штаммов по последовательностям генов 16S рРНК и *rpoB*. Показано, что в популяции клебсиелл доминировали штаммы *Klebsiella pneumoniae* (57 штаммов), остальные 15 штаммов относились к видам *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования с использованием последовательности гена *wzi* штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к двадцати одному К-серотипу, при этом большую долю составляли вирулентные серотипы K1 и K2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae*, полученные от госпитализированных пациентов, обладали максимальной выраженной резистентностью к различным классам антибиотиков в отличие от остальных видов клебсиелл. Методом ПЦР в реальном времени обнаружено, что в исследованной популяции присутствуют гены семейств *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и ген *bla_{OXA-48}*, являющиеся генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам. Показано, что присутствие последовательности *bla_{CTX}* коррелирует с продукцией штаммом бета-лактамаз расширенного спектра, а фенотипическая устойчивость к карбапенемам обусловлена наличием гена *bla_{OXA-48}*. При этом генов карбапенемаз *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* обнаружено не было. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были найдены гены *aph(6)-IId* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Устойчивость к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxV*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях, при этом наличие только генов *oqxA* и/или *oqxV* не коррелировало с устойчивостью к фторхинолонам. Таким образом, обнаружение *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}* может быть использовано для быстрого выявления продукции бета-лактамаз расширенного спектра и определения резистентности клебсиелл к карбапенемам, а выявление генов *aac(6)-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS* – для быстрого определения устойчивости к фторхинолонам.

Ключевые слова: *Klebsiella*; молекулярное серотипирование; бета-лактамы; фторхинолоны; аминогликозиды; бета-лактамазы расширенного спектра; металло-бета-лактамазы; диско-диффузионный анализ; генетические детерминанты антибиотикорезистентности.

Для цитирования: Бардашева А.В., Фоменко Н.В., Калымбетова Т.В., Бабкин И.В., Кретьен С.О., Жираковская Е.В., Тикунова Н.В., Морозова В.В. Генетическая характеристика клинических изолятов клебсиелл, циркулирующих в Новосибирске. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-o


Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk

A.V. Bardasheva¹, N.V. Fomenko², T.V. Kalymbetova², I.V. Babkin¹, S.O. Chretien³, E.V. Zhirakovskaya¹,
N.V. Tikunova¹, V.V. Morozova¹ 

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² JSC "Vector-Best", Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after Ya.L. Tsivyan of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

 morozova@niboch.nsc.ru

Abstract. 72 clinical strains of *Klebsiella* spp. isolated from samples obtained from humans in Novosibirsk, Russia, were analyzed. Species identification of strains was performed using 16S rRNA and *rpoB* gene sequences. It was revealed that *Klebsiella pneumoniae* strains were dominant in the population (57 strains), while the remaining 15 strains were *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* and *K. quasipneumoniae*. By molecular serotyping using the *wzi* gene sequence, *K. pneumoniae* strains were assigned to twenty-one K-serotypes with a high proportion of virulent K1- and K2-serotypes. It was found that *K. pneumoniae* strains isolated from the hospitalized patients had a higher resistance to antibiotics compared to the other *Klebsiella* species. Real-time PCR revealed that the population contained genes of the *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* families and the *bla_{OXA-48}* gene, which are the genetic determinants of beta-lactam resistance. It has been shown that the presence of the *bla_{CTX}* sequence correlated with the production of extended-spectrum beta-lactamases, and phenotypic resistance to car-

bapenems is due to the presence of the *bla*_{OXA-48} gene. At the same time, the carbapenemase genes *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* were not detected. Among the aminoglycoside resistance genes studied, the *aph*(6)-*Id* and *aadA* genes were found, but their presence did not always coincide with phenotypic resistance. Resistance to fluoroquinolones in the vast majority of strains was accompanied by the presence of the *aac*(6')-*Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB*, and *qnrS* genes in various combinations, while the presence of the *oqxA* and/or *oqxB* genes alone did not correlate with resistance to fluoroquinolones. Thus, the detection of *bla*_{CTX} and *bla*_{OXA-48} can be used to quickly predict the production of extended-spectrum beta-lactamases and to determine the resistance of *Klebsiella* to carbapenems. The detection of the *aac*(6')-*Ib-cr* and/or *qnrB/qnrS* genes can be used to quickly determine resistance to fluoroquinolones.

Key words: *Klebsiella*; molecular serotyping; beta-lactam; fluoroquinolone; aminoglycoside; extended-spectrum beta-lactamases; metallo-beta-lactamases; disco-diffusion analysis; genetic determinants of antibiotic resistance.

For citation: Bardasheva A.V., Fomenko N.V., Kalymbetova T.V., Babkin I.V., Chretien S.O., Zhirakovskaya E.V., Tikunova N.V., Morozova V.V. Genetic characterization of clinical *Klebsiella* isolates circulating in Novosibirsk. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;25(2):234-245. DOI 10.18699/VJ21.49-o (in Russian)

Введение

Клебсиеллы представляют собой род грамотрицательных инкапсулированных неподвижных бактерий, относящихся к семейству Enterobacteriaceae порядка Enterobacteriales. Род насчитывает более 12 видов, из которых чаще всего встречаются *Klebsiella pneumoniae* и *K. oxytoca*. Клебсиеллы являются частью нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта, кожных покровов и верхних дыхательных путей здоровых людей (Broberg et al., 2014). В то же время они служат одной из наиболее распространенных причин как нозокомиальных, так и внебольничных инфекций, включая инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, пневмонию, неонатальный абсцесс и гнойный абсцесс печени (Podschun, Ullmann, 1998; Mukherjee et al., 2020).

Для лечения пациентов с клебсиелльными инфекциями используют бета-лактамы антибиотиков, фторхинолоны и аминогликозиды (Galal et al., 2019). При этом основными в терапии являются бета-лактамы, которые блокируют синтез клеточной стенки бактерий и наименее токсичны для человека. Применение данного класса антибиотиков ограничено способностью многих штаммов клебсиелл продуцировать бета-лактамазы, расщепляющие бета-лактамы антибиотиков (Козлова и др., 2018). Традиционно существуют две классификации бета-лактамаз – функциональная и структурная. Первая основана на их способности расщеплять различные классы бета-лактамов и на чувствительности к ингибиторам, таким как клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам (функциональные группы 1, 2 и 3). Вторая классификация (структурная) распределяет лактамазы по молекулярным классам А, В, С и D соответственно сходству и различиям их белковых последовательностей (Bush, Jacoby, 2010). Серьезную проблему с практической точки зрения представляют бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), относящиеся ко второй функциональной группе. Они характеризуются способностью расщеплять различные классы бета-лактамов, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы. К БЛРС относятся ферменты семейств TEM, SHV, CTX-M, OXA и др. (Ghargah et al., 2017; Galal et al., 2019). На сегодняшний день для каждого семейства бета-лактамаз известно большое количество аллельных вариантов, обеспечивающих устойчивость к третьему поколению цефалоспоринов, монобактамам и карбапенемам (Liakouroulos et al., 2016). Помимо функциональной и структурной классификации, ферменты,

гидролизующие бета-лактамы, разделяются на два типа по механизму действия: сериновые бета-лактамазы и металло-бета-лактамазы (МБЛ), требующие двухвалентных катионов, обычно цинка, в качестве кофакторов (Walsh et al., 2005). Известно около десяти семейств металло-бета-лактамаз, а именно: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM, KHM, NDM, TMB и др. Наиболее широко распространены лактамазы семейств IMP, VIM и NDM (Тапальский и др., 2012).

Для лечения инфекций, вызванных грамотрицательными бактериями, наряду с бета-лактамами антибиотиками используют аминогликозиды, которые способны связывать молекулы антибиотика с субъединицей 16S рРНК бактерии и ингибировать синтез белка. Самый распространенный механизм бактериальной резистентности к аминогликозидам – продукция аминогликозид-модифицирующих ферментов. Аминогликозид-модифицирующие ферменты представляют собой фосфотрансферазы (APH), ацетилтрансферазы (AAC) или нуклеотидилтрансферазы (ANT) (Ramirez, Tolmasky, 2010).

Еще одним используемым классом антибиотиков являются фторхинолоны, которые воздействуют на ДНК-гиразу и ДНК-топоизомеразу IV (Машковский, 2005). К основным механизмам резистентности грамотрицательных бактерий к данным антибиотикам относятся модификация антибиотика, например с использованием плазмид-кодируемой аминогликозидацетилтрансферазы AAC (6')-Ib-cr, защита мишени (семейство плазмидных генов *qnr*) и система эффлюкса, например OqxAB-ToIC RND, гены которой находятся в хромосоме большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015).

В последние годы заметной проблемой стал рост резистентности клебсиелльных штаммов, в особенности внутрибольничных изолятов, ко всем клинически значимым антибиотикам. Именно резистентность делает клебсиелл лидерами среди оппортунистических патогенов (Чеботарь и др., 2020). Цель нашего исследования – анализ генетических и фенотипических маркеров резистентности, включая бета-лактамы, фторхинолоны и аминогликозиды, клинических изолятов клебсиелл, выделенных в г. Новосибирске (Россия).

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе исследовали 72 штамма бактерий рода *Klebsiella*, выделенных в Новосибирске

из клинических образцов. Чистые культуры бактерий получали, как описано ранее (Козлова и др., 2017); принадлежность к роду *Klebsiella* определяли по культурально-морфологическим признакам с использованием селективных сред – агара МакКонки (BioMerieux, Франция) и агара Левина (OXOID, Великобритания). Штаммы депонировали в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур Института химической биологии и фундаментальной медицины (КЭМТК ИХБФМ) СО РАН (http://www.niboch.nsc.ru/doku.php/emtc_collection).

Идентификация бактериальных штаммов. Видовую принадлежность бактерий устанавливали секвенированием последовательностей гена 16S рРНК (1342 п.н.) (Козлова и др., 2017) и подтверждали секвенированием фрагмента гена *rpoB* (501 п.н.) (Morozova et al., 2019). Для определения вида использовали наиболее близкие референсные последовательности рода *Klebsiella*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), при уровне сходства последовательностей не менее 98 %. Последовательности генов 16S рРНК депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT436838–MT436841, MT436848, MT436849, MT436851–MT436856, MT439052–MT439054, MT439056–MT439058, MT439061–MT439079, MT439081–MT439103, MT439106, MT489341–MT489346. Последовательности генов *rpoB* депонировали в базу данных NCBI GenBank под номерами MT447755–MT447758, MT447760–447768, MT447770, MT447771, MT447773–MT447775, MT447778–MT447798, MT447825, MT447828–MT447830.

Молекулярное серотипирование штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*. Серотипирование коллекционных штаммов проводили путем секвенирования последовательностей гена *wzi*, относящегося к кластеру генов синтеза полисахаридной капсулы клебсиелл, как описано ранее (Brisse et al., 2013; Morozova et al., 2019). Для определения серотипа использовали наиболее близкие последовательности гена *wzi* референсных штаммов *K. pneumoniae*, присутствующие в базе данных NCBI GenBank. В ходе работы молекулярное серотипирование было проведено для 13 коллекционных штаммов *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae*. Последовательности генов *wzi* были депонированы в базу данных NCBI GenBank под номерами MT434694, MT447742–MT447754. Остальные коллекционные штаммы *K. pneumoniae* и *K. quasipneumoniae* были типированы ранее (Morozova et al., 2019).

Оценку гипермукоидности штаммов проводили, используя струнный тест (Lee H.C. et al., 2006). Для этого стандартной бактериологической петлей растягивали слизистый тяж из бактериальных колоний, выращенных на кровяном агаре с 5 % овечьей крови, при 37 °С в течение ночи. При формировании вязкой нити длиной >10 мм штаммы оценивались как гипермукоидные.

Определение фенотипической антибиотикорезистентности штаммов. Антибиотикорезистентность штаммов выявляли диско-диффузионным методом согласно рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST, <https://eucast.org>) с использованием агара Мюллера–Хинтона (OXOID, Великобритания). Иссле-

довали чувствительность штаммов к следующим антибиотикам (OXOID): амоксициллин/клавулановая кислота (AMP/CAL, 20/10 мкг); ампициллин/сульбактам (AMP/SUL, 10/10 мкг); пиперациллин/тазобактам (PIP/TZB, 30/10 мкг); цефтазидим (CAZ, 10 мкг); амикацин (AMK, 30 мкг); гентамицин (GEN, 10 мкг); левофлоксацин (LEV, 5 мкг); цiproфлоксацин (CIP, 5 мкг); имипенем (IPM, 10 мкг); меропенем (MEM, 10 мкг); хлорамфеникол (CLM, 30 мкг); азтреонам (ATM, 30 мкг). Штамм *E. coli* ATCC 25922, не обладающий резистентностью к антибиотикам, использовали в качестве контроля.

Фенотипическое определение БЛРС. Выявление БЛРС, резистентных к клавуланат-защищенным пенициллинам, проводили, как описано ранее (Hoa et al., 1998; Эйдельштейн, 2001). Штамм *K. pneumoniae* ATCC 700603, продуцирующий БЛРС, использовали в качестве положительного контроля.

Выявление продукции металло-бета-лактамаз. Продукцию МБЛ штаммами клебсиелл исследовали методом двойных дисков с использованием этилендиаминтетраацетата натрия (ЭДТА) по методу, описанному ранее (Lee K. et al., 2001; Yong et al., 2002; Иванов, Егоров, 2008). Увеличение на 8 мм зоны ингибирования роста вокруг диска, содержащего антибиотик и ЭДТА, по сравнению с исходным диском с антибиотиком, интерпретировали как положительный результат (Yong et al., 2002).

Выявление генов антибиотикорезистентности методом ПЦР в реальном времени. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл суспензии клеток *Klebsiella* spp. с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК-экспресс» (АО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Гены резистентности выявляли с использованием олигонуклеотидов, представленных в табл. 1. Также штаммы анализировали на наличие генов бета-лактамаз семейства OXA: *bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-58}*; генов устойчивости к карбапенемам семейств *kpc*, *vim*, *ndm*, *imp*; генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*; гена устойчивости к фторхинолонам *qnrA*. Перечисленные гены обнаружены не были, и последовательности соответствующих олигонуклеотидов не приводятся.

ПЦР в реальном времени осуществляли с использованием амплификатора с флуоресцентной детекцией CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Условия амплификации: прогрев при 94 °С – 1 мин, далее 50 циклов (94 °С – 10 с, 60 °С – 20 с).

Результаты

Видовая принадлежность, молекулярное серотипирование и выявление гипермукоидности

Из 1512 клинических образцов от пациентов с разными заболеваниями было выявлено 72 (4.8 %) образца, содержащих клебсиеллы. Из них 46 штаммов были выделены из образцов от амбулаторных больных, а 26 штаммов – от госпитализированных пациентов. В результате видовой идентификации с использованием генов 16S рРНК и *rpoB* среди штаммов от амбулаторных больных было выделено 34 штамма *K. pneumoniae* (74 %), 5 – *K. grimontii*, 4 – *K. aerogenes*, 2 – *K. oxytoca* и 1 – *K. quasipneumoniae*.

Table 1. Synthetic oligonucleotide primers for the detection of antibiotic resistance genes

Gene/gene family	Oligonucleotide	Sequence
<i>bla_{SHV}</i>	Fshv	CCTTTTTCGCGCCAGATC
	Rshv	CCTCATTTCAGTTCCGTT
	SHV	(ROX)ACAACGTCACCCGCTTGACCGCT-BHQ2
<i>bla_{TEM}</i>	TemF	TGTGGCGCGGTATTATCCCGT
	TemR	AGTACTCACCAGTCACAGAA
	TEM	(SIMA)GCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCA-BHQ1
<i>bla_{CTX}</i>	CTX	(SIMA)TGCCACCACCAACGATATCGCGGT-BHQ1
	CTX9	(SIMA)TGCCACCACCAATGATATTGCGGTGATCTGGC-BHQ1
	Fctx	AAGACCGGCAGCGGCGACTA
	Rctx1	GAACCAGCGGTGCGTGGTT
	Rctx2	GAACCAGCGGCGCACGACC
<i>bla_{OXA-48}</i>	OXA48	(ROX)ACAAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGG-BHQ2
	FOXA48	GCGCAGCCAGCGTATTGTCAA
	F1OXA48	GCGTAGTCAGCGCATCGTGAA
	ROXA48	TTAGCCCGAATAATATAGTC
<i>aph(6)-Id</i>	Aph6F	ATCAAAAACGCAGGTTGTCA
	Aph6R	GAGGCATTGCTCATCATTGA
	Aph6	(ROX)TGACTACGTCCACGCGCGATTATAG-BHQ2
<i>aadA</i>	Raad	AGCGACATCCTTCGGCGC
	Faad	GCTGGCGATGAGCGAAATGT
	aadA	(SIMA)ACCTTGTCTCGCATTTGGTACAGCG-BHQ2
<i>aac(6)-Ib-cr</i>	IbcrF	GACGTACAGGAACAGTACT
	IbcrR	CAATCGGCTCTCCATTCA
	Ibcr	(ROX)AGCGTTTTAGCGCAAGAGTCCGCTACT-BHQ2
<i>oqxB</i>	FOqxB	CTGTTTGGCTGGATTTTCC
	ROqxB	CAGGTACACCGCAAACAC
	OqxB	(SIMA)CCACGGCGTCCAAGCGTTTTGCCTACCA-BHQ1
	OqxB2	(SIMA)CCACGGCGTCCGAGGGTTTTGCTACCA-BHQ1
<i>oqxA</i>	OqxAF	CAAGAGCCAAAACGCAGG
	OqxAR	GGGAGACGAGGTTGGTAT
	OqxAZ	(ROX)CGCAAAGCGAGGCGAACCACCGA-BHQ2
<i>qnrB</i>	QnrBF	CTGTGGGAAAACCGTTGGA
	QnrBR	GTCAGATCGCAATGTGTGAA
	QnrBZ	(SIMA)CCAGGTACTGGGCGCGACGTTTTCAG-BHQ1
<i>qnrS</i>	QnrSF	CAATTTATGCCACGCCGAA
	QnrSR	GGCTGCAATTTTGATACCTGA
	QnrSZ	(ROX)TGATCGACTTTGCGGGGATCTAAACCG-BHQ2

Среди штаммов от госпитализированных пациентов было 23 штамма *K. pneumoniae* (88 %), 2 – *K. grimontii* и 1 – *K. aerogenes*.

Методом молекулярного серотипирования по последовательности гена *wzi* был выявлен 21 К-серотип (табл. 2). К наиболее вирулентным серотипам К1 и К2 принадлежали 15 штаммов от амбулаторных больных и 7 штаммов от госпитализированных пациентов. Из образцов, взятых от пациентов с диареей при поступлении в Инфекционную клиническую больницу № 1 г. Новосибирска, было

выявлено 4 штамма К47-серотипа. Еще 11 штаммов (серотипы К22/К30 и К17) были получены от пациентов клиники Новосибирского НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна (ННИИТО). К-серотип некоторых штаммов определить не удалось; можно было лишь заключить, что данный штамм относится к некой группе серотипов (см. табл. 2). По-видимому, для таких штаммов необходимо проводить серотипирование иммунологическими методами или секвенировать весь кластер генов синтеза полисахаридной капсулы (35 тыс. п. н.).

Table 2. *K. pneumoniae* and *K. quasipneumoniae* strains: serotypes and hypermucoviscosity

K serotype	Number of strains of the K serotype/ number of hypermucoviscous strains	
	Outpatients	Inpatients
K1	5/1	1/1
K1/KN2*	2/1	–
K2	8/1	6/2
K3/K31*	1/1	–
K5	1/1	–
K6/K64*, **	2	–
K9	1	–
K10	1	–
K17	–	4
K22/K30*	–	7/1
K24	–	1
K25	3/1	–
K34/K57*	–	2/1
K38	2	–
K43	1	–
K47	4	1
K62	1	–
K71	1	–
K80	1	–
K140	1	–
K13/K46/K61/K21*	–	1

Note. K serotypes were identified by molecular serotyping with the sequence of the *wzi* gene.

* The *wsi* sequence is insufficient for precise serotyping. ** One of the strains (KQ_1250) belonged to *K. quasipneumoniae*.

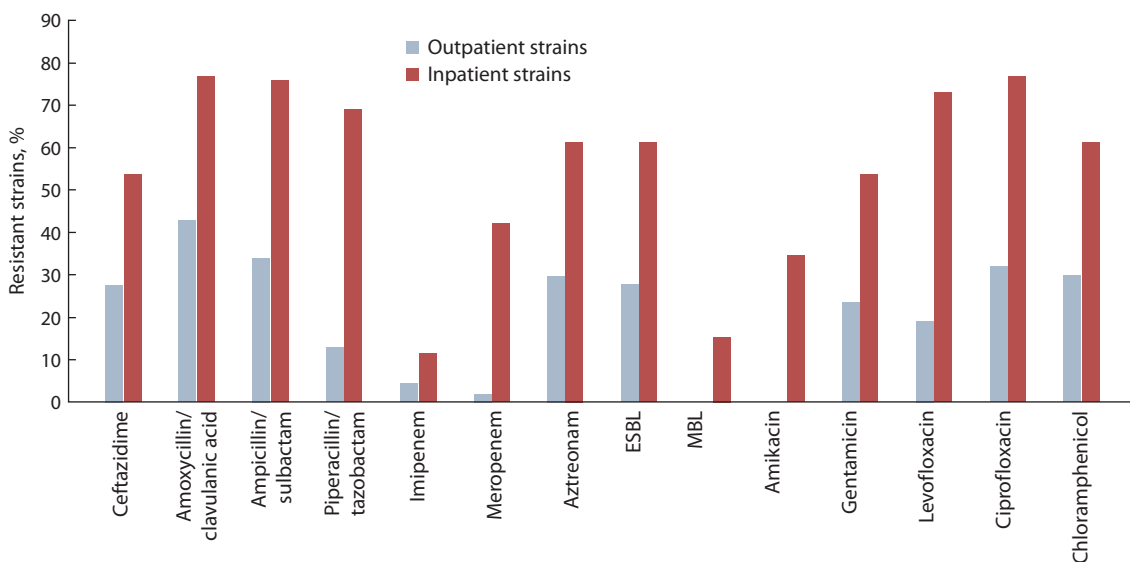
Количество гипермукоидных среди штаммов *K. pneumoniae* от амбулаторных и госпитализированных больных составило 13 и 19 % соответственно. Этот фактор патогенности присутствовал у штаммов, относившихся к разным К-серотипам (см. табл. 2).

Фенотипическая резистентность к антибиотикам

Среди штаммов от амбулаторных больных чаще выявлялась резистентность к ампициллин/клавуланату (более 40 % случаев), почти не встречалась резистентность к карбапенемам, БЛРС продуцировали 28 % штаммов. Штаммов, продуцирующих МБЛ, не выявлено. Среди штаммов от госпитализированных пациентов резистентность к разным классам антибиотиков оказалась выше (см. рисунок). Свыше 70 % штаммов были нечувствительны к защищенным пенициллинам, более 40 % проявляли резистентность к меропенему, 11.5 и 60 % штаммов являлись продуцентами МБЛ и БЛРС соответственно. Также среди штаммов от амбулаторных и госпитализированных пациентов было выявлено соответственно 21.7 и 54 % полнорезистентных штаммов, обладавших устойчивостью к четырем классам антибиотиков.

Генетические детерминанты резистентности штаммов от амбулаторных больных

Штаммы, чувствительные к использованным антибиотикам. В ходе исследования было показано, что 30 (65 %) штаммов *Klebsiella* spp., полученных от амбулаторных больных, чувствительны к использованным антибиотикам либо резистентны только к одному-двум из них (табл. 3). В то же время у большинства штаммов были обнаружены гены бета-лактамаз семейства *shv*, а также хромосомные гены *oqxA* и *oqxB* системы эффлюкса, которая должна способствовать выведению фторхинолонов из клетки. Наличие генов *oqxA* и *oqxB* у чувствительных штаммов согласуется с литературными данными, так как известно, что эти гены присутствуют у большинства штаммов *K. pneumoniae* (Yang et al., 2014; Hooper, Jacoby, 2015). Штамм КР_2634 содержал ген *aadA*, но был чув-



Phenotypic antibiotic resistance in clinical *Klebsiella* strains.

Table 3. Resistance genes found in outpatient strains sensitive to antibiotics tested

Strain designation (K serotype)	Strain origin	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_270 (K43) KG_1621 KG_2641 KG_3113 KG_3768 KG_3770	Feces (AEI), urine	–	–
KO_2335	Feces (AEI)	<i>oqxA</i>	–
KP_1967 (K38) KP_2686 (K47)	Skin lesions, feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i>	–
KP_2291 (K25) KP_2646 (K71) KP_2405 (K1)	Feces (AEI), nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i>	– –
KP_2634 (K62)	Urine	<i>bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>oqxA, oqxB</i>	– – –
KP_356 (K80)	Feces	–	CIP (I)
KA_2531 KA_2891	Feces (AEI), nasopharyngeal swab	–	AMP/CAL
KQ_1250 (K6/K64)	Vaginal smear	<i>oqxA, oqxB</i>	CIP
KO_2487	Feces (AEI)	– <i>oqxA</i>	CAZ (I) –
KP_2452 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i>	PIP/TZB (I)
KP_2505 (K5)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i>	PIP/TZB (I) –
KP_3647 (K1)	Throat swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	AMP/CAL –
KP_3729 (K2)	Nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	– CIP (I)
KP_3908 (K38)	Nasopharyngeal swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	PIP/TZB –
KP_2810 (K1)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i>	AMP/SUL, PIP/TZB (I) –
KA_2890	Nasopharyngeal swab	–	CAZ (I), AMP/CAL
KP_1751 (K140)	Feces (AEI)	–	PIP/TZB (I) CIP (I)
KP_3632 (K1) KP_3649 (K1/KN2)	Feces	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i> n. t.	– LEV (I), CIP CLM
KP_3646 (K1)	Throat swab	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i> n. t.	– LEV (I), CIP (I) CLM
KP_3425 (K10)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB, qnrS</i>	PIP/TZB (I) LEV (I), CIP

Note. Here and in Tables 4 and 5: KA – *K. aerogenes*, KG – *K. grimontii*, KO – *K. oxytoca*, KP – *K. pneumoniae*, KQ – *K. quasipneumoniae*; AEI, acute enteric infection; DFD, diabetic foot disease. Strain numbers correspond to numbers in the Collection of extremophilic microorganisms and type cultures, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk. Strains were tested for sensitivity to antibiotics: amoxicillin+clavulanic acid (AMP/CAL, 20/20 µg), ampicillin/sulbactam (AMP/SUL, 10/10 µg), piperacillin/tazobactam (PIP/TZB, 30/10 µg), ceftazidime (CAZ, 10 µg), amikacin (AMK, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), levofloxacin (LEV, 5 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), imipenem (IPM, 10 µg), meropenem (MEM, 10 µg), chloramphenicol (CLM, 30 µg), aztreonam (ATM, 30 µg); n.t. — not tested.

Table 4. Resistance genes found in outpatient strains resistant to antibiotics tested

Strain designation (K serotype)	Strain origin	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_3041 (K3/K31)	Discharge from a septic wound in DFD	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i>	AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB – –
KA_2420	Feces (AEI)	– – n. t.	AMP/CAL, PIP/TZB (I) IPM ATM, CLM
KP_2473 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{SHV}</i> – n. t.	CAZ (I), PIP/TZB (I) CIP (I) ATM (I)
KP_2685 (K47)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL – – ATM
KP_2827 (K25)	Vaginal smear	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n. t.	CAZ (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – CLM
KP_2826 (K9)	Vaginal smear	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>qnrB</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) AMK (I) – ATM
KP_2337 (K13/K64)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2548 (K2), KP_2576 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2574 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2728 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2946 (K2)	Urine	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_2786 (K25)	Vaginal smear	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM
KP_2554 (K2)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_2573 (K2)	Feces (AEI)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrS</i> n. t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM
KP_3597 (K1/KN2)	Feces	<i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>aac(6′)-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n. t.	IPM, MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV (I), CIP ATM, CLM

ствителен к аминогликозидам, тогда как резистентный к ципрофлоксацину штамм КР_3425 обладал, помимо генов *oqxA* и *oqxB*, плазмидным геном *qnrS* (см. табл. 3). По-видимому, присутствие одиночных генов резистентности в клетках клебсиелл не всегда коррелирует с проявлением фенотипической резистентности, наличие которой зависит от экспрессии этих генов или может быть опосредовано другими механизмами.

Штаммы, устойчивые к использованным антибиотикам. В эту группу были объединены штаммы, устойчивые к трем и более антибиотикам. При этом устойчивость к двум или более защищенным пенициллинам (AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB) сопровождалась наличием генов семейств *bla_{SHV}* и *bla_{TEM}* у всех штаммов, кроме КА_2420, КР_2826 и КР_2827. Присутствие гена семейства *bla_{CTX}* во всех случаях сопровождалось резистентностью к цефтазидиму (CAZ) и продукцией БЛРС. Резистентность к карбапенемам была выявлена в двух штаммах, из них КР_3597 содержал ген *bla_{OXA-48}*, а в штамме КА_2420 не обнаружено никаких генов резистентности из изучаемого спектра (табл. 4).

Резистентность к аминогликозидам (АМК и/или GEN) присутствовала у 11 штаммов, но только у четырех из них были найдены последовательности генов *aadA* и/или *aph6-Id*. Последовательность *aph6-Id* выявлялась и у штаммов, не обладавших резистентностью к аминогликозидам (см. табл. 4).

Полная (R) или промежуточная (I) резистентность к фторхинолонам (LEV и/или CIP) была выявлена у 11 штаммов; у 10 из них были найдены гены *aac(6′)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Надо отметить, что присутствие только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелирует с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3 и 4).

Генетические детерминанты резистентности штаммов от госпитализированных пациентов

Из 26 штаммов только пять не обладали множественной устойчивостью к антибиотикам, и 42 % штаммов были резистентны к карбапенемам (табл. 5). Как и в штаммах от амбулаторных больных, устойчивость к цефтазидиму и продукция БЛРС совпадали с присутствием гена семейства *bla_{CTX}*, а устойчивость к карбапенемам была связана с наличием гена *bla_{OXA-48}*. Ген *bla_{OXA-48}* также был ассоциирован с продукцией БЛРС у штаммов КР_3521, КР_3522, КР_3533, у которых *bla_{CTX}* не выявлялся. Генов карбапенемаз семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* не было обнаружено, хотя штаммы КР_3521, КР_3526 и КР_3533 обладали резистентностью к карбапенемам, подавляемой в присутствии ЭДТА (см. табл. 5). По-видимому, резистентность к карбапенемам обусловлена другими генетическими механизмами.

Шестнадцать штаммов от госпитализированных пациентов (61 %) были устойчивы к аминогликозидам (АМК и/или GEN), у 12 из них были выявлены гены *aadA* и/или *aph6-Id*. Устойчивость оставшихся 4 штаммов была обусловлена другими механизмами, так как у них не обнаружены исследуемые гены резистентности (см. табл. 5).

Резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была выявлена у 20 штаммов, у 18 из них найдены гены *aac(6′)-*

Ib-cr, *oqxA*, *oqxB* и *qnrS* в различных комбинациях. Так же, как и в популяции штаммов от амбулаторных больных, выявление только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелировало с наличием резистентности к фторхинолонам (см. табл. 3–5).

Обсуждение

В ходе исследования среди 72 клинических штаммов клебсиелл было выявлено 57 штаммов *K. pneumoniae*. Из 15 оставшихся штаммов семь были отнесены к *K. grimontii*, пять – к *K. aerogenes*, два – к *K. oxytoca* и один штамм – к *K. quasipneumoniae* (см. табл. 3–5). Четырнадцать из этих 15 штаммов показали чувствительность к большинству использованных антибиотиков. Исключением стал штамм *K. aerogenes* КА_2420, устойчивый к защищенным пенициллинам, имипенему, азтреонаму и хлорамфениколу (см. табл. 4). При этом ни у одного штамма, включая КА_2420, не выявлено исследуемых генов резистентности, кроме *oqxA*, *oqxB* у штаммов КО_2335, КО_2487 и КQ_1250. Возможно, генетические механизмы резистентности различны у штаммов клебсиелл, относящихся к разным видам.

Основную проблему для терапии представляют штаммы *K. pneumoniae*, поскольку именно они являются полирезистентными (см. табл. 5). Анализ 57 штаммов *K. pneumoniae* на наличие генов бета-лактамаз семейств *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и бета-лактамаз семейства OXA (*bla_{OXA-2}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-24}*, *bla_{OXA-48}* и *bla_{OXA-58}*) выявил гены первых трех семейств и ген *bla_{OXA-48}*. Ген *bla_{SHV}* присутствовал у 84 % амбулаторных штаммов *K. pneumoniae* со слабовыраженной резистентностью (табл. 3, 6) и у 100 % резистентных штаммов как от амбулаторных, так и от госпитализированных больных (см. табл. 4–6). Ген *bla_{TEM}* отсутствовал у чувствительных к антибиотикам штаммов от амбулаторных больных, но был обнаружен у 80 % резистентных штаммов от амбулаторных больных и лишь у 40 % штаммов от госпитализированных пациентов (см. табл. 4–6). Наличие *bla_{SHV}* и/или *bla_{TEM}* не всегда сочеталось с резистентностью к исследованным бета-лактамам, поэтому они не могут быть корректными маркерами резистентности, в отличие от *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}* (см. табл. 4 и 5), выявление которых может быть использовано для быстрого определения продукции БЛРС и резистентности к карбапенемам соответственно.

Согласно многоцентровому эпидемиологическому исследованию, проведенному в России в 2015–2016 гг., 75.6 % нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС, 26.5 % штаммов продуцировали карбапенемазы (OXA-48 – 21.5 %, NDM – 4.3, OXA-48 и NDM – 0.6, KPC – 0.1 %) (Сухорукова и др., 2019). В изученной нами выборке штаммов от госпитализированных пациентов доля штаммов-продуцентов БЛРС была похожей (65 %), но гораздо выше оказалась доля штаммов, устойчивых к карбапенемам и содержащих *bla_{OXA-48}* (56 %); при этом генов устойчивости к карбапенемам семейств *vim*, *ndm*, *kpc*, *imp* нами не выявлено.

Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам *aac3*, *aph6*, *ant2*, *ant6*, *aph(6)-Id*, *aadA* были обнаружены только последние два. Их присутствие не всегда коррелировало с фенотипической резистентностью

Table 5. Resistance genes in strains from inpatients

Strain designation (K serotype)	Strain origin*	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KG_1801	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	–	–
KP_1819 (K21/K13/K46/K61)	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	<i>bla_{SHV}</i>	–
KP_3442 (K47)	Pharyngeal swab from a patient under invasive ventilation (CCH)	<i>bla_{SHV}</i> <i>oqxA, oqxB</i>	–
KG_1838	Discharge from a septic wound in DFD (RCH)	–	PIP/TZB
KA_3530	Urine (RITO)	–	AMP/CAL
KP_2067 (K2)	Surgical wound punctate (RITO)	<i>bla_{SHV}</i> – n.t.	PIP/TZB (I) LEV, CIP CLM
KP_2071 (K2)	Synovial fluid (RITO)	<i>bla_{SHV}</i> – – n.t.	– GEN LEV, CIP CLM
KP_3772 (K2)	Blood cyst content (CNMT)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> n.t.	IPM (I), MEM (I), AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_3522 (K2)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> n.t.	MEM (I), ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB LEV, CIP CLM
KP_2894 (K1)	Wound discharge (RCH)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>oqxA</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB (I) – ATM
KP_3813 (K24)	Bioplate (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB, qnrS</i> n.t.	ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL – LEV (I), CIP ATM (I), CLM
KP_3519 (K34/K57)	Bioplate (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}</i> <i>aph6-Id, aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3520 (K34/K57)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{CTX}, bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrS</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3521 (K2)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> – <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> n.t.	IPM, MEM, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3533 (K2)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6′)-Ib-cr, oqxA, oqxB</i> n.t.	IPM, MEM, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I) LEV, CIP CLM
KP_3523 (K22/K30) KP_3524 (K22/K30) KP_3528 (K22/K30) KP_3531 (K22/K30) KP_3537 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aadA, aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB</i> n.t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3526 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX}, bla_{SHV}, bla_{TEM}</i> <i>aadA, aph6-Id</i> <i>oqxA, oqxB</i> n.t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, MBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM

End of Table 5

Strain designation (K serotype)	Strain origin*	Detected genes	Antibiotics to which the strain is resistant, (I) intermediate resistance
KP_3529 (K22/K30)	Urine (RITO)	<i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> <i>aadA</i> , <i>aph6-Id</i> <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM, CLM
KP_3835 (K17)	Wound discharge (RITO)	<i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	IPM (I), MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM
KP_3836 (K17)	Urine (RITO)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK (I), GEN LEV, CIP ATM
KP_3838 (K17)	Pure culture (RITO)	<i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> <i>aadA</i> <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	IPM, MEM, CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB AMK, GEN LEV, CIP ATM
KP_3839 (K17)	Wound discharge (RITO)	<i>bla_{CTX}</i> , <i>bla_{SHV}</i> – <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> n.t.	CAZ, ESBL, AMP/CAL, AMP/SUL, PIP/TZB GEN LEV, CIP ATM

* RCH, Railway Clinical Hospital, Novosibirsk-Glavnyy Railway Station; CCH, Central Clinical Hospital, Siberian Branch of the RAS; RITO, Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk; CNMT, Center for New Medicinal Technologies, Novosibirsk.

Table 6. Percentage of *K. pneumoniae* strains bearing resistance genes

Gene or gene family	Outpatient strains		Inpatient strains
	weakly resistant	resistant	
<i>bla_{SHV}</i>	84	100	100
<i>bla_{TEM}</i>	0	80	40
<i>bla_{CTX}</i>	0	80	65
<i>bla_{OXA-48}</i>	0	5	56
<i>oqxA</i>	68	93	83
<i>oqxB</i>	47	73	83
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	0	73	43
<i>qnrB</i>	0	20	0
<i>qnrS</i>	5	33	13
<i>aadA</i>	5	13	52
<i>aph6-Id</i>	0	40	39

(см. табл. 3–5), свидетельствуя о том, что резистентность к аминогликозидам может быть обусловлена и другими механизмами.

Из 22 штаммов *K. pneumoniae*, обладавших генами *aac(6')-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS*, резистентность к фторхинолонам (LEV и CIP) была определена у 20 (90 %) штаммов (см. табл. 3–5). Следует отметить, что ген *qnrB* обнаружен лишь в трех случаях (см. табл. 4 и 6) и, возможно, является малораспространенным в новосибирских штаммах. Тем не менее выявление *aac(6')-Ib-cr* и/или *qnrB/qnrS* хоро-

шо согласуется с наличием фенотипической резистентности и может быть использовано для быстрого предсказания устойчивости изолята к фторхинолонам.

Считается, что плазмидные гены резистентности к фторхинолонам семейства *qnr* часто ассоциированы с БЛРС-продуцирующими изолятами (Robicsek et al., 2006). В нашем исследовании такая ассоциация была выявлена среди штаммов, выделенных от амбулаторных больных, так как 10 из 12 штаммов-продуцентов БЛРС содержали гены *qnrB* и/или *qnrS* (см. табл. 4). В то же время толь-

ко 3 из 18 штаммов-продуцентов БЛРС, полученных от госпитализированных пациентов, содержали ген *qnrS*, при этом 17 из них были резистентны к фторхинолонам. Это свидетельствует о других возможных механизмах резистентности, таких как уменьшение проницаемости мембраны и сверхактивность эффлюксной помпы.

Заключение

Таким образом, среди клинических штаммов клебсиелл, выделенных у пациентов в г. Новосибирске, доминировали штаммы *K. pneumoniae*. Обнаружены также штаммы *K. grimontii*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca* и *K. quasipneumoniae*. Методом молекулярного серотипирования штаммы *K. pneumoniae* были отнесены к 21 К-серотипу; большинство среди них составляли вирулентные серотипы К1 и К2. Выявлено, что штаммы *K. pneumoniae* обладали наибольшей резистентностью к антибиотикам среди различных видов клебсиелл. Генетическими детерминантами резистентности к бета-лактамам в исследованной популяции являлись *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}* и *bla_{OXA-48}*. Показаны ассоциации между присутствием *bla_{CTX}*, *bla_{OXA-48}* и продукцией БЛРС и устойчивостью к карбапенемам соответственно. Среди исследованных генов устойчивости к аминогликозидам были обнаружены гены *aph(6)-Id* и *aadA*, однако их наличие не всегда совпадало с фенотипической резистентностью. Резистентность к фторхинолонам у большинства штаммов сопровождалась присутствием генов *aac(6)-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrB* и *qnrS* в различных комбинациях. Следует отметить, что присутствие одних только генов *oqxA* и/или *oqxB* не коррелировало с наличием устойчивости к фторхинолонам.

Список литературы / References

Иванов Д.В., Егоров А.М. Распространение и механизмы резистентности микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазы. Молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамам антибиотикам штаммов клебсиелл, выделенных при внутрибольничных инфекциях. *Биомед. химия*. 2008;54(1):104-113. [Ivanov D.V., Egorov A.M. Spreading and mechanisms of antimicrobial resistance in microorganisms, producing beta-lactamases. Molecular mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics of *Klebsiella* spp. strains, isolated in cases of nosocomial infections. *Biochem. (Moscow) Suppl. Ser. B*. 2008;2:311-317. DOI 10.1134/S1990750808030141.]

Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(1):79-84. DOI 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i Immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2018;8(1):79-84. (in Russian)]

Козлова Ю.Н., Фоменко Н.В., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунов А.Ю., Ганичев Д.А., Самохин А.Г., Павлов В.В., Рожнова О.М., Бондарь И.А., Зенкова Е.В., Нимаев В.В., Климонтов В.В., Тикунова Н.В. Идентификация стафилококков, включая метициллинрезистентные штаммы, биохимическими и генетическими методами. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2017;21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. [Kozlova Y.N., Fomenko N.V., Morozova V.V., Saranina I.V., Tikunov A.Yu., Ganichev D.A., Samokhin A.G., Pavlov V.V., Rozhnova O.M., Bondar' I.A., Zenkova E.V., Nimaev V.V., Klimontov V.V., Tikunova N.V. Genetic and biochemical characterization of staphy-

lococci occurring in Novosibirsk, Russia. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2017; 21(8):952-958. DOI 10.18699/VJ17.318. (in Russian)]

Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Новая Волна, 2005. [Mashkovsky M.D. Medicinal Preparations. Moscow: Novaya Volna Publ., 2005. (in Russian)]

Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Иванчик Н.В., Скленова Е.Ю., Шайдуллина Э.Р., Азизов И.С., Шек Е.А., Кузьменков А.Ю., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Семенова Н.В., ... Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х., Попов Д.А., Вострикова Т.Ю. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2): 147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. [Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Ivanchik N.V., Skleenova E.Yu., Shaidullina E.R., Azizov I.S., Shek E.A., Kuzmenkov A.Iu., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Semenova N.V., ... Zvonareva O.V., Kornilova P.A., Krianga V.G., Portniagina U.S., Shamaeva S.Kh., Popov D.A., Vostrikova T.Iu. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):147-159. DOI 10.36488/cmasc.2019.2.147-159. (in Russian)]

Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонков С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Мед. журн.* 2012;2(40):10-15. [Tapalsky D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditsynskiy Zhurnal = Medical Journal*. 2012;2(40):10-15. (in Russian)]

Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригра И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. [Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigrora I.V., Shagin D.A. The reasons why *Klebsiella pneumoniae* becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;22(1):4-19. DOI 10.36488/cmasc.2020.1.4-19. (in Russian)]

Эйдельштейн М.В. Выявление β-лактамаз расширенного спектра у грамотрицательных бактерий с помощью фенотипических методов. *Клин. микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2001;3(2):183-189. [Edelstein M.V. Detection of extended spectrum β-lactamases by phenotypic methods in gram-negative bacteria. *Klinicheskaâ Mikrobiologiâ i Antimikrobnââ Himioterapiâ = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;3(2):183-189. (in Russian)]

Brisse S., Passet V., Haugaard A.B., Babosan A., Kassis-Chikhani N., Struve C., Decré D. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *Klebsiella* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2013;51:4073-4078. DOI 10.1128/JCM.01924-13.

Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014;6:64. DOI 10.12703/P6-64.

Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54(3):969-976. DOI 10.1128/AAC.01009-09.

Galal L., Abdel Aziz N.A., Hassan W.M. Defining the relationship between phenotypic and genotypic resistance profiles of multidrug-resistant enterobacterial clinical isolates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2019; 1214:9-21. DOI 10.1007/5584_2018_208.

Gharrah M.M., El-Mahdy A.M., Barwa R.F. Association between virulence factors and extended spectrum beta-lactamase producing *Kleb-*

- siella pneumoniae* compared to nonproducing isolates. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2017;7279830. DOI 10.1155/2017/7279830.
- Hoa P.L., Chowa K.H., Yuena K.Y., Ngb W.S., Chaua P.Y. Comparison of a novel, inhibitor-potentiated disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998;42:49-54.
- Hooper D.C., Jacoby G.A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2015;1354(1):12-31. DOI 10.1111/nyas.12830.
- Lee H.C., Chuang Y.C., Yu W.L., Lee N.Y., Chang C.M., Ko N.Y., Wang L.R., Ko W.C. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. *J. Intern. Med.* 2006;259(6):606-614. DOI 10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x.
- Lee K., Chong Y., Shin H.B., Kim Y.A., Yong D., Yum J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* 2001;7:88-91.
- Liakopoulos A., Mevius D., Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β -lactamases: neglected yet ubiquitous. *Front. Microbiol.* 2016;5(7):1374. DOI 10.3389/fmicb.2016.01374.
- Morozova V.V., Babkin I.V., Kozlova Y.N., Baykov I.K., Bokovaya O.V., Tikunov A.Yu., Ushakova T.A., Bardasheva A.V., Ryabchikova E.I., Zelentsova E., Tikunova N.V. Isolation and characterization of a novel *Klebsiella pneumoniae* N4-like bacteriophage KP8. *Viruses.* 2019;11(12):1115. DOI 10.3390/v11121115.
- Mukherjee S., Naha S., Bhadury P., Saha B., Dutta M., Dutta S., Basu S. Emergence of OXA-232-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 causing neonatal sepsis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020;75(7):2004-2006. DOI 10.1093/jac/dkaa080.
- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998;11(4):589-603.
- Ramirez M.S., Tolmasky M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug. Resist. Updat.* 2010;13(6):151-171.
- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* 2006;6:629-640.
- Walsh T.R., Toleman M.A., Poirel L., Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.* 2005;18(2):306-325.
- Yang H.Y., Nam Y.S., Lee H.J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2014;25(3):163-169.
- Yong D., Lee K., Yum J.H., Shin H.B., Rossolini G.M., Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(10):3798-3801.

ORCID ID

A.V. Bardasheva orcid.org/0000-0002-3872-4122
I.V. Babkin orcid.org/0000-0001-7158-3774
E.V. Zhirakovskaya orcid.org/0000-0001-6787-8393
N.V. Tikunova orcid.org/0000-0002-1687-8278
V.V. Morozova orcid.org/0000-0002-0869-3476

Acknowledgements. The study was supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 18-29-08015, and State Budgeted Project 0245-2021-0008 for the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk. The strains tested were taken from the Collection of Extremophilic Microorganisms and Type Cultures, ICBFM.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received September 11, 2020. Revised November 30, 2020. Accepted December 8, 2020. Published online February 11, 2021.