

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ НОЗОКОМИАЛЬНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* К ПОЛИМИКСИНАМ И АНТИБИОТИКАМ ДРУГИХ ГРУПП ПО ДАННЫМ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

ПЕТРОВСКАЯ Т.А.¹, КАРПОВА Е.В.¹, ТАПАЛЬСКИЙ Д.В.¹, МОЖАРОВСКАЯ Л.В.²,
БАРАНОВ О.Ю.²

¹Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Республика Беларусь

²Институт леса Национальной академии наук Беларуси, г. Гомель, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2021. – Том 20, №5. – С. 34-41.

MOLECULAR MECHANISMS OF RESISTANCE OF NOSOCOMIAL STRAINS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* TO POLYMYXINS AND ANTIBIOTICS OF OTHER GROUPS ACCORDING TO WHOLE GENOME SEQUENCING DATA

PETROVSKAYA T.A.¹, KARPOVA E.V.¹, TAPALSKI D.V.¹, MOZHAROVSKAYA L.V.², BARANOV O.Y.²

¹Gomel State Medical University, Gomel, Republic of Belarus

²Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Gomel, Republic of Belarus

Vestnik VGMU. 2021;20(5):34-41.

Резюме.

Выявление многочисленных механизмов резистентности к колистину и другим антибиотикам возможно при помощи метода полногеномного секвенирования.

Цель исследования – оценить молекулярно-генетические механизмы устойчивости к полимиксидам и антибиотикам других групп у нозокомиальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

Материал и методы. Для 13 штаммов *K. pneumoniae* с множественной и экстремальной устойчивостью к антибиотикам выполнено полупроводниковое секвенирование в геномном секвенаторе Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США). Проведена сборка геномных последовательностей и их аннотация. Для прогнозирования влияния нуклеотидных замен на структуру аминокислотных последовательностей и функциональную активность белков использовали программный инструмент PROVEAN. Идентификация генов антибиотикорезистентности и поиск механизмов эффлюкса осуществлялись с помощью веб-ресурсов ResFinder v4.1. и CARD.

Результаты. У всех штаммов были обнаружены гены β-лактамаз одновременно нескольких типов, а также гены устойчивости к фосфомицину. Гены устойчивости к аминогликозидам выявлены у 11 штаммов, к хлорамфениколу – у 10, к рифампицину – у 5, к макролидам – у 4. Гены фосфоэтанолламинтрансферазы *mcr* отсутствовали у всех штаммов. При сопоставлении исследуемых образцов с референсным штаммом *K. pneumoniae* ATCC 700603 выявлены функционально значимые замены в гене *pmrB* (D150Y, T157P, G207S). Также обнаружены изменения гена *mgrB* у колистинорезистентных штаммов (замена W20R, инсерционная инактивация гена транспозонами семейств IS1, IS4 и IS5).

Заключение. Результаты полногеномного секвенирования отражают значительную устойчивость нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae* к большинству антибиотиков, включая β-лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, фосфомицин, хлорамфеникол, полимиксины. Выявлены генетические детерминанты устойчивости к колистину (инсерционная инактивация и делеция гена *mgrB*, замены D150Y, T157P и G207S в гене *pmrB*) у штаммов с МПК колистина 64-128 мг/л и их отсутствие у колистиночувствительных штаммов.

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

Abstract.

Identification of numerous mechanisms of resistance to colistin and other antibiotics is possible using whole genome sequencing.

Objectives. To assess the molecular-genetic mechanisms of resistance to polymyxins and antibiotics of other groups in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains.

Material and methods. For 13 multidrug- and extensively drug-resistant *K. pneumoniae* strains semiconductor sequencing was performed in the Ion PGM System genomic sequencer (Thermo Fisher Scientific, USA). The assembly of genomic sequences and their annotation were carried out. The PROVEAN software tool was used to predict the influence of nucleotide replacements on the structure of amino acid sequences and functional activity of proteins. The identification of antibiotic resistance genes and the search for efflux mechanisms were performed by the ResFinder v.4.1 and CARD web resources.

Results. Several types of β -lactamase genes were detected simultaneously in all strains, as well as genes of resistance to fosfomycin. Genes of resistance to aminoglycosides were identified in 11 strains, to chloramphenicol – in 10, to rifampicin – in 5, to macrolides – in 4. The mcr phosphoethanolamine transferase genes were absent in all strains. Functionally significant substitutions were revealed in the pmrB gene (D150Y, T157P, G207S) comparing the studied samples with the reference *K. pneumoniae* strain ATCC 700603. Changes in the mgrB gene were also found in colistin-resistant strains (W20R replacement, insertional inactivation of the gene by transposons of the IS1, IS4 and IS5 families).

Conclusions. The results of whole genome sequencing represent the significant resistance of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains to the majority of antibiotics including β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, fosfomycin, chloramphenicol, polymyxins. Genetic determinants of colistin resistance were revealed (insertional inactivation and deletion of the mgrB gene; D150Y, T157P and G207S substitutions in the pmrB gene) in strains with colistin MIC 64-128 mg/l and their absence in colistin-susceptible strains.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, colistin, antibiotic resistance, whole genome sequencing.

Вынужденное широкое использование полимиксинов в качестве антибиотиков «последнего резерва» для лечения тяжелых нозокомиальных бактериальных инфекций привело к появлению резистентных к ним штаммов *Klebsiella pneumoniae* [1]. Известно, что использование колистина (полимиксина E) является независимым фактором риска возникновения резистентности к нему у грамотрицательных бактерий в клинических условиях. Показано, что колонизация или инфицирование устойчивыми к колистину штаммами *K. pneumoniae* связаны с предыдущим употреблением колистина [2].

Устойчивость *K. pneumoniae* к полимиксинам может быть связана с несколькими механизмами. Основным механизмом является модификация мишени, регулируемая комплексом генов, получившим общее название «система модификации ЛПС». Модификация ЛПС обеспечивается мутациями в нескольких генах, обеспечивающих созревание липида A (*lpxM* и его регулятор *gamA*), а также включением в состав липида A аминокислоты (гены *pbpP*, *pmrE*), фосфоэтаноламина (*pmrC*) или пальмитата (*pagP*). Дополнительными механизмами устойчивости к полимиксинам является маскировка заряженных молекул в составе наружной мембраны клеточной стенки капсуль-

ными полисахаридами, а также гиперактивация эффлюксных насосов AcrAB-TolC и KpnEF [3].

Устойчивость к полимиксинам у *K. pneumoniae* также может быть вызвана изменениями в двухкомпонентных регуляторных системах PhoPQ и PmrAB, а также инактивацией гена *mgrB*. Сенсорная киназа PhoQ представляет собой трансмембранный белок, периплазматический домен которого участвует в обнаружении сигнала. Он активируется низким уровнем внеклеточного магния (Mg^{2+}), низкими значениями pH (pH 5,5) или присутствием катионных антимикробных пептидов. При активации PhoQ он активирует PhoP путем фосфорилирования. После этого PhoP активирует экспрессию PmrHFIJKLM, связываясь с его промотором. Оперон *pmrHFIJKLM* кодирует синтез ферментов, отвечающих за синтез и перенос 4-амино-4-дезоксид-арабинозы (LAra4N), обладающей катионными свойствами. Добавление LAra4N к липиду A приводит к устойчивости к полимиксинам за счет модификации липополисахаридной мишени [3].

MgrB, небольшой регуляторный трансмембранный белок из 47 аминокислот, продуцируется при активации сигнальной системы PhoPQ. Благодаря взаимодействиям между белком MgrB и периплазматическим доменом PhoQ, MgrB не-

гativamente регулирует систему PhoP / PhoQ. MgrB подавляет фосфорилирование PhoP путем ингибирования активности киназы PhoQ либо стимуляции активности фосфатазы. Фосфорилирование PhoP увеличивает транскрипцию гена *mgrB*. Следовательно, MgrB является частью цепи отрицательной обратной связи в сигнальной цепи PhoQ / PhoP. Показано, что инсерционная инактивация гена *mgrB* часто является причиной приобретенной устойчивости к колистину у *K. pneumoniae*. Инактивация *mgrB* устраняет негативную регуляцию и активирует систему PhoPQ, что приводит к накоплению LAra4N, модификации ЛПС и, в конечном итоге, устойчивости к колистину [3].

Плазмидно-опосредованная устойчивость к полимиксидам впервые описана в Китае в 2016 г. Кодированная плазмидным геном *mcr-1* фосфоэтаноламинтрансфераза модифицирует липид А, присоединяя к нему фосфоэтаноламин (активность аналогична хромосомному гену *pmrC*) [4]. В настоящее время широкое распространение *mcr-1* среди энтеробактерий отмечается во многих странах и регионах мира [5]. Представляют значительный научный и практический интерес данные о наличии и распространенности плазмидно-опосредованной устойчивости к полимиксидам у экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий, циркулирующих в Беларуси.

Цель работы – оценить молекулярно-генетические механизмы устойчивости к полимиксидам и антибиотикам других групп у нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae* с использованием метода полногеномного секвенирования.

Материал и методы

Из рабочей коллекции отобрано 13 штаммов *K. pneumoniae* с множественной (MDR – multidrug resistance) или экстремальной (XDR – extensively drug resistance) устойчивостью к антибиотикам. Штаммы были выделены от госпитализированных пациентов в 2016–2020 гг. в ходе многоцентровых исследований в организациях здравоохранения Гомеля (4 штамма), районных центров Гомельской области (3 штамма), а также Витебска (4 штамма) и Минска (2 штамма).

Определение чувствительности к колистину и меропенему выполнено методом последовательных микроразведений. Двукратные последовательные разведения антибиотиков готовили в МХБ («BD», США). Тестирование проводили в

стерильных 96-луночных полистироловых планшетах («Sarstedt», Германия) в соответствии с ISO 20776-1:2006 [6]. Категории чувствительности изолятов к антибиотикам (R, I и S) определяли на основании пограничных значений МПК, установленных Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам EUCAST [7]. Качество исследований контролировали с использованием штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Для проведения полногеномного секвенирования культуры микроорганизмов выращивали на питательном агаре (Nutrient agar, HiMedia, Индия) в течение 24 ч при 35°C. Одну 2 мкл пластиковую петлю выделенной культуры вносили в 1 мл деионизированной воды, суспендировали, отмытые клетки осаждали центрифугированием 5 мин при 10 000 об./мин, удаляли супернатант. Выделение ДНК из бактериальных культур проводили с использованием коммерческого набора (NucleoSpin Microbial DNA, «Macherey-Nagel») в соответствии с инструкцией производителя.

Для определения качественных и количественных характеристик полученной ДНК проводили предварительный спектрофотометрический анализ с помощью спектрофотометра ND-1000, («NanoDrop Technologies», США). Для дальнейшего анализа использовали образцы с соотношением экстинкций $A_{260}/A_{280} \geq 1,67$, $A_{260}/A_{230} \geq 1,90$, $A_{320} \rightarrow 0$. Проводилась очистка препаратов бактериальной ДНК от содержания примесей РНК с использованием фермента РНКазы А («ThermoFisher Scientific», США) и набора Agencourt AMPure XP («Beckman Coulter», США).

Создание библиотек ДНК-фрагментов (ожидаемый размер рида ≈ 200 п.н.) выполняли с использованием набора Ion Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher Scientific, США). Качество библиотек фрагментов проверяли с применением методов электрофоретического фракционирования, спектрофотометрии и полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Полученные ДНК-библиотеки в дальнейшем использовались в качестве матрицы для проведения эмульсионной ПЦР (эПЦР). Применялись адаптеры со штрих-кодом Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (баркодирование) для объединения ДНК-библиотек перед эмульсионной ПЦР. Реакционная смесь для эПЦР приготавливалась с использованием набора Ion PGM Hi-Q OT2 Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Эмульсионную ПЦР выполняли в мо-

дуле-амплификаторе Ion OneTouch 2 Instrument системы Ion OneTouch (Thermo Fisher Scientific, США). Автоматическое обогащение микросфер Ion Sphere проводилось на основе использования модуля автоматической пробоподготовки Ion OneTouch ES с применением наборов Ion PGM Hi-Q OT2 Solutions и Ion PGM Enrichment Beads (Thermo Fisher Scientific, США). Полупроводниковое секвенирование проводилось в геномном секвенаторе Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, США) на основе использования микрочипов Ion 314 Chip v2, Ion 318 Chip v2 и набора Ion PGM Hi-Q Sequencing 200 Kit.

Первоначальная обработка данных, поступающих от геномного секвенатора, в том числе и предварительное выравнивание, осуществлялась в автоматическом режиме на основе программного обеспечения Ion Torrent Suite v. 4.1 (Thermo Fisher Scientific, США) с представлением выходных данных в формате BAM. Сборку геномных последовательностей и их аннотацию выполняли с помощью программного пакета Unipro UGENE v.1.29.0. Инсерционные элементы идентифицировали в базе NCBI с помощью ресурса Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>). Трансляция нуклеотидных последовательностей в аминокислотные выполнялась с помощью программного обеспечения CLC Sequence Viewer v.8.0 (QIAGEN). Сравнения исследуемых аминокислотных последовательностей продуктов трансляции осуществляли с помощью ресурса Protein BLAST. Для моделирования структуры полипептидов использовали онлайн-ресурс Protein 3D structure SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>). Функциональная аннотация транслируемых полипептидов производилась в базе данных консервативных доменов NCBI CD (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Для прогнозирования влияния нуклеотидных замен на структуру аминокислотных последовательностей и функциональную активность белков использовали программный инструмент PROVEAN.

Для идентификации генов антибиотикорезистентности и поиска механизмов эффлюкса асемблированные последовательности были проанализированы с помощью веб-ресурса ResFinder v4.1. Значение минимального порога идентичности последовательностей было установлено на уровне 98%, при степени перекрытия не менее 80%. Последовательности также были проанализированы на предмет точных совпадений с помощью инструментов, доступных в комплекс-

ной базе данных по исследованиям антибиотиков (Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD), с идентичностью >96%.

Результаты

Молекулярно-генетические механизмы устойчивости *K.pneumoniae* к полимиксинам

По результатам анализа, выполненного в системах поиска генетических детерминант антибиотикорезистентности ResFinder и CARD, гены плазмидно-опосредованных фосфоэтаноламинтрансфераз *mcr* отсутствовали у всех штаммов.

В ходе сопоставления последовательностей генов *pmrA*, *pmrB*, *phoP* и *phoQ* исследованных образцов с референсным штаммом *K.pneumoniae* ATCC 700603 было выявлено наличие ряда несинонимичных однонуклеотидных замен (SNP), не приводящих к изменению функциональной активности продуктов трансляции. Так, в гене *phoP* всех штаммов присутствовал полиморфизм, приводящий к замене лизина на аргинин в 34-й позиции (K34R). Ген *pmrA* всех исследуемых штаммов отличался от референсной последовательности пятью несинонимичными нуклеотидными заменами, приводящими к заменам аминокислот A64S, D131N, Q140L, D199E, H219N. Только замена Q140L была маркирована программой PROVEAN как влияющая на функциональную активность белка, однако она присутствовала как у колистиночувствительных (БК-104, БК-148, 420, 9068), так и у колистинорезистентных штаммов (табл. 1). В гене *phoQ* всех штаммов присутствовали одинаковые замены, не влияющие на функциональную активность белка: K64R, K92Q, T106A, D112E, V139I, F163L, I196V, S372T, P424Q, L482Q, E487Q.

Выявлен ряд функционально значимых замен в гене *pmrB*, присутствующих только у колистинорезистентных штаммов: D150Y у штамма *K.pneumoniae* БК-167 с (МПК колистина 64 мг/л), T157P у штамма *K.pneumoniae* 37999 (МПК колистина 64 мг/л), G207S у штаммов *K.pneumoniae* МК-07 (МПК колистина 64 мг/л) и *K.pneumoniae* БК-045 (МПК колистина 64 мг/л). Замена R256G в гене *pmrB* также была маркирована программным обеспечением PROVEAN как функционально значимая, однако она присутствовала как у колистинорезистентных (у 8 из 9), так и у колистиночувствительных (у 3 из 4) штаммов.

Последовательности гена *mgrB* всех колистиночувствительных штаммов не отличались от референсных. У колистинорезистентного штамма

Таблица 1 – Минимальные подавляющие концентрации колистина для клинических изолятов *K.pneumoniae* и несинонимичные мутации в генах устойчивости к колистину, приводящие к изменению функциональной активности

Штамм	Город	МПК колистина, мг/л	<i>mgrB</i>	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>
БК-104	Гомель	1	WT	Q140L	R256G		
БК-148	Гомель	1	WT	Q140L			
420	Витебск	2	WT	Q140L	R256G		G360R
9068	Витебск	1	WT	Q140L	R256G		
БК-045	Рогачев	64	инсерционная инактивация гена транспозоном семейства IS4	Q140L	G207S R256G		
БК-167	Гомель	64	WT	Q140L	D150Y R256G		
БК-168	Гомель	128	W20R	Q140L	R256G		
БК-170	Речица	128	WT	Q140L	R256G		
БК-171	Светлогорск	128	WT	Q140L	R256G		
МК-07	Минск	64	инсерционная инактивация гена транспозоном семейства IS5	Q140L	G207S R256G		
2564	Витебск	128	инсерционная инактивация гена транспозоном семейства IS1	Q140L	R256G		
3125	Витебск	128	инсерционная инактивация гена транспозоном семейства IS5	Q140L			
37999	Минск	64	WT	Q140L	T157P R256G		

K.pneumoniae БК-168 (МПК колистина 128 мг/л) в *mgrB* присутствовала функционально значимая замена W20R. Еще у 4 штаммов устойчивость к колистину была вызвана инсерционной инактивацией генов *K. pneumoniae* транспозонами семейств IS1, IS4 и IS5. Указанные штаммы (*K.pneumoniae* МК-07, *K.pneumoniae* БК-045, *K.pneumoniae* 3125, *K.pneumoniae* 2564) имели МПК колистина 64-128 мг/л. У двух колистинорезистентных штаммов (*K.pneumoniae* БК-170, *K.pneumoniae* БК-171) не удалось выявить значимые механизмы устойчивости в анализируемых генах.

Молекулярно-генетические механизмы устойчивости *K.pneumoniae* к антибиотикам разных групп

У всех штаммов, для которых выполнялось полногеномное секвенирование, были обнаруже-

ны гены β-лактамаз одновременно нескольких типов. У большинства штаммов отмечено присутствие β-лактамаз SHV-типа: SHV-1, SHV-11, SHV-31, SHV-33, SHV-67, SHV-107, SHV-182. У 9 из 13 штаммов отмечено присутствие ферментов CTX-M (β-лактамазы расширенного спектра, БЛРС). Присутствие β-лактамаз TEM-типа выявлено у 7 штаммов, OXA-типа (без карбапенемазной активности – OXA-1, OXA-9) – у 8 штаммов. У всех штаммов выявлены гены карбапенемаз – β-лактамаз, способных гидролизовать карбапенемы, а также большинство других β-лактамных антибиотиков [8]. Присутствие *bla*_{OXA-48} выявлено у 6 штаммов, *bla*_{KPC} – у 2 штаммов, *bla*_{NDM} – у 2 штамма. Еще для 3 штаммов отмечена копродукция карбапенемаз одновременно двух типов (*bla*_{OXA-48} и *bla*_{NDM} – у 2 штаммов, *bla*_{OXA-48} и *bla*_{KPC} – у 1 штамма). У выделенного в Витеб-

ске штамма *K.pneumoniae* 2564 выявлена ко-продукция двух сериновых карбапенемаз ОХА-48 и КРС. Все штаммы с выявленными генами карбапенемаз были устойчивы к карбапенемам (МПК меропенема ≥ 8 мг/л).

Гены устойчивости к аминогликозидам выявлены у 11 из 13 штаммов, наиболее распространенными были *aac(6'0)Ib-cr* и *aac(6'0)Ib-Hangzhou*, кодирующие производные аминогликозидацетилтрансферазы, их присутствие отмечено у 11 из 13 штаммов. Все штаммы имели генетические детерминанты устойчивости к фторхинолонам (мутации в *gyrA* и *parC* – у 1 штамма, *qnr* – у 12 штаммов).

Ген *FosA*, отвечающий за устойчивость к фосфомицину, выявлен у всех 13 изолятов. Таким образом, данный антибиотик не может эмпирически использоваться в качестве препарата резерва для лечения инфекций, вызванных карбапенеморезистентными штаммами *K.pneumoniae* [9]. Гены хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*catA1*, *catB3*, *catI*) выявлены у 10 из 13 штаммов, в том числе у всех представителей ST395. Детерминанты устойчивости к рифампицину (*arr2*, *arr3*) выявлены у 5 штаммов, к макролидам (*mphA*, *msrE*) – у 4 штаммов. У всех штаммов отмечено присутствие различных систем активного выведения антибиотиков из микробной клетки.

Обсуждение

Замена R256G в гене *pmrB* маркирована как функционально значимая, однако она присутствовала как у колистинорезистентных (у 8 из 9), так и у колистиночувствительных (у 3 из 4) штаммов. В работе X. Wang et al. было показано, что замена R256G не связана с устойчивостью к колистину. В частности, она была обнаружена как у колистинорезистентных (13 из 17), так и у чувствительных (10 из 20) штаммов *K.pneumoniae* [10]. Значение замены T157P в гене *pmrB* в формировании устойчивости к колистину ранее было обнаружено в работе S. Lomonaco et al. Указанная замена была выявлена у трех колистинорезистентных штаммов *K.pneumoniae* с интактным геном *mgrB* [11]. Функционально значимая замена W20R в гене *mgrB*, выявленная у колистинорезистентного штамма *K.pneumoniae* БК-168, ранее обнаруживалась у штаммов *K.pneumoniae* с МПК колистина 16 мг/л [12].

Обнаруженная у штамма *K.pneumoniae* 2564 ко-продукция двух сериновых карбапене-

маз ОХА-48 и КРС является крайне редким явлением и, по данным ресурса AMR Map, ранее не встречалась в Беларуси и России [13]. Выявление и дифференцировка карбапенемаз важны для эффективного применения новых ингибиторозащитных β -лактамов – цефтазидима / авибактама, азтреонама/авибактама, меропенема / ваборбактама, имипенема/релебактама, активных только в отношении карбапенемаз определенных типов [14].

Выявленные гены *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* кодируют белки группы пентапептидных повторов, которые защищают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от ингибирования фторхинолонами, как правило, имеют плазмидную локализацию и, как следствие, способность к быстрому горизонтальному распространению в бактериальных популяциях [15].

Заключение

Результаты полногеномного секвенирования отражают значительную устойчивость нозокомиальных штаммов *K.pneumoniae* к большинству антибиотиков, включая β -лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, фосфомицин, хлорамфеникол, полимиксины. Показано наличие генов карбапенемаз (*bla*_{ОХА-48}, *bla*_{КРС}, *bla*_{NDM}) у всех штаммов. Выявлены генетические механизмы устойчивости к колистину (инсерционная инактивация и делеция гена *mgrB*, замены D150Y, T157P и G207S в гене *pmrB*) у штаммов с МПК колистина 64-128 мг/л и их отсутствие у колистиночувствительных штаммов.

Источники финансирования. Исследование проведено в рамках задания «Изучение биологических и молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости к полимиксинам у экстремально-антибиотикорезистентных грамотрицательных бактерий и обоснование комбинированной антибиотикотерапии вызываемых ими инфекций» ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицина», 2016-2020 гг.

Funding sources. This study was performed as a part of the task «Study of biological and molecular genetic mechanisms of the formation of resistance to polymyxins in extensively drug-resistant gram-negative bacteria and the rationale for combined antibiotic therapy of infections caused by them» SPSI «Basic and applied sciences – medicine», 2016-2020.

Литература

1. Тапальский, Д. В. Бактерицидная активность комбинаций антибиотиков в отношении экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* с устойчивостью к колистину / Д. В. Тапальский, Т. А. Петровская // Мед. новости. – 2020. – № 2. – С. 63–66.
2. Ah, Y. M. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* / Y. M. Ah, A. J. Kim, J. Y. Lee // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2014 Jul. – Vol. 44, N 1. – P. 8–15.
3. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution / K. L. Chew [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2017 Sep. – Vol. 55, N 9. – P. 2609–2616.
4. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study / Y-Y. Liu [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2016 Feb. – Vol. 16, N 2. – P. 161–168.
5. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene / M. R. Mulvey [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2016 Mar. – Vol. 16, N 3. – P. 289–290.
6. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. [Electronic resource]. – Mode of access: <https://www.iso.org/standard/41630.html> http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. – Date of access: 28.09.2021.
7. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. – Date of access: 28.09.2021.
8. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge / R. A. Bonomo [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2018 Apr. – Vol. 66, N 8. – P. 1290–1297.
9. Silver, L. L. Fosfomycin: mechanism and resistance / L. L. Silver // Cold Spring Harb. Perspect Med. – 2017 Feb. – Vol. 7, N 2. – Art. a025262.
10. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative *Klebsiella pneumoniae* / X. Wang [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2017 Oct. – Vol. 50, N 4. – P. 536–541.
11. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates / S. Lomonaco [et al.] // PLoS One. – 2018 Jun. – Vol. 13, N 6. – Art. e0198526.
12. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli / A. Jayol [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2018 May. – Vol. 73, N 5. – P. 1272–1278.
13. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia / A. Y. Kuzmenkov [et al.] // Front Microbiol. – 2021 Mar. – Vol. 12. – Art. 620002.
14. Shirley, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections / M. Shirley // Drugs. – 2018 Apr. – Vol. 78, N 6. – P. 675–692.
15. Jacoby, G. A. Plasmid-mediated quinolone resistance / G. A. Jacoby, J. Strahilevitz, D. C. Hooper // Microbiol. Spectr. – 2014 Oct. – Vol. 2, N 5. – Art. 10.1128.

Поступила 08.07.2021 г.

Принята в печать 11.10.2021 г.

References

1. Tapalskii DV, Petrovskaia TA. Bactericidal activity of antibiotic combinations against colistin-resistant extreme antibiotic-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. Med Novosti. 2020;(2):63-6. (In Russ.)
2. Ah YM, Kim AJ, Lee JY. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2014 Jul;44(1):8-15. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016
3. Chew KL, La M-V, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. J Clin Microbiol. 2017 Sep;55(9):2609-2616. doi: 10.1128/JCM.00268-17
4. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
5. Mulvey MR, Mataseje LF, Robertson J, Nash JHE, Boerlin P, Toyé B, et al. Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016 Mar;16(3):289-90. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00067-0
6. ISO 20776-1:2006 «Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices» – Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Available from: <https://www.iso.org/standard/41630.html> http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. [Accessed 28th September 2021].
7. EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures. Available from: http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/. [Accessed 24th September 2021].
8. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. Clin Infect Dis. 2018 Apr;66(8):1290-1297. doi: 10.1093/cid/cix893
9. Silver LL. Fosfomycin: mechanism and resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2017 Feb;7(2):a025262. doi: 10.1101/cshperspect.a025262
10. Wang X, Liu Y, Qi X, Wang R, Jin L, Zhao M, et al. Molecular epidemiology of colistin-resistant Enterobacteriaceae in inpatient and avian isolates from China: high prevalence of mcr-negative *Klebsiella pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents. 2017 Oct;50(4):536-541. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.009
11. Lomonaco Sara, Crawford M, Lascols C, Timme RE, Anderson K, Hodge DR, et al. Resistome of carbapenem-

- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. PLoS One. 2018 Jun;13(6):e0198526. doi: 10.1371/journal.pone.0198526
12. Jayol A, Nordmann P, André C, Poirel L, Dubois V. Evaluation of three broth microdilution systems to determine colistin susceptibility of Gram-negative bacilli. J Antimicrob Chemother. 2018 May;73(5):1272-1278. doi: 10.1093/jac/dky012
 13. Kuzmenkov AY, Trushin IV, Vinogradova AG, Avramenko AA, Sukhorukova MV, Malhotra-Kumar S, et al. AMRmap: an interactive web platform for analysis of antimicrobial resistance surveillance data in Russia. Front Microbiol. 2021 Mar;12:620002. doi: 10.3389/fmicb.2021.620002
 14. Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs. 2018 Apr;78(6):675-692. doi: 10.1007/s40265-018-0902-x
 15. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiol Spectr. 2014 Oct;2(5):10.1128. doi: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013

Submitted 08.07.2021

Accepted 11.10.2021

Сведения об авторах:

Петровская Т.А. – старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Гомельский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>;

Карпова Е.В. – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Гомельский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3952-6187>;

Тапальский Д.В. – д.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Гомельский государственный медицинский университет,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>;

Можаровская Л.В. – научный сотрудник лаборатории геномных исследований и биоинформатики, Институт леса НАН Беларуси,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>;

Баранов О.Ю. – д.б.н., доцент, заведующий лабораторией геномных исследований и биоинформатики, Институт леса НАН Беларуси,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0665-0093>.

Information about authors:

Petrovskaya T.A. – senior lecturer of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6580-3603>;

Karpova E.V. – lecturer of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3952-6187>;

Tapalski D.V. – Doctor of Medical Sciences, associate professor, head of the Chair of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9484-7848>;

Mozharovskaya L.V. – researcher of the Laboratory of Genomic Research and Bioinformatics, Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9106-1877>;

Baranov O.Y. – Doctor of Biological Sciences, associate professor, head of the Laboratory of Genomic Research and Bioinformatics, Forest Institute of the National Academy of Sciences of Belarus,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0665-0093>.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 246050, г. Гомель, ул. Ланге, 5, Гомельский государственный медицинский университет, кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии. E-mail: tapalskiy@gsmu.by – Тапальский Дмитрий Викторович.

Correspondence address: Republic of Belarus, 246050, Gomel, 5 Lange str., Gomel State Medical University, Chair of Microbiology, Virology and Immunology. E-mail: tapalskiy@gsmu.by – Dmitry V. Tapalski.