



Пай Г.В.¹, Ракитина Д.В.¹, Сухина М.А.^{1,2}, Юдин С.М.¹, Макаров В.В.¹, Мания Т.Р.¹, Загайнова А.В.¹

Изучение связи маркеров антибиотикорезистентности с маркерами вирулентности у NDM-положительных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в различных водах и локусах человека

¹ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии имени А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123423, Москва, Россия

Введение. Рост антибиотикорезистентности среди госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) вызывает всё большую озабоченность во всём мире. На сегодняшний день появляется много данных о связи резистентных штаммов с гипервирулентностью клинических изолятов. Однако вопрос о распределении этих условных патогенов во внешней среде остаётся пока открытым.

Цель исследования — оценить и сравнить встречаемость детерминант устойчивости к антибиотикам у изолятов *K. pneumoniae* из водных источников (окружающей среды и сточных вод), человеческих источников (практически здоровых людей и пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) и внекишечными инфекциями (ЕХИ)).

Материалы и методы. ПЦР-детекцию генов карбапенемаз IMP, NDM, VIM, KPC, OXA-48 проводили с помощью коммерческих наборов «Амплисенс», согласно протоколу производителя. С помощью ПЦР-анализа оценивали частоту встречаемости генов антибиотикорезистентности у 223 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из различных источников. Использовали 42 изолята из сточных вод, 19 изолятов из поверхностных водных источников, 30 устойчивых к антибиотикам изолятов от пациентов с внекишечными инфекциями (ВКИ), 69 изолятов от пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, а также 63 изолята из кала здоровых людей.

Результаты. Среди изолятов внекишечных инфекций выявлены разнообразные гены антибиотикоустойчивости. Чаще других выявлялся тип OXA (у 30% обнаружен только он, ещё у 26,6% он выявлен вместе с KPC или NDM). NDM в качестве единственного гена устойчивости обнаружился у 23,3% изолятов из внекишечных инфекций. KPC, наиболее редкий тип генов устойчивости, показан у 3,3% изолятов из внекишечных инфекций. У двух изолятов из кала больных воспалительными заболеваниями кишечника помимо генов NDM были обнаружены гены VIM. В остальных группах *K. pneumoniae* из всех изученных генов бета-лактамаз была обнаружена только группа генов NDM (обнаружен у 13–28% изолятов в каждой группе, статистически достоверных различий между группами не выявлено). Была показана ассоциация генов NDM с генами вирулентности *iutA* и *trpA*, отвечающими за поглощение железа и гипермукоидный фенотип.

Заключение. В исследованной выборке *K. pneumoniae* из различных источников наиболее распространённым вариантом резистентности к антибиотикам были NDM (13,5%) и OXA (8%). При этом NDM в отличие от остальных генов устойчивости встречается во всех группах изолятов с частотой 11–28%. На примере гена металло-β-лактамазы NDM у *K. pneumoniae* мы наблюдаем ассоциацию между маркерами резистентности и маркерами вирулентности *trpA* и *iutA*. Значительный процент резистентных штаммов у здоровых доноров и в поверхностных водах требует дальнейшего изучения роли NDM+ штаммов в патогенности выделенных *K. pneumoniae*.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; вирулентность; карбапенемаза; металло-β-лактамаза NDM-типа; поверхностные воды; сточные воды; ВЗК; внекишечные инфекции

Для цитирования: Пай Г.В., Ракитина Д.В., Сухина М.А., Юдин С.М., Макаров В.В., Мания Т.Р., Загайнова А.В. Изучение связи маркеров антибиотикорезистентности с маркерами вирулентности у NDM-положительных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в различных водах и локусах человека. *Гигиена и санитария*. 2021; 100(12): 1366–1371. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1366-1371>

Для корреспонденции: Мания Тамари Резоевна, науч. сотр. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России 119121, Москва. E-mail: TManiya@cspmpz.ru

Участие авторов: Пай Г.В. — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Ракитина Д.В. — выполнение экспериментальной работы, написание текста; Сухина М.А. — сбор материала от пациентов; Юдин С.М. — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Макаров В.В. — редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Мания Т.Р. — сбор материала, редактирование; Загайнова А.В. — концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биообразцов микробиологических ресурсов человека (шифр «Криобанк»)», № АААА-А18-118020590091-2.

Поступила: 22.07.2021 / Принята к печати: 25.11.2021 / Опубликовано: 30.12.2021

Galina V. Pay¹, Daria V. Rakitina¹, Mariya A. Sukhina^{1,2}, Sergey M. Yudin¹,
Valentin V. Makarov¹, Tamari R. Maniya¹, Angelika V. Zagaynova¹

Study of the relationship between antibiotic resistance markers and virulence markers in NDM-positive *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in various waters and human loci

¹Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation;

²State Scientific Centre of Coloproctology n.a. A.N. Ryzhikh, Moscow, 123423, Russian Federation

Introduction. The propagation of multi-resistance to antibiotics among hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is a subject of growing concern worldwide. At present, growing data of association between resistance and hypervirulence in clinical isolates of *K. pneumoniae* emerges. However, the occurrence of these pathogens in the environment remains an open question.

The aim of this study was to evaluate and compare antibiotic resistance determinants occurrence in *Klebsiella pneumoniae* isolates from water sources (environmental and sewage), human sources (practically healthy people and patients with inflammatory bowel disease (IBD), and extraintestinal infections (ExII)).

Materials and methods. The PCR assay of carbapenemase genes IMP, NDM, VIM, KPC, OXA-48 was performed with the commercial “Amplisense” kits according to the manufacturer’s instructions. The assay was used to evaluate the occurrence of antibiotic-resistance genes in 223 isolates of *Klebsiella pneumoniae* from various sources: 42 isolates from sewage, 19 isolates from surface water sources, 30 isolates from biological material (blood, urine, surgical wounds, bronchoalveolar lavage) of patients with extraintestinal infections (ExII), 69 isolates from patients with inflammatory bowel diseases (IBD), and 63 isolates from faeces of practically healthy people.

Results. The ExII group revealed various antibiotic resistance genes. The most prevalent gene was OXA (30% had this gene only, other 26,6% had also KPC or NDM). NDM as the only resistance gene was observed in 23,3% of ExII isolates. KPC gene was observed in 3,3% of ExII group. Two isolates from IBD group contained NDM gene along with VIM gene. Only NDM gene was found in all the other groups of *Klebsiella pneumoniae* isolates (13–28% isolates in every group, no statistical difference). NDM was shown to be associated with virulence genes *iutA* and *rmpA* that are responsible for iron consumption and hypermucoid phenotype.

Conclusion. The most abundant resistance genes in the studied *Klebsiella pneumoniae* isolates were NDM (13.5%) and OXA (8%). At the same time, NDM was the only gene found in all groups (11–28%). NDM metallo-beta-lactamase gene was associated with *rmpA* and *iutA* genes, giving an example of the connection between virulence and resistance properties. A significant amount of resistant isolates from healthy donors and surface waters indicates the need for additional study of the role of NDM positive isolates in pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *hvKp*; *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemase; NDM-type metallo-beta-lactamase; surface water; sewage water; IBD; Extraintestinal infection

For citation: Pay G.V., Rakitina D.V., Sukhina M.A., Yudin S.M., Makarov V.V., Maniya T.R., Zagaynova A.V. Study of the relationship between antibiotic resistance markers and virulence markers in NDM-positive *Klebsiella pneumoniae* strains circulating in various waters and human loci. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2021; 100(12): 1366–1371. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-12-1366-1371> (In Russ.)

For correspondence: Tamari R. Maniya, MD, researcher of Microbiology and Parasitology laboratory in the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121. E-mail: TManiya@cspniz.ru

Information about authors:

Pay G.V., <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899> Rakitina D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690>
Sukhina M.A., <https://orcid.org/0000-0003-4795-0751> Yudin S.M., <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>
Maniya T.R., <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X> Zagaynova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

Contribution: Pay G.V. – concept and design of the study, collection and processing of material, performing the experiments, statistical processing, writing, editing; Rakitina D.V. – performing the experiments, writing; Sukhina M.A. – collection of clinical material; Yudin S.M. – editing, approval of the final version of the article; Makarov V.V. – editing, approval of the final version of the article; Maniya T.R. – collection and processing of material, editing; Zagaynova A.V. – concept and design of the study, editing, approval of the final version of the article. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

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

Acknowledgment. The research was carried out within the framework of the research work “Development of technologies for cryopreservation and archiving of biological samples of human microecological resources (code “Cryobank”)» № AAAA-A18-118020590091-2.

Received: July 22, 2021 / Accepted: November 25, 2021 / Published: December 30, 2021

Введение

Рост антибиотикорезистентности среди госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* вызывает всё большую озабоченность во всём мире. Повсеместное использование антибиотиков широкого спектра действия в больницах, сельском хозяйстве и аквакультуре может привести к загрязнению водной среды остатками антибиотиков и в конечном итоге вызвать появление устойчивых к антибиотикам сообществ *K. pneumoniae* [1]. Большой интерес представляет распределение этих условных патогенов во внешней среде с точки зрения их характеристик как вирулентности, так и устойчивости к антибиотикам.

В России, как и во всём мире, наблюдается рост числа энтеробактерий, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью к широко применяемым в терапии бета-лактамам. Наибольшую угрозу представляют карбапенем-резистентные штаммы *K. pneumoniae*. Резистентность

K. pneumoniae к карбапенемам осуществляется благодаря наличию β-лактамаз ESBL [2]. Также устойчивость штаммов *K. pneumoniae* к карбапенемам реализуется карбапенемазами: металло-β-лактамазами (IMP, VIM, NDM) [3], β-лактамазами, ингибируемыми клавулановой кислотой (NmcA, IMI, SME, GES и KPC) [4], и оксациллиназами расширенного спектра OXA-48 [5]. Особый вклад в устойчивость штаммов *K. pneumoniae* к антимикробным препаратам вносит эпидемически значимая металло-β-лактамаза NDM типа (New Delhi Metallo-β-lactamase), гидролизующая практически все применяемые бета-лактамы антибиотиков, кроме монобактамов (азтреонам). Существует 24 варианта NDM благодаря заменам аминокислот в белковой цепи фермента. Распространение данных генов среди *K. pneumoniae* осуществляется путём горизонтального переноса генов посредством конъюгирующих плазмид, в составе которых показано наличие различных вариантов NDM [6–8].

На сегодняшний день в литературе описаны случаи распространения NDM+ штаммов *K. pneumoniae* во всём мире. Наибольшее распространение NDM-1 продуцирующие штаммы *K. pneumoniae* (58%) получили в Китае и Индии [9]. Данные относительно распространения несущих NDM штаммов *K. pneumoniae* в России мало. В базе данных web-ресурса «AMRmap» (<http://map.antibiotic.ru/>), содержащего результаты исследований Научно-исследовательского института антимикробной химиотерапии (НИИХ) Смоленского государственного медицинского университета и Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), на территории России в период с 2013 по 2018 г. были выявлены 249 изолятов *K. pneumoniae*, несущие карбапенемазу NDM-типа.

Широкое распространение карбапенем-устойчивых штаммов *K. pneumoniae*, в том числе NDM положительных, по всему миру происходит благодаря отдельным эпидемиологически успешным группам, принадлежащим в основном к сиквент-типам высокого риска ST258, ST395, ST307 и др. Также в последнее время стали распространяться штаммы *K. pneumoniae*, несущие как гены резистентности, так и гены вирулентности, что придаёт таким штаммам преимущества для выживания и распространения [10, 11].

На сегодняшний день наиболее изучены такие факторы вирулентности *K. pneumoniae*, как компоненты капсулы, липополисахариды (LPC), системы утилизации ионов трёхвалентного железа, фимбрии и система утилизации аллантина [12, 13]. Большую роль в распространении этих генетических детерминант играют мобильные генетические элементы, которые в результате горизонтального переноса передаются от штамма к штамму, а также между видами бактерий [7]. Таким образом, появляются штаммы супербактерий, в том числе и патогенные *K. pneumoniae*, представляющие серьёзную угрозу для жизни и здоровья как пациентов стационаров, так и населения в целом.

Одним из доказательств правомерности этих опасений может служить недавнее исследование госпитальной вспышки заражений гипервирулентными карбапенем-резистентными изолятами *K. pneumoniae* ST11 в Китае [14]. Эти изоляты содержали части гипервирулентной плазмиды rLVPK и ряд факторов вирулентности, ассоциированных с гипервирулентными штаммами, включая гены, кодирующие сидерофоры *aer* и *ybt*, а также ген регулятора мукоидного фенотипа *tmpA*. Тревожно то, что никакие антибиотики не были эффективны в лечении инфекций, вызванных этими штаммами.

По литературным данным выявлено широкое распространение антибиотикорезистентных штаммов бактерий рода *Klebsiella* и высокий уровень содержания по всей акватории водного объекта с сезонной динамикой и нарастанием численности от весны к осени, коррелирующее с динамикой содержания в воде патогенных энтеробактерий — сальмонелл [15–17].

В связи с вышесказанным необходимость молекулярно-генетического анализа штаммов *K. pneumoniae* в разных биотопах, включая внешнюю среду, имеет ценность как для лечащих врачей, так и для врачей-эпидемиологов.

Нами было проведено изучение эпидемиологии штаммов *K. pneumoniae*, имеющих гены антибиотикоустойчивости, и их связь с маркерами гипервирулентности, обнаруженных в различных субпопуляциях: больничных изолятах, фекалиях пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, кале здоровых лиц, в сточных водах и поверхностных источниках.

Материалы и методы

Бактериальные изоляты. Для исследования использованы бактериальные изоляты из рабочей коллекции биобанка ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Все выделенные изоляты *K. pneumoniae* хранятся в рабочей коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА в среде для длительного хранения живых

бактериальных клеток в условиях низких температур (Патент на изобретение № 2019128097 от 06.09.2019 г.) при температуре минус 70 °С.

В данной работе использованы 42 изолята *K. pneumoniae*, выделенных из сточных вод, 19 изолятов из поверхностных источников, 30 устойчивых к антибиотикам изолятов от пациентов с внекишечными инфекциями (ВКИ), выделены из крови (7), мокроты (8), бронхоальвеолярного лаважа (11), мочи (2) и гноя (1), 69 изолятов от пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), а также 63 изолята из кала группы «практически здоровых» людей.

Исследование проб сточных и поверхностных источников выполняли в рамках исполнения темы «Научное обоснование алгоритма популяционного мониторинга циркуляции патогенов вирусной природы на урбанизированных территориях на основе их индикации в сточных водах» (Шифр «Стоки») Государственного контракта № 019510000219000284_315749.

Исследование биологического материала от людей было одобрено Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих Минздрава России от 16.07.2018 г.).

Антибиотикочувствительность изолятов группы ВКИ, выделенных от пациентов, проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе WalkAway 96 Plus в соответствии с актуальной версией Рекомендаций «Определение чувствительности к антимикробным препаратам» (размещены на интернет-портале главного внештатного специалиста Минздрава России по клинической микробиологии и антимикробной резистентности — <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/> [18]).

Выделение ДНК. Культивированные бактериальные клетки промывали стерильным физраствором, собирали центрифугированием, ресуспендировали в стерильном физрастворе и лизировали 15-минутным прогреванием при 70 °С. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием 10 мин при 6000 об./мин, а надосадочную жидкость использовали для постановки ПЦР.

ПЦР-анализ. ДНК, выделенная из изолятов *K. pneumoniae*, была проанализирована на наличие генов резистентности к антибиотикам: металло-β-лактамазы (*IMP*, *VIM*, *NDM*), β-лактамазы, ингибируемые клавулановой кислотой (KPC), и оксациллиназы расширенного спектра *OXA-48*.

Анализ проводили методом ПЦР с помощью коммерческих наборов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (гены *IMP*, *NDM*, *VIM*), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (гены *KPC*, *OXA-48*) производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора, согласно инструкции производителя.

Статистический анализ. Анализ статистической достоверности различий представленности патогенных детерминант между группами изолятов проводили с использованием программного обеспечения Statistica (Statsoft, Dell) методом критерия согласия Пирсона (хи-квадрат).

Результаты

Разнообразие генов резистентности было обнаружено у антибиотикоустойчивых изолятов от больных с внекишечными инфекциями (ВКИ): гены *KPC*, *OXA* и *NDM* (рис. 1). Обращает на себя внимание, что у 16,6% мультирезистентных штаммов гены карбапенемазы не были обнаружены, 26% изолятов имели по 2 гена резистентности, ген *OXA* выявлялся у максимального числа изолятов (30%), а ген *NDM* — 23%. Не было замечено статистических различий в распределении генов резистентности между изолятами из различных субстратов (кровь, мокрота и другие биологические жидкости), что может быть обусловлено незначительностью выборки.

В группе ВЗК изолятов помимо генов *NDM* у двух изолятов были обнаружены гены *VIM*.

В остальных группах *K. pneumoniae* из всех изученных генов бета-лактамаз была обнаружена только группа генов *NDM* (рис. 2).

Original article

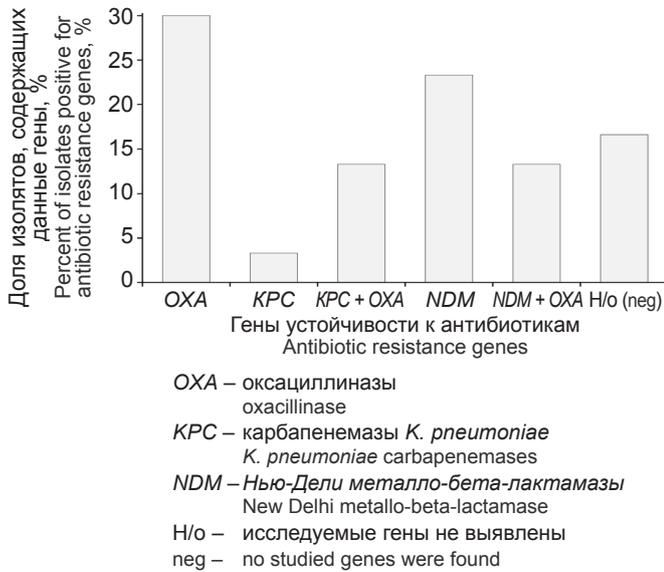


Рис. 1. Спектр генов карбапенемаз (*OXA*, *KPC* и *NDM*), выявленных в группе внекишечных инфекционных изолятов *K. pneumoniae* с антибиотикоустойчивым фенотипом.

Fig. 1. Profile of carbapenemase genes (*OXA*, *KPC* и *NDM*) found in antibiotic-resistant *K. pneumoniae* isolates from extraintestinal infections.

При статистическом анализе достоверных различий в распределении генов резистентности между группами изолятов обнаружено не было. Показано значительное распространение группы генов *NDM* во всех изученных выборках: от 13% в группе больных ВЗК до 28% в группе ВКИ. Максимальное количество изученных генов наблюдалось в группе ВКИ (28%), одинаковое – в выборках от больных с ВЗК и группы здоровых доноров (13–15%), также не было различий между выборками из сточных вод и поверхностных источников (по 21%).

Была проведена оценка возможности сочетания у изолятов *K. pneumoniae* устойчивости к антибиотикам и вирулентности. Для данной коллекции изолятов в наших предыдущих работах [19] было изучено наличие следующих патогенных детерминант: 3 сидерофора (*ybtS*, *iutA*, *kfu*); два гена, формирующих патогенный гипермукоидный фенотип (*magA*, *rmpA*); гены адгезина (*mrkD*), потенциально патогенного серотипа (*k2*), ген метаболизма аллантина (*allS*). ПЦР-анализ производили с использованием синтетических олигонуклеотидов, предложенных [20], для мультиплексного анализа.

Сопоставление данных наличия генов вирулентности с генами резистентности для всех изолятов представлено на рис. 3–5.

Анализ данных выявил статистически достоверную положительную корреляцию между генами вирулентности *rmpA* и *iutA* и карбапенемазой *NDM* ($rmpA$ ($X = 4,2$; $p < 0,05$) и *iutA* ($X = 12,1$; $p < 0,001$)).

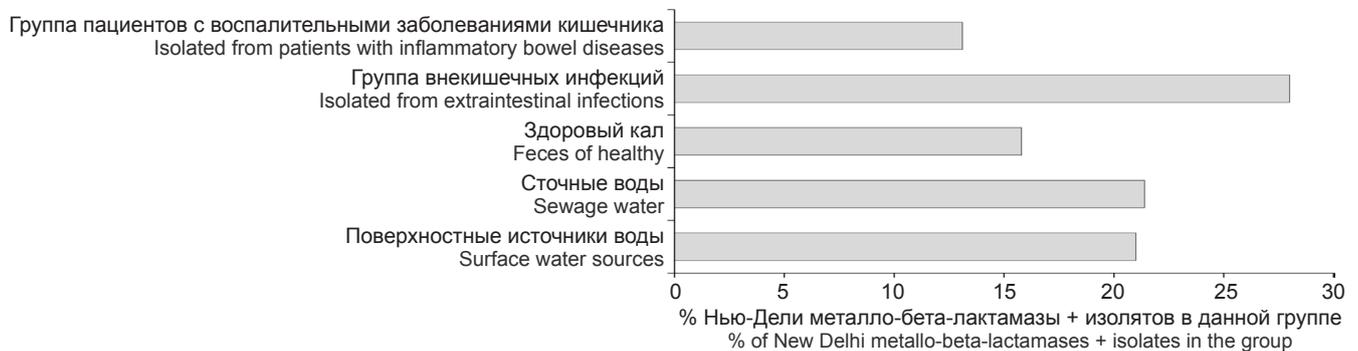


Рис. 2. Процентное содержание выявленных *NDM*-положительных изолятов в различных группах *K. pneumoniae*.

Fig. 2. Percentage of *NDM*-positive isolates in various groups of *K. pneumoniae*.

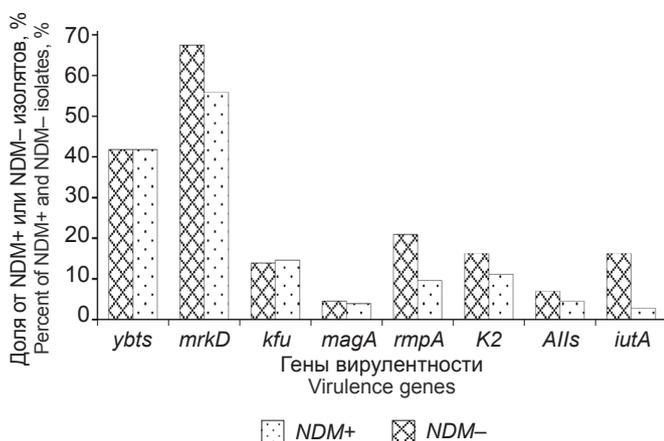


Рис. 3. Распределение генов вирулентности у *NDM+* и у *NDM-* изолятов *K. pneumoniae* (43 изолята *NDM+* и 117 изолятов *NDM-*). *NDM* – Нью-Дели металло-бета-лактамазы.

Fig. 3. The distribution of virulence genes in *NDM+* and *NDM-* isolates of *K. pneumoniae* (43 *NDM+* isolates and 117 *NDM-* isolates). *NDM* – New Delhi metallo-beta-lactamases.

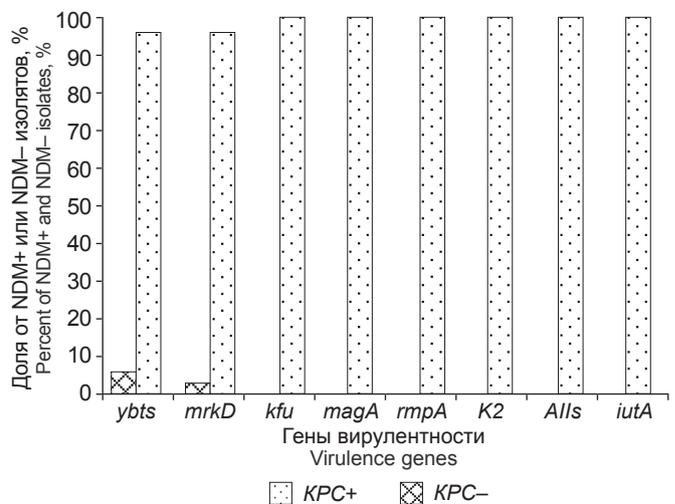


Рис. 4. Распределение генов вирулентности у *KPC+* и *KPC-* изолятов *K. pneumoniae*. *KPC* – карбапенемазы *K. pneumoniae*.

Fig. 4. The distribution of Virulence genes in *KPC+* and *KPC-* isolates of *K. pneumoniae*. *KPC* – *K. pneumoniae* carbapenemases.

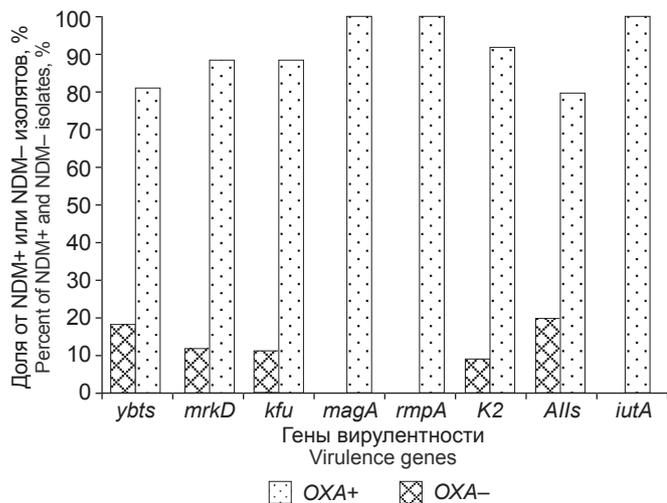


Рис. 5. Распределение генов вирулентности у OXA+ и у OXA- изолятов *K. pneumoniae*. OXA – оксациллиназы.

Fig. 5. The distribution of Virulence genes in OXA+ and OXA- isolates of *K. pneumoniae*. OXA – oxacillinase.

Обсуждение

Преимущественное выявление NDM-резистентных изолятов во всех изученных выборках объясняется тем, что гены резистентности бактерий к антибиотикам различаются в зависимости от региона. NDM, впервые обнаруженные в связи с регионом Индии, были обнаружены как в госпитальных образцах [21], так и во внешней водной среде [22]. Ближний Восток (Объединённые Арабские Эмираты, Ирак, Кувейт, Оман) считается крупным резервуаром NDM-продуцирующих клебсиелл и иных представителей *Enterobacteriaceae* [6, 8]. Балканы также были показаны как эндемичный регион для NDM-изолятов клебсиелл [23]. В Европе (Германия, Швейцария, Италия) и Канаде отмечались вспышки заболеваний, вызванных карбапенем-устойчивыми клебсиеллами, в том числе NDM, однако вопрос эндемичности для указанных регионов остаётся открытым [13, 24–26].

Достаточно высокое содержание NDM-изолятов в группе здоровых лиц и из поверхностных вод свидетельствует о широком распространении антибиотикоустойчивости, что несёт потенциальные риски для эпидемиологической ситуации. Ранее сообщалось также о выявлении генов NDM у изолятов энтеробактерий от здоровых лиц из Китая и Нигерии [27, 28] и в речных водах Индии и Бангладеш [29, 30].

Вирулентный ген *rmpA*, ассоциированный с карбапенемазой NDM, – это ген гипермукоидного фенотипа, а из

данных литературы известно, что определяющим фенотипическим признаком гипервирулентных *Kp* является гипермукоидный фенотип (ГМ). Этот фенотип легко выявляется «нитевым тестом»: колония бактерий на агаровой чашке может быть растянута инокуляционной петлёй как минимум на 5 мм [31]. Различные варианты этого гена могут располагаться как в плазмидной, так и в хромосомной части генома бактерий [32]. Другой ген вирулентности *iutA*, также ассоциированный с карбапенемазой, вовлечён в систему поглощения железа, включающую секрецию сидерофоров (белков и пептидов, ответственных за захват и импорт ионов железа), также способен вносить вклад в патогенез, индуцируя воспаление и усиленный бактериальный рост [33]. В геноме клебсиелл кластер, включающий *iutA*, выявлялся в составе вирулентных конъюгирующих плазмид, причём в составе тех же плазмид мог обнаруживаться и ген *rmpA* [34].

Ассоциированность данных генов вирулентности и генов устойчивости NDM вполне объяснима, поскольку [35, 36] было показано, что у некоторых штаммов клебсиелл они находятся на одной вирулентной конъюгирующей плазмиде. Для других штаммов показано одновременное наличие в конкретном изоляте отдельных плазмид, содержащих данные гены [37].

Заключение

Анализ материалов различных источников показал, что у *K. pneumoniae* наиболее распространённым вариантом резистентности к антибиотикам были NDM (13,5%) и OXA (8%). При этом NDM в отличие от остальных генов устойчивости встречается во всех группах изолятов с частотой 11–28%. На примере гена металло-β-лактамазы NDM у *K. pneumoniae* наблюдалась ассоциация между маркерами резистентности и маркерами вирулентности *rmpA* и *iutA*. Значительный процент резистентных штаммов у здоровых доноров и в сточных и поверхностных водах требует дальнейшего изучения роли NDM+ штаммов в патогенности выделенных *K. pneumoniae*.

В настоящее время в условиях бесконтрольного использования лекарственной терапии повышенное внимание привлекает к себе проблема загрязнения водной среды лекарственными препаратами и, как следствие, циркуляции лекарственноустойчивых бактериальных штаммов в сточных и поверхностных водах. Особое место в этом ряду занимают антибиотики, которые в процессе их очистки на канализационных очистных сооружениях полностью не удаляются из сточных вод и попадают в природные водоёмы и питьевую воду. В связи с малой изученностью остаются открытыми все аспекты данной проблемы: мониторинг антибиотиков в водах, взаимодействие с другими препаратами, оценка степени токсичности, определение эффективности методов их удаления из сточных вод при обеззараживании, их влияние на формирование антибиотикорезистентности и вирулентности бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

(п.п. 1–14, 17–34 см. в References)

- Журавлёв П.В., Алешня В.В., Панасовцев О.П. Антибиотикорезистентность бактерий, выделенных из воды открытых водоёмов. *Здоровье населения и среда обитания*. 2015; (5): 24–6.
- Рахманин Ю.А., Иванова Л.В., Артемова Т.З., Гипп Е.К., Загайнова А.В., Максимкина Т.Н., Красняк А.В., Журавлев П.В., Алешня В.В., Панасовцев О.П. Распространение бактерий рода *Klebsiella* в водных объектах и их значение в возникновении водообусловленных острых кишечных инфекций. *Гигиена и санитария*. 2016; 95(4): 397–406.
- Журавлёв П.В., Алешня В.В., Панасовцев О.П. Изучение факторов патогенности потенциально патогенной микрофлоры, выделенной из водных объектов. *Здоровье населения и среда обитания*. 2018; (1): 7–11.
- Рекомендации «Определение чувствительности к антимикробным препаратам». Доступно: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>
- Пай Г.В., Ракигина Д.В., Панькова М.Н., Юдин С.М., Загайнова А.В. Сравнение патогенного потенциала изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кишечной микрофлоры человека, из поверхностных и сточных вод. *Гигиена окружающей среды. Гигиена и санитария*. 2020; 99(12): 1360–4. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1360-1364>

REFERENCES

- Khan A.U., Maryam L., Zarrilli R. Structure, genetics and worldwide spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. *BMC Microbiol.* 2017; 17(1): 101. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
- Mena A., Plasencia V., García L., Hidalgo O., Ayestarán J.I., Alberti S., et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(8): 2831–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.00418-06>
- Cagnacci S., Gualco L., Roveta S., Mannelli S., Borgianni L., Docquier J.D., et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- β -lactamase: first Italian outbreak. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008; 61(2): 296–300. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm471>
- Nordmann P., Cuzon G., Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 2009; 9(4): 228–36. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(09\)70054-4](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(09)70054-4)
- Poirel L., Naas T., Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(1): 24–38. <https://doi.org/10.1128/aac.01512-08>
- Sonnevend A., Al Baloushi A., Ghazawi A., Hashmey R., Girgis S., Hamadeh M.B., et al. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62(Pt. 7): 1044–50. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059014-0>
- Peseky M.W., Hussain T., Wallace M., Wang B., Andleeb S., Burnham C.A., et al. KPC and NDM-1 genes in related Enterobacteriaceae strains and plasmids from Pakistan and the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(6): 1034–7. <https://doi.org/10.3201/eid2106.141504>
- Dortet L., Poirel L., Al Yaqoubi F., Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18(5): E144–8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03796.x>
- Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2010; 10(9): 597–602. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(10\)70143-2](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(10)70143-2)
- Ma L.C., Fang C.T., Lee C.Z., Shun C.T., Wang J.T. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(1): 117–28. <https://doi.org/10.1086/430619>
- Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016; 80(3): 629–61. <https://doi.org/10.1128/mmr.00078-15>
- Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U., et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(9): e00776–18. <https://doi.org/10.1128/jcm.00776-18>
- European Centre for Disease Prevention and Control. Outbreak of carbapenemase-producing (NDM-1 and OXA-48) and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307, north-east Germany, 2019. Stockholm: ECDC; 2019. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/outbreak-klebsiella-pneumoniae-germany>
- Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18(1): 37–46. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30489-9)
- Zhuravlev P.V., Alyoshnya V.V., Panasovets O.P. Antibiotic resistance of bacteria isolated from the water of open reservoirs. *Public health and habitat.* 2015; (5): 24–6.
- Rakhmanin Yu.A., Ivanova L.V., Artemova T.Z., Gipp E.K., Zagaynova A.V., Maksimkina T.N., Krasnyak A.V., Zhuravlev P.V., Aleshnya V.V., Panasovets O.P. Prevalence of bacteria of the genus *Klebsiella* in water bodies and their importance in the occurrence of videobuilding acute intestinal infection. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2016; 95(4): 397–406.
- Zhuravlev P.V., Alyoshnya V.V., Panasovets O.P. Study of pathogenicity factors of potentially pathogenic microflora isolated from water bodies. *J. Population health and habitat.* 2018; (1): 7–11.
- Recommendations «Antibiotic-resistance test». Available at: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf> (in Russian)
- Pay G.V., Rokitina D.V., Pankova M.N., Zagaynova A.V. Comparison of the pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* isolates from human intestinal microbiota, surface waters, and sewage. *Environmental hygiene. Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal).* 2020; 99(12): 1360–4. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12> (in Russian)
- Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Ailloud F., et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(12): 4377–80. <https://doi.org/10.1128/jcm.02316-14>
- Yong D., Toleman M.A., Giske C.G., Cho H.S., Sundman K., Lee K., et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(12): 5046–54. <https://doi.org/10.1128/aac.00774-09>
- Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(5): 355–62. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70059-7)
- Dortet L., Poirel L., Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 249856. <https://doi.org/10.1155/2014/249856>
- Tavoschi L., Forni S., Porretta A., Forni L., Pieralli F., Menichetti F., et al. Prolonged outbreak of New Delhi metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriales (NDM-CRE), Tuscany, Italy, 2018 to 2019. *Euro Surveill.* 2020; 25(6): 2000085. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.6.2000085>
- Poirel L., Dortet L., Bernabeu S., Nordmann P. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(11): 5403–7. <https://doi.org/10.1128/aac.00585-11>
- Mulvey M.R., Grant J.M., Plewes K., Roscoe D., Boyd D.A. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(1): 103–6. <https://doi.org/10.3201/eid1701.101358>
- Shen Z., Hu Y., Sun Q., Hu F., Zhou H., Shu L., et al. Emerging carriage of NDM-5 and MCR-1 in *Escherichia coli* from healthy people in multiple regions in China: A Cross Sectional Observational Study. *EClinicalMedicine.* 2018; 6: 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2018.11.003>
- Onanuga A., Eboh D., Odetoyn B., Adamu O. Detection of ESBLs and NDM-1 genes among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from healthy students in Niger Delta University, Amassoma, Bayelsa State, Nigeria. *PAMJ-OH.* 2020; 2: 12. <https://doi.org/10.11604/pamj-oh.2020.2.12.23588>
- Toleman M.A., Bugert J.J., Nizam S.A. Extensively drug-resistant New Delhi metallo- β -lactamase – encoding bacteria in the environment, Dhaka, Bangladesh, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(6): 1027–30. <https://doi.org/10.3201/eid2106.141578>
- Ahammad Z.S., Sreerishnan T.R., Hands C.L., Knapp C.W., Graham D.W. Increased waterborne blaNDM-1 resistance gene abundances associated with seasonal human pilgrimages to the Upper Ganges River. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48(5): 3014–20. <https://doi.org/10.1021/es405348h>
- Fang C.T., Chuang Y.P., Shun C.T., Chang S.C., Wang J.T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.* 2004; 199(5): 697–705. <https://doi.org/10.1084/jem.20030857>
- Hsu C.R., Lin T.L., Chen Y.C., Chou H.C., Wang J.T. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology (Reading).* 2011; 157(Pt. 12): 3446–57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050336-0>
- Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 α Stabilization during *Pneumonia*. *mBio.* 2016; 7(5): e01397–16. <https://doi.org/10.1128/mbio.01397-16>
- Holt K.E., Wertheim H., Zadoks R.N., Baker S., Whitehouse C.A., Dance D., et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(27): E3574–81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Turton J.F., Payne Z., Coward A., Hopkins K.L., Turton J.A., Doumith M., et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and ‘non-hypervirulent’ types ST147, ST15 and ST383. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(1): 118–28. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000653>
- Turton J., Davies F., Turton J., Perry C., Payne Z., Pike R. Hybrid Resistance and Virulence Plasmids in «High-Risk» Clones of *Klebsiella pneumoniae*, Including Those Carrying blaNDM-5. *Microorganisms.* 2019; 7(9): 326. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090326>
- Yuan Y., Li Y., Wang G., Li C., Chang Y.F., Chen W., et al. blaNDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8: 140. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0596-1>