

# Предварительные результаты исследования на основе полногеномного секвенирования резистентных штаммов *K. pneumoniae* в многопрофильном стационаре г. Барнаула

Русских А. А.<sup>1</sup>

*аспирант, кафедра эпидемиологии, микробиологии и вирусологии*

Лукьяненко Н. В.<sup>1</sup>

*д.м.н., профессор, кафедра эпидемиологии, микробиологии и вирусологии*

Руденко А. В.<sup>1</sup>

*заведующая учебной лабораторией, преподаватель*

Коломеец А. А.<sup>1</sup>

*проректор по развитию регионального здравоохранения*

Петрова А. А.<sup>2</sup>

*заведующая эпидемиологическим отделом*

Михайлова Ю. В.<sup>3</sup>

*к.б.н., заведующая, лаборатория молекулярных механизмов антибиотикорезистентности*

1 – ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Барнаул, Российская Федерация

2 – КГБУЗ «Краевая клиническая больница», г. Барнаул, Российская Федерация

3 – ФБУН «Центральный НИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

**Автор для корреспонденции:** Русских Артём Александрович; e-mail: Likvidator20110@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Введение.** *Klebsiella pneumoniae*, один из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций, входит в группу так называемых «ESKAPE»-патогенов – микроорганизмов, ассоциированных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих собой серьезную проблему для здравоохранения. *K. pneumoniae* распространена повсеместно и обладает выраженной способностью приобретать устойчивость к антимикробным препаратам (АМП). Неадекватная антибактериальная терапия у пациентов с нозокомиальными инфекциями ухудшает прогноз заболевания и увеличивает больничную летальность, поэтому назначение препаратов должно опираться на знание актуального профиля антибиотикорезистентности возбудителя в конкретном стационаре. Изучение генетического разнообразия *K. pneumoniae* позволит выявить основные механизмы устойчивости этого возбудителя и сформулировать рекомендации по рациональной антибиотикотерапии. **Цель исследования.** Полногеномный анализ резистентных изолятов *K. pneumoniae* в контексте эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с медицинской помощью (ИСМП) в многопрофильном стационаре. **Материалы и методы исследования.** В работе исследован 41 изолят бактерий рода *Klebsiella*, выделенных в многопрофильном стационаре г. Барнаула из клинических образцов. Полногеномное секвенирование проводилось с помощью NextSeq 2000 (Illumina). **Результаты исследования и их обсуждение.** Сравнительный анализ микробиологического фона в многопрофильном стационаре и стационаров России свидетельствовал о преобладании в общей структуре *K. pneumoniae*: 39,2% и 27,86%. В ходе полногеномного анализа резистентных штаммов *K. pneumoniae* были выявлены комбинации генов бета-лактамаз и генов, кодирующих

механизмы устойчивости к дезинфектантам. Обнаружены гены, ассоциированные с устойчивостью *Klebsiella pneumoniae* к перекиси водорода, были выявлены гены карбапенемаз группы OXA-48, гены бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M, а также металло- $\beta$ -лактамаз группы NDM среди исследованных культур. **Вывод.** Использование полногеномного секвенирования изолятов возбудителей ИСМП в клинической практике (на примере *Klebsiella pneumoniae*) определяет выбор антибактериальной терапии, применение дезинфектантов и антисептиков при организации профилактических и противоэпидемических мероприятий.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, полногеномное секвенирование

**doi:** 10.29234/2308-9113-2023-11-4-42-54

**Для цитирования:** Русских А. А., Лукьяненко Н. В., Руденко А. В., Коломеец А. А., Петрова А. А., Михайлова Ю. В. Предварительные результаты исследования на основе полногеномного секвенирования резистентных штаммов *K. pneumoniae* в многопрофильном стационаре г. Барнаула. *Медицина* 2023; 11(4): 42-54

## Введение

В этиологической структуре внутрибольничных инфекций лидирующая роль принадлежит грамотрицательным возбудителям и, в частности, *K. pneumoniae*, на долю которого приходится около 20% случаев данной нозологии. Чаще всего регистрируются инфекции кровотока, абдоминальные инфекции, пневмонии и инфекции, связанные с хирургическим вмешательством. [1,2]. Летальность у пациентов с инфекциями, вызванными карбапенем-резистентными штаммами *K. pneumoniae*, остается высокой и варьируется от 18 до 72%. На частоту летальных исходов оказывают влияние локализация инфекционного процесса, тяжесть состояния, коморбидный профиль пациента и длительность применения antimicrobных препаратов (АМП) [3]. Повышенное внимание исследователей к изучению клинических изолятов *K. pneumoniae* связано, в первую очередь, с биологическими свойствами данных микроорганизмов, в частности с их вирулентностью и высокой устойчивостью к широкому спектру antimicrobных препаратов [4,5,6]. Антибиотикорезистентность (АБР) клебсиелл, как правило, связана с наличием генетических детерминант, расположенных на мобильных элементах (плазмидах, транспозонах, интегронах, IS-элементах и т.д.) [6-8]. Массовое применение в качестве эмпирической терапии  $\beta$ -лактамов широкого спектра привело к селекции штаммов, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), а затем и штаммов, продуцирующих карбапенемазы. Локализация генов БЛРС и карбапенемаз на подвижных генетических элементах способствовала быстрому внутривидовому и межвидовому переносу этих ферментов [9,10]. Особенно большое число антибиотикорезистентных штаммов отмечается среди *Klebsiella pneumoniae* [11]. Распространение полирезистентных нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae* приобретает эпидемический характер, при этом отмечаются региональные особенности доминирования определенных геновариантов, отличающихся по характеру фенотипических проявлений [12]. Так, в ряде клиник США, Франции, Англии, Италии пандемическое распространение получила генетическая линия *K. pneumoniae*, относящаяся к сиквенс-типу 258 [13,14]. В странах Прибалтийского региона и Санкт-Петербурге распространены штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие NDM-1 металло- $\beta$ -лактамазу и относящиеся к сиквенс-типу 340 [15]. Наряду с множественной

резистентностью все большую значимость имеет гипервирулентность, также связанная с приобретением дополнительного генетического материала и формированием генетических линий, эффективно поддерживающих эти детерминанты. Наряду с широко распространенной проблемой АБР в литературе описывается устойчивость *Klebsiella pneumoniae* к дезинфектантам и антисептикам. Одним из механизмов устойчивости бактерий к дезинфектантам и антисептикам является экспрессия системы эффлюкса, которая кодируется генами *qacE*, *qacED1*, *serA*, широко распространенными среди грамотрицательных бактерий [16-19]. Описано, что гены группы *qac* (quaternary ammonium compound – четвертичное аммониевое соединение) часто выявляются в ассоциации с генами, кодирующими устойчивость к АМП разных групп, в том числе к  $\beta$ -лактамам (карбапенемазы), так как обе группы генов локализуются в плазмидо-опосредованных интегронах 1 класса. В свете этого, нужно учитывать возможность неспецифической селекции антибиотико-резистентных штаммов грамотрицательных бактерий при нерациональном применении дезинфектантов и антисептиков.

Учитывая изложенное, целью нашего исследования являлся анализ полных геномов резистентных изолятов *K. pneumoniae* в контексте эпидемиологического надзора за ИСМП в многопрофильном стационаре.

## Материалы и методы

В работе исследован 41 изолят бактерий рода *Klebsiella*, выделенных в многопрофильном стационаре г. Барнаула из клинических образцов. Принадлежность к роду *Klebsiella* определяли по культурально-морфологическим признакам с использованием селективных сред – агара МакКонки (BioMerieux, Франция) и агара Левина (OXOID, Великобритания). 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). Геномную ДНК бактериальных культур выделяли с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). Полногеномное секвенирование проводилось с помощью секвенатора NextSeq 2000 (Illumina). Анализ микробиологического фона за период 2020-2022 гг. многопрофильного стационара проведен с использованием компьютерной программы WHONET. В работе использованы данные сайта AMRmap микробиологического пейзажа за 2019-2020 гг. по России.

Исследование включало эпидемиологические, статистические, математические методы исследования.

## Результаты исследования

Сравнительный анализ микробиологического пейзажа за период 2020-2022 гг. многопрофильного стационара и стационаров России за 2019-2020 гг. свидетельствовал о преобладании в общей структуре *K. pneumoniae*: 39,2% и 27,86% соответственно (рис. 1,2).

Рис. 1. Микробиологический пейзаж возбудителей ИСМП – ситуация в России за 2019-2020 гг.

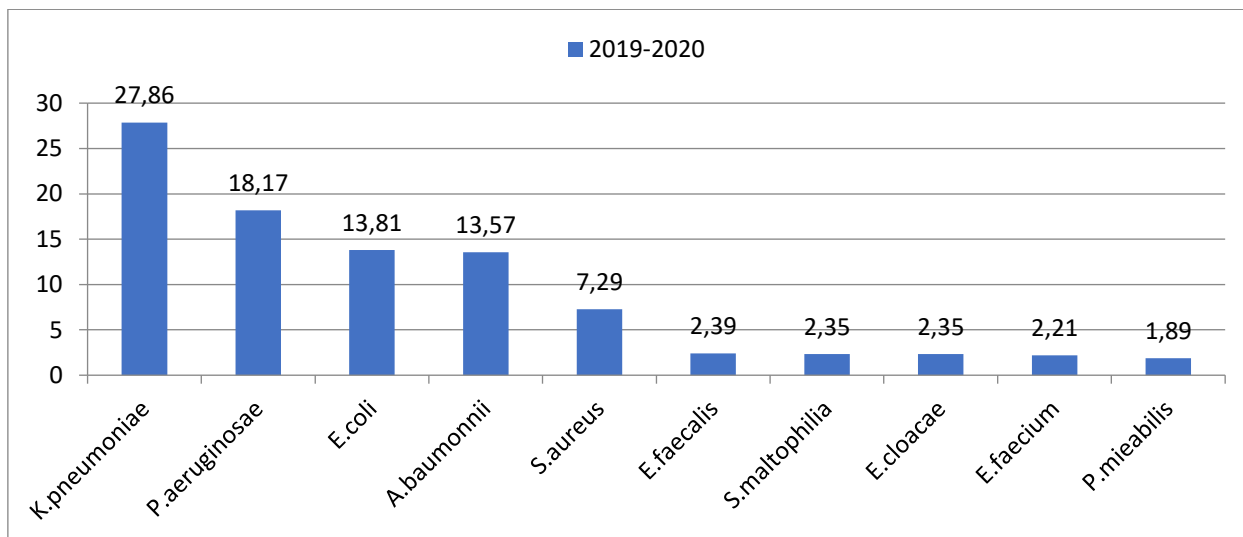
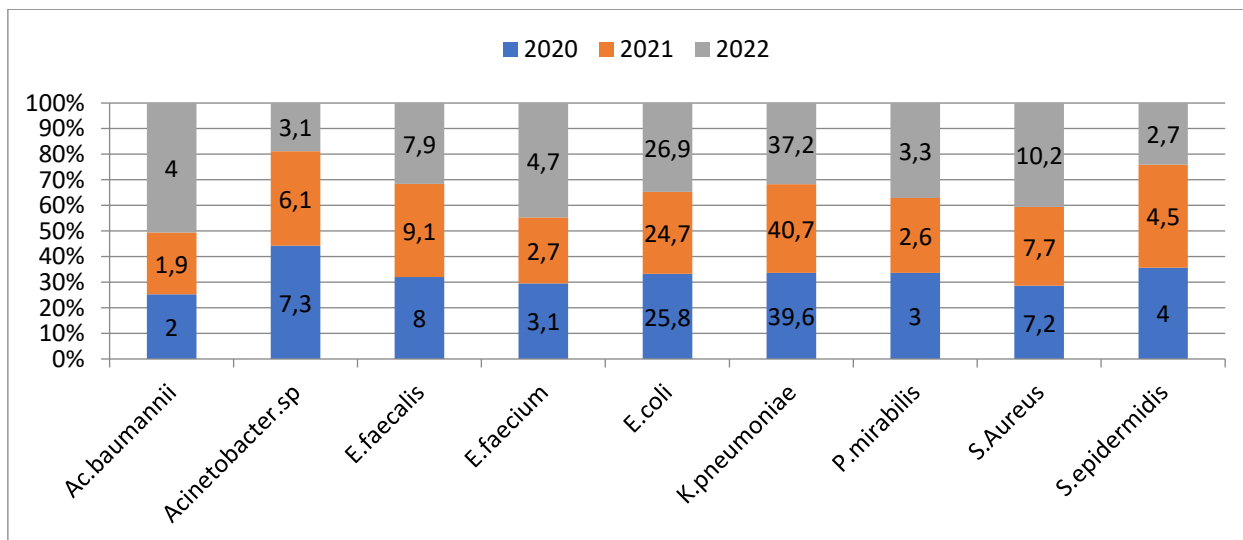


Рис. 2. Микробиологический пейзаж многопрофильного стационара г. Барнаула 2020-2022 гг.



Чувствительность к антибактериальным препаратам в многопрофильном стационаре г. Барнаула к основным антибиотикам (Эртапенем, Имипнем и Меропенем) была ниже, чем по России в 2,2, 1,6 и 1,5 соответственно при сохранении тенденции к повышению резистентности (рис. 3,4).

Рис. 3. Чувствительность к антибактериальным средствам *Klebsiella sp.* по России 2019-2020 гг.

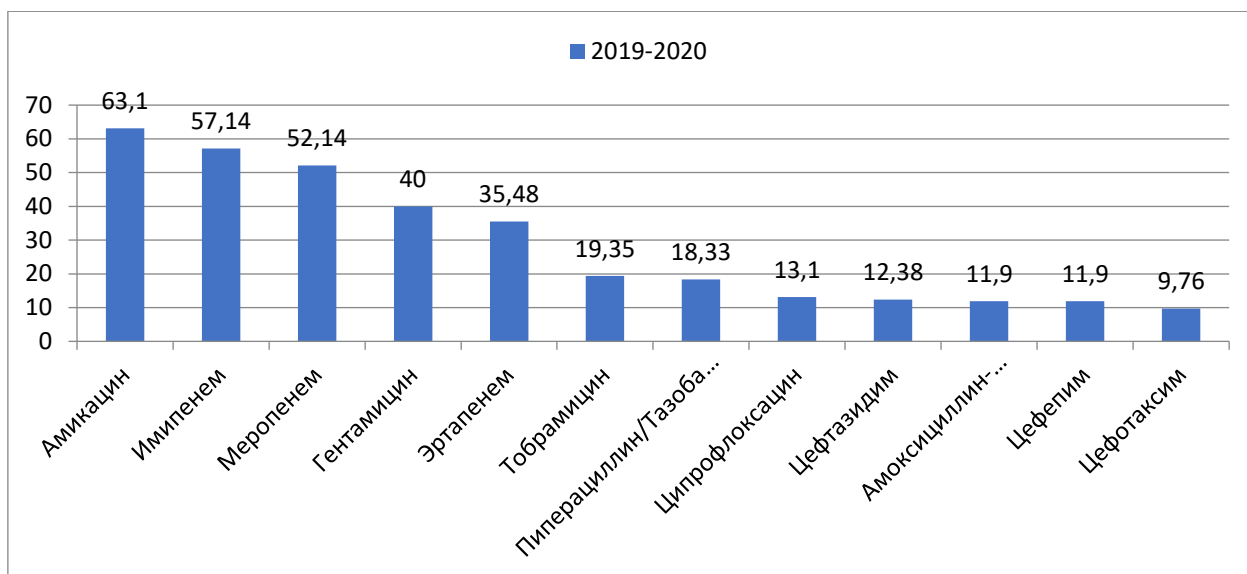
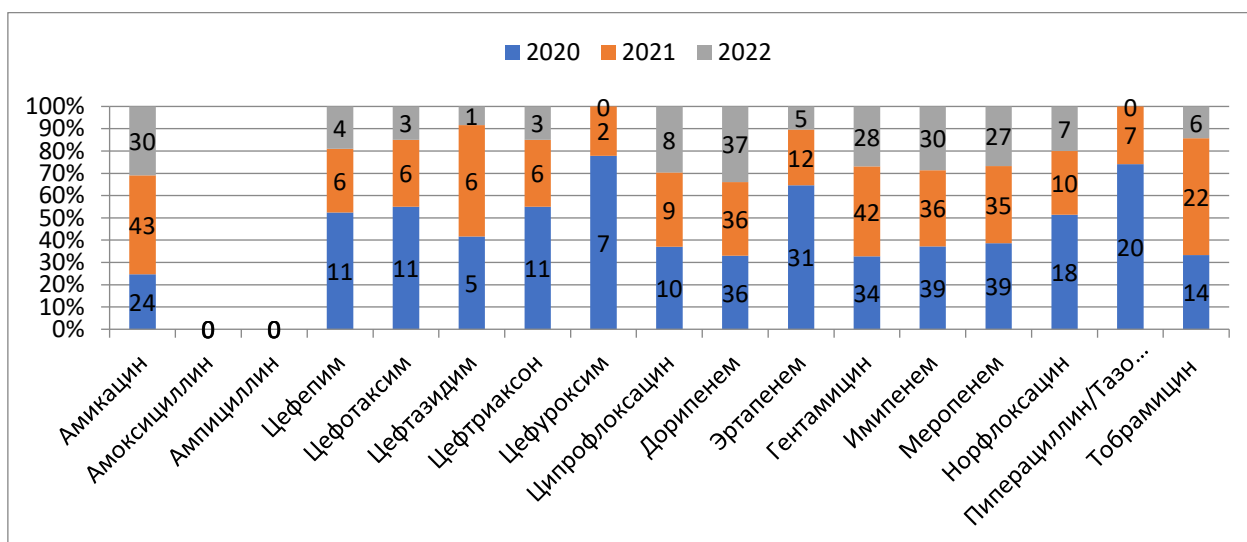


Рис. 4. Чувствительность к антибактериальным средствам *Klebsiella sp.* многопрофильного стационара г. Барнаула 2020-2022 гг.



Филогенетический анализ клинических изолятов *K. pneumoniae* ST395 установил отличия в генетическом наборе разных МУ г. Москвы и Барнаула (рис. 5).

Полученные от больных резистентные культуры многопрофильного стационара были представлены преимущественно *K. pneumoniae* – 82,0%. Из клинического материала от больных выделены также *Pseudomonas aeruginosa* – 10,0%, *A. baumannii* – 6,0%, *E. coli* – 2,0% (табл. 1).

В связи наибольшим количеством *K. pneumoniae* в этиологии ИСМП при оценке результатов генотипирования рассмотрен данный возбудитель.

Рис. 5. Филогенетический анализ клинических изолятов *K. pneumoniae* ST395 разных МУ.

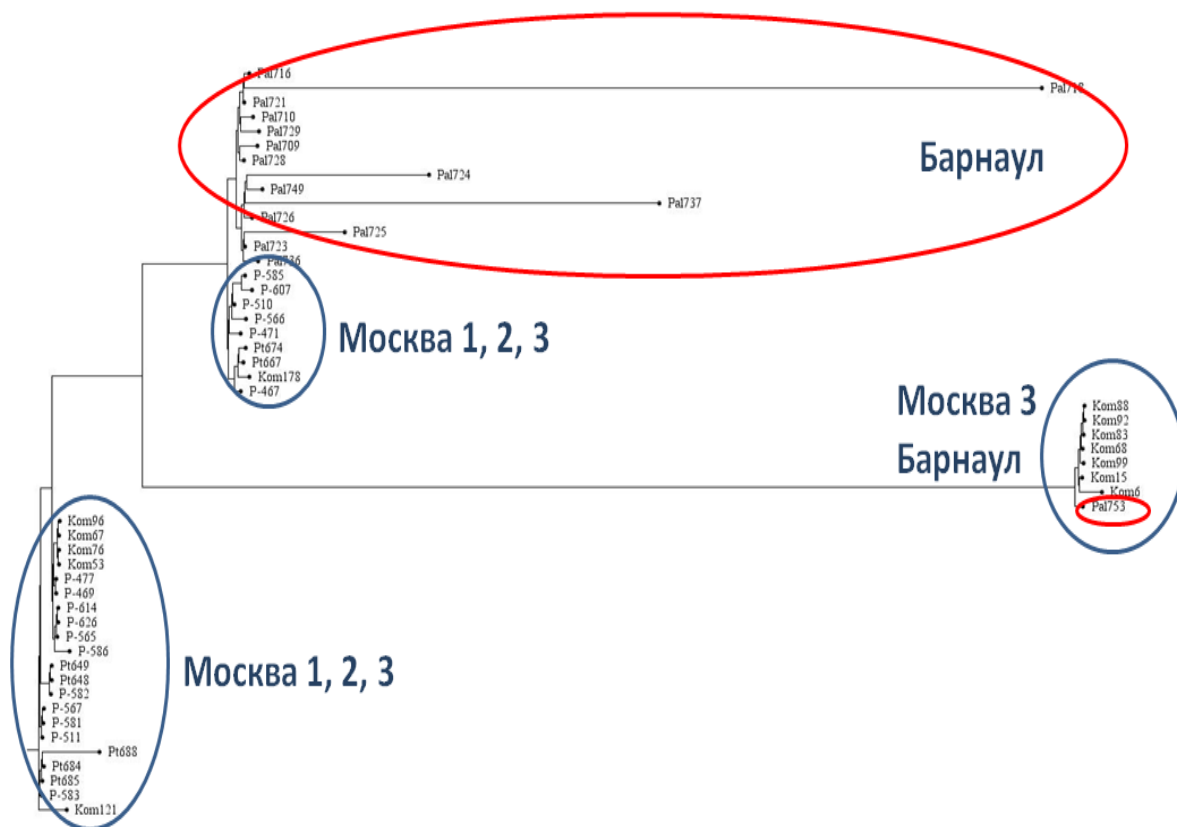


Таблица 1. Пейзаж резистентных культур многопрофильного стационара г. Барнаула, проанализированных с помощью высокопроизводительного секвенирования

Всего культур	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Acinetobacter baumannii</i>		<i>E. coli</i>	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
50	41	82,0	5	10,0	3	6,0	1	2,0

Для понимания формирования причин и механизмов выработки резистентности к антибактериальным препаратам изучены их группы, используемые в лечении пациентов, у которых выделены изоляты *K. pneumoniae* до поступления и в ходе оказания медицинской помощи в многопрофильном стационаре.

До поступления в многопрофильный стационар проходили лечение 29,6% пациентов по месту жительства с преимущественным использованием фторхинолонов (Цефтриаксон, Ципрофлоксацин, Цефоперазон, Левофлоксацин).

Во время оказания медицинской помощи в многопрофильном стационаре наиболее часто применялась комбинация препаратов цефалоспоринового ряда и ингибитора бета-лактамаз (Цефоперазон и Сульбактам) – 85,2% (табл. 2). Широко использовались в лечении: Меропенем – антибиотик класса карбапенемов – 59,2%, Ванкомицин из группы трициклических гликопептидов – 37,0%, Тигециклин из группы глицилциклинов – 22,2%, Амикацин – аминогликозидов (25,9%).

Таблица 2. Перечень антибактериальных препаратов, используемых в лечении больных, проходивших лечение в многопрофильном стационаре г. Барнаула, у которых выделены изоляты *K. pneumoniae*

Кол-во пациентов	Антибактериальный препарат													
	Цефтриаксон		Меропенем		Ванкомицин		Тигециклин		Амикацин		Цефоперазон +сульбактам		Линезолид	
27	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
		8	29,6	16	59,2	10	37	6	22,2	7	25,9	23	85,2	7

В результате полногеномного секвенирования *Klebsiella pneumoniae* были выявлены гены карбапенемаз группы OXA-48-подобных в 95,1%, гены бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M – у 87,8% ДНК, а также металло- $\beta$ -лактамаз группы NDM – 31,7% среди исследованных культур.

Гены бета-лактамаз расширенного спектра группы CTX-M, относящиеся к БЛРС, гидролизуют пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы.

Изучение генов бета-лактамаз *Klebsiella pneumoniae* свидетельствовало о наибольшем присутствии blaOXA у 80,5% культур. Разнообразие blaOXA определялось 1, 9, 23, 48, 66, 488 генотипами. blaCTXM-15 выявлена у 51,2% изолятов, blaSHV присутствовала у 46,3%, и blaTEM у 39,0%. blaSHV характеризовались более широким спектром: 11, 26, 28, 78, 98, 106, 121, 145, 155, 159, 179, 182, 194, 199. blaADC, blaPER, blaRED, blaLAP, представлены в структуре реже от 2,3% до 7,3%.

Адаптивная резистентность *K. pneumoniae* детерминируется внутренними генетическими перестройками или генетическим материалом, приобретенным путем горизонтального переноса от резистентного микробного окружения и может обеспечить защиту клебсиелл от всех известных классов АМП.

С целью определения формирования госпитальных штаммов *K. pneumoniae* изучены гены, кодирующие механизмы устойчивости бактерий к дезинфектантам и антисептикам (ЧАС и перекиси водорода). Поиск генов, отвечающих за механизмы устойчивости *Klebsiella pneumoniae* к четвертично-аммониевым соединениям, выявил наличие OqxA у 56,1%, OqxB – 63,4%, qacE – 56,1% изолятов.

Обнаружены гены, ассоциированные с устойчивостью *Klebsiella pneumoniae* к перекиси водорода OqxA у 65,9%, OqxB – 63,4%, qacB – 53,7% qacA – 53,7%.

Исходя из литературных данных гены группы qac (quaternary ammonium compound – четвертичное аммониевое соединение) часто выявляются в ассоциации с генами, кодирующими устойчивость к АМП разных групп, в том числе к  $\beta$ -лактамам (карбапенемазы), так как обе группы генов локализируются в плазмид опосредованных интегронах класса 1 [16-19]. Нами проведен анализ полученных данных по поиску комбинаций указанных генов изученных изолятов *K. pneumoniae* (табл. 3).

Таблица 3. Выявленные комбинации генов бета-лактамаз и генов, кодирующих механизмы устойчивости к дезинфектантам изолятов *K. pneumoniae*.

Итого культур	blaOXA+blaTEM +blaCTX OqxА		blaOXA+blaCTX +BlaSHV OqxВ		blaOXA+blaTEM +blaCTX +OqxВ		blaOXA+blaCTX +BlaSHV OqxА		blaOXA+blaCTX +BlaSHV OqxА+OqxВ		blaOXA+blaTEM +blaCTX OqxА+OqxВ	
	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%	абс	%
41	9	22,0	5	12,2	7	17,1	6	14,6	3	7,3	4	9,8

Сочетание β-лактамаз (blaOXA, blaTEM, blaCTX) с OqxА была получено у 22,0% изолятов. Сочетание blaOXA, blaCTX, BlaSHVc геномом OqxВ установлено в 12,2%, а комбинация blaOXA, blaTEM, blaCTX с геном OqxВ в 17,1%. Также сочетание генов blaOXA+blaCTX +BlaSHV и OqxА имело место в 14,6%. Определено одновременное присутствие генов OqxА и OqxВ с β-лактамазами (blaOXA, blaCTX, BlaSHV) в 7,3% изолятов, а в сочетании с blaOXA, blaTEM, blaCTX в 9,8%.

## Обсуждение результатов

Сравнительный анализ микробиологического пейзажа за период 2020-2022 гг. многопрофильного стационара и стационаров России за 2019-2020 гг. свидетельствует о преобладании в общей структуре *K. pneumoniae* 39,2% и 27,86% соответственно и более высоких показателях (на 11,3%) в многопрофильном стационаре г. Барнаула. Чувствительность к антибактериальным препаратам в многопрофильном стационаре к основным антибиотикам (Эртапенем, Имипнем и Меропенем) была ниже, чем по России в 2,2, 1,6 и 1,5 соответственно при сохранении тенденции к повышению резистентности.

Формированию резистентности до поступления в многопрофильный стационар способствовало использование в 29,6% фторхинолонов (цефтриаксон, ципрофлоксацин, цефоперазон, левофлоксацин).

Во время оказания медицинской помощи в многопрофильном стационаре наиболее часто применялась комбинация препаратов цефалоспоринового ряда и ингибитора бета-лактамаз (Цефоперазон и Сульбактам) – 85,2%. В лечении широко использовались: меропенем – антибиотик класса карбапенемов – 59,2%, ванкомицин из группы трициклических гликопептидов – 37,0%, тигециклин из группы глицилциклинов – 22,2%, амикацин – аминогликозидов (25,9%).

Изучение генов Beta-lactam *Klebsiella pneumoniae* свидетельствовало о наибольшем присутствии blaOXA у 80,5% изолятов и CTX-M – у 87,8%. Гены металло-β-лактамаз группы NDM были выявлены у трети изолятов (31,7%). Разнообразие blaOXA определялось 1, 9, 23, 48, 66, 488 генотипами, BlaCTX включала только генотип 15. BlaSHV присутствовала у 46,3% культур и blaTEM у 39,0%. BlaSHV характеризовались более широким спектром: 11, 26, 28, 78, 98, 106, 121, 145, 155, 159, 179, 182, 194, 199. BlaADC, blaPER, blared, blaLAP, представлены в структуре реже – от 2,3% до 7,3%.

Тенденция к снижению чувствительности к антимикробным препаратам, определяемая обнаружением генов, отвечающих за устойчивость к антибиотикам, дезинфектантам и



антисептикам свидетельствует о формировании госпитальных штаммов [16-19]. Почти у 95,1% проанализированных штаммов *K. pneumoniae* обнаружен ген OXA-48, СТХ-М встречался в 87,8%, что приводит к резистентности к пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам и монобактамам. По литературным данным для группы беталактамаз (TEM, СТХМ, OXA), установленных нашим исследованием, также характерно функциональное разнообразие ферментов, гидролизующих основные группы АБП [16-19]. Так сочетание продукции СТХМ (беталактамаза расширенного спектра) со снижением проницаемости наружной мембраны и активацией эффлюкс насосов у *K. pneumoniae* приводит к возникновению устойчивости к эртапенему, которая в нашем случае на 2022 год составляла 95%.

Устойчивость к беталактамамным антибиотикам может быть связана не только с беталактамазами. Она может быть следствием модификации пенициллинсвязывающих белков, активацией эффлюкс насосов (AcrAB-TolC, KpnGH, KpnEF), а также поломкой поринов (OmpK35, OmpK36, LamB, PhoE, KpnO), обеспечивающих транспорт беталактамов внутрь бактериальной клетки.

Изучение генотипов *K. pneumoniae* установило их частичную идентичность как при резистентности к ЧАС, так и перекиси водорода, представленную OqxА и OqxВ. При этом в исследовании учтено, что Qac – это ген в микроорганизме, который отвечает за защиту самого себя за счет эффлюкс системы, основная функция которой заключается в распознавании и удалении вредных веществ, проникших через клеточную стенку.

## Выводы

1. В многопрофильном стационаре г. Барнаула, как и в структуре выделенных из клинического материала возбудителей преобладала *K. pneumoniae* (39,2%), что на 11,3% выше, чем в Российской Федерации.
2. Восприимчивость к основным антибактериальным препаратам (Эртапенем, Имипенем и Меропенем) в стационаре г. Барнаула была в 2,2, 1,6 и 1,5 ниже соответственно по сравнению с медицинскими учреждениями Российской Федерации, с тенденцией роста резистентности за анализируемый период.
3. При полногеномном секвенировании *K. pneumoniae* были выявлены гены карбапенемаз группы OXA-48 – подобных в 95,1%, гены бета-лактамаз расширенного спектра группы СТХ-М – у 87,8% ДНК, а также металло- $\beta$ -лактамаз группы NDM – 31,7% среди исследованных культур.
4. Обнаружены гены, ассоциированные с устойчивостью изолятов *K. pneumoniae* к четвертично-аммониевым соединением и перекиси водорода (OqxА, OqxВ).
5. Установленное при полногеномном секвенировании изолятов *K. pneumoniae* сочетание генов карбапенемаз (blaOXA, blaTEM, blaCTX) с генами, ассоциированными с устойчивостью

четвертично-аммонивых соединений и перекиси водорода (ОqxА в 22,0%, ОqxВ (17,1%) свидетельствовало о формировании госпитальных штаммов в стационаре г. Барнаула.

6. Использование полногеномного секвенирования изолятов возбудителей ИСМП в клинической практике (на примере *K. pneumoniae*) определяет выбор антибактериальной терапии, применение дезинфектантов и антисептиков при организации профилактических и противоэпидемических мероприятий.

## Список литературы

1. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится лидирующим оппортунистическим патогеном. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2020; 22(1): 4-19.
2. Яковлев С.В., Суворова М.П., Белобородов В.Б., Басин Е.Е., Елисеева Е.В., Ковеленов С.В., Портнягина У.С., Рог А.А., Руднов В.А., Барканова О.Н. Распространенность и клиническое значение нозокомиальных инфекций в лечебных учреждениях России: исследование ЭРГИНИ. *Антибиотики и химиотерапия* 2016; 61(5-6): 32-42.
3. Rodríguez-Baño J., Cisneros J.M., Cobos-Trigueros N., Fresco G., Navarro-San Francisco C., Gudiol C., Horcajada J.P., López-Cerero L., Martínez J.A., Molina J., Montero M., Paño-Pardo J.R., Pascual A., Peña C., Pintado V., Retamar P., Tomás M., Borges-Sa M., Garnacho-Montero J., Bou G. Study Group of Nosocomial Infections (GEIH) of the Spanish Society of Infectious Diseases, Infectious Diseases (SEIMC). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(5): 337.e1-337.e21, doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.009
4. Paczosa M.K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016; 80(3): 629-661, doi: 10.1128/MMBR.00078-15
5. Hou X.H., Song X.Y., Ma X.B., Zhang S.Y., Zhang J.Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Microbiol.* 2015; 46(3): 759-768, doi: 10.1590/S1517-838246320140138
6. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41(7): 252-275, doi: 10.1093/femsre/fux013
7. Ramirez M.S., Traglia G.M., Lin D.L., Tran T., Tolmasky M.E. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr.* 2014; 2(5), doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013
8. Kaushik M., Kumar S., Kapoor R.K., Virdi J.S., Gulati P. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018; 51(2): 167-176, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004
9. Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С., Батыршин И.М., Попенко Л.Н., Шляпников С.А., Ильина Е.Н., Сидоренко С.В. Чувствительность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемаз, к антибиотикам различных групп. *Антибиотики и химиотерапия* 2013; 58(3-4): 10-13.
10. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 969-976.
11. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2014; 16(4): 254-265.
12. Munoz-Price L.S., Poirel L., Bonomo R.A., et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 785-796.
13. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1812-1820.

14. Monaco M., Giani T., Raffone M., Arena F., Garcia-Fernandez A., Pollini S.; Network EuSCAPE-Italy; Grundmann H., Pantosti A., Rossolini G.M. et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19(42): 14-18.
15. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 152-155.
16. Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacEA1* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 159(2): 173-178.
17. Kucken D., Heinz-Hubert F., Kaufers P.M. Association of *qacE* and *qacEA1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 183(1): 95-98.
18. Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Radstrom P., et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4): 761-768.
19. Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(4): 575-608.

## Preliminary results of a study based on genome-wide sequencing of resistant *K. pneumoniae* strains in a multidisciplinary hospital in Barnaul

**Russkih A. A.**<sup>1</sup>

*Postgraduate student, Chair for Epidemiology, Microbiology and Virology*

**Luk'janenko N. V.**<sup>1</sup>

*Doctor of Medicine, Professor, Chair for Epidemiology, Microbiology and Virology*

**Rudenko A. V.**<sup>1</sup>

*Head, Educational laboratory, Lecturer*

**Kolomiets A. A.**<sup>1</sup>

*Vice-Rector for Regional Healthcare Development*

**Petrova A. A.**<sup>2</sup>

*Head, Epidemiological Department*

**Mikhailova Y. V.**<sup>3</sup>

*PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance*

*1 – Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation*

*2 – Regional Clinical Hospital, Barnaul, Russian Federation*

*3 – Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation*

**Corresponding Author:** *Russkih Artjom Aleksandrovich; e-mail: Likvidator20110@mail.ru*

**Conflict of interest.** *None declared.*

**Funding.** *The study had no sponsorship.*

### Abstract

**Introduction.** *Klebsiella pneumoniae*, one of the leading causative agents of nosocomial infections, is included in the group of so-called "ESKAPE" pathogens – microorganisms associated with increased antibiotic resistance, representing a serious problem for public health. *K. pneumoniae* is widespread and has a pronounced ability to acquire resistance to antimicrobial drugs. Inadequate antibacterial therapy in patients with nosocomial infections worsens the prognosis of the disease and increases hospital mortality, therefore, the prescribing of medications should be based on knowledge of the current profile of antibiotic resistance of the pathogen in a particular hospital. The study of the genetic diversity of *K. pneumoniae* will reveal the main mechanisms of resistance of this pathogen

and formulate recommendations for rational antibiotic therapy. **Objective.** Genome-wide analysis of resistant *K. pneumoniae* isolates in the context of epidemiological surveillance of healthcare associated infections (HAI) in a multidisciplinary hospital. **Materials and methods of research.** 41 isolates of bacteria of the genus *Klebsiella* isolated in a multidisciplinary hospital in Barnaul from clinical samples were studied. Genome-wide sequencing was performed using NextSeq 2000 (Illumina). **Research results and their discussion.** A comparative analysis of the microbiological background in a multidisciplinary hospital and hospitals in Russia demonstrated the predominance of *K. pneumoniae* in the overall structure: 39.2% and 27.86%. In the course of genome-wide analysis of resistant strains of *K. pneumoniae*, combinations of beta-lactamase genes and genes encoding mechanisms of resistance to disinfectants were identified. Genes associated with the resistance of *Klebsiella pneumoniae* to hydrogen peroxide were found, genes of carbapenemases of the OXA-48 group, genes of extended-spectrum beta-lactamases of the CTX-M group, as well as metallo- $\beta$ -lactamases of the NDM group were identified among the studied cultures. **Conclusion.** The use of genome-wide sequencing of isolates of HAI pathogens in clinical practice (using the example of *Klebsiella pneumoniae*) determines the choice of antibacterial therapy, the use of disinfectants and antiseptics in the organization of preventive and antiepidemic measures.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, genome-wide sequencing

## References

1. Chebotar' I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. Pochemu *Klebsiella pneumoniae* stanovitsya lideruyushchim opportunisticheskim patogenom. [Why *Klebsiella pneumoniae* becomes the leading opportunistic pathogen.] *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy]* 2020; 22(1): 4-19. (In Russ.)
2. Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Beloborodov V.B., Basin E.E., Eliseeva E.V., Kovelonov S.V., Portnyagina U.S., Rog A.A., Rudnov V.A., Barkanova O.N. Rasprostranennost' i klinicheskoe znachenie nozokomial'nyh infekcij v lechebnyh uchrezhdeniyah Rossii: issledovanie ERGINI. [Prevalence and clinical significance of nosocomial infections in medical institutions of Russia: ERGINI study] *Antibiotiki i himioterapiya [Antibiotics and chemotherapy]* 2016; 61(5-6): 32-42. (In Russ.)
3. Rodríguez-Baño J., Cisneros J.M., Cobos-Trigueros N., Fresco G., Navarro-San Francisco C., Gudiol C., Horcajada J.P., López-Cerero L., Martínez J.A., Molina J., Montero M., Paño-Pardo J.R., Pascual A., Peña C., Pintado V., Retamar P., Tomás M., Borges-Sa M., Garnacho-Montero J., Bou G. Study Group of Nosocomial Infections (GEIH) of the Spanish Society of Infectious Diseases, Infectious Diseases (SEIMC). Diagnosis and antimicrobial treatment of invasive infections due to multidrug-resistant Enterobacteriaceae. Guidelines of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2015; 33(5): 337.e1-337.e21, doi: 10.1016/j.eimc.2014.11.009
4. Paczosa M.K., Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016; 80(3): 629-661, doi: 10.1128/MMBR.00078-15
5. Hou X.H., Song X.Y., Ma X.B., Zhang S.Y., Zhang J.Q. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Braz J Microbiol.* 2015; 46(3): 759-768, doi: 10.1590/S1517-838246320140138
6. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 2017; 41(7): 252-275, doi: 10.1093/femsre/fox013
7. Ramirez M.S., Traglia G.M., Lin D.L., Tran T., Tolmasky M.E. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. *Microbiol Spectr.* 2014; 2(5), doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013
8. Kaushik M., Kumar S., Kapoor R.K., Viridi J.S., Gulati P. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2018; 51(2): 167-176, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004

9. Ageev V.A., Partina I.V., Lisicyna E.S., Batyrshin I.M., Popenko L.N., Shlyapnikov S.A., Il'ina E.N., Sidorenko S.V. Chuvstvitel'nost' gramotricatel'nyh bakterij, producentov karbapenemaz, k antibiotikam razlichnyh grupp. [Sensitivity of gram-negative bacteria, producers of carbapenemases, to antibiotics of various groups.] *Antibiotiki i himioterapiya [Antibiotics and chemotherapy]* 2013; 58(3-4): 10-13. (In Russ.)
10. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54: 969-976.
11. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Ju., et al. Antibiotikorezistentnost' nozokomial'nyh shtammov Enterobacteriaceae v stacionarah Rossii: rezul'taty mnogocentrovogo epidemiologicheskogo issledovaniya MARAFON v 2011-2012 gg. [Antibiotic resistance of nosocomial strains of Enterobacteriaceae in Russian hospitals: results of the MARATHON multi-centre epidemiological survey in 2011-2012.] *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija [Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy]* 2014; 16(4): 254-265. (In Russ.)
12. Munoz-Price L.S., Poirel L., Bonomo R.A., et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 785-796.
13. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20: 1812-1820.
14. Monaco M., Giani T., Raffone M., Arena F., Garcia-Fernandez A., Pollini S.; Network EuSCAPE-Italy; Grundmann H., Pantosti A., Rossolini G.M. et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19(42): 14-18.
15. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A., Sidorenko S.V. Emergence of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2014; 44: 152-155.
16. Kazama H., Hamashima H., Sasatsu M., Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacEA1* in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998; 159(2): 173-178.
17. Kucken D., Heinz-Hubert F., Kaukfers P.M. Association of *qacE* and *qacEA1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 183(1): 95-98.
18. Paulsen I.T., Littlejohn T.G., Radstrom P., et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993; 37(4): 761-768.
19. Paulsen I.T., Brown M.H., Skurray R.A. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 1996; 60(4): 575-608.