

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИЗУЧЕНИИ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ

DOI: 10.17691/stm2019.11.4.15

УДК 579.841/.842:615.33:615.015.8:616.9

Поступила 23.10.2018 г.



И.В. Белова, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции¹;

А.Г. Точилина, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиома человека и средств его коррекции¹;

О.В. Ковалишена, д.м.н., профессор, зав. кафедрой эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины²;

И.Ю. Широкова, к.м.н., руководитель отдела лабораторных исследований НИИ профилактической медицины Университетской клиники²;

Е.В. Беляева, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии¹;

Л.Ю. Послова, к.м.н., старший преподаватель кафедры эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины²;

Г.Б. Ермолина, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории микробиологии¹;

И.В. Соловьева, д.б.н., ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией микробиома человека и средств его коррекции¹

¹Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, 71, Н. Новгород, 603950;

²Приволжский исследовательский медицинский университет, пл. Минина и Пожарского, 10/1, Н. Новгород, 603005

Цель исследования — оценить эффективность применения комплекса молекулярно-генетических методов: ПЦР, RAPD и MLST — с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии в изучении особенностей госпитальных штаммов.

Материалы и методы. Проведена идентификация 23 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в педиатрическом стационаре, с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Autoflex и программно-аппаратного комплекса MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Чувствительность к антибиотикам исследовали на автоматическом бактериологическом анализаторе Phoenix-100 (Becton Dickinson, США) с помощью хромогенных питательных сред ф. HiMedia (Индия). Поиск детерминант резистентности и молекулярное типирование штаммов проводили с использованием методов ПЦР, RAPD и MLST.

Результаты. Все исследуемые штаммы были идентифицированы как *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*. Изучение чувствительности к антибиотикам позволило выделить три группы: 1-я группа (n=15) — чувствительные штаммы (wt); 2-я группа (n=7) — потенциальные производители карбапенемазы; 3-я группа (n=1) — производители бета-лактамаз расширенного спектра. У представителей 1-й и 2-й групп детерминант резистентности не выявлено, а у штамма из 3-й группы обнаружены бета-лактамазы *bla_{SHV}* и *bla_{CTX-M}*. Были установлены RAPD-тип данного штамма, капсульный тип (K-23) и принадлежность его к 17-му сиквенс-типу. Штаммы с данным сиквенс-типом выделяются на территории Российской Федерации крайне редко, однако известны в Европе, США и странах Азии. Они связаны с тяжелыми и летальными патологиями человека и обладают высоким эпидемическим потенциалом.

Заключение. Применение комплекса современных технологий для изучения фенотипических и генотипических свойств микроорганизмов позволило выделить и охарактеризовать госпитальный штамм *K. pneumoniae*, обладающий антибиотикорезистентностью, которая обусловлена наличием бета-лактамаз *bla_{CTX-M-15}* и *bla_{SHV-11}*, и представляющий опасность в плане трансмиссивного распространения детерминант резистентности.

Ключевые слова: *K. pneumoniae*; сиквенс-тип ST-17; антибиотикорезистентность, MLST; RAPD; ПЦР; MALDI-TOF спектроскопия.

Как цитировать: Belova I.V., Tochilina A.G., Kovalishena O.V., Shirokova I.Y., Belyaeva E.V., Poslova L.Y., Ermolina G.B., Solovyeva I.V. Current molecular genetic technologies to study hospital strains. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2019; 11(4): 126–134, <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.15>

Для контактов: Точилина Анна Георгиевна, e-mail: lab-lb@yandex.ru

English

Current Molecular Genetic Technologies to Study Hospital Strains

I.V. Belova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means for Its Correction¹;
 A.G. Tochilina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Human Microbiome and Means for Its Correction¹;
 O.V. Kovalishena, DSc, Professor, Head of Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine²;
 I.Y. Shirokova, PhD, Head of Laboratory Research, Research Institute of Preventive Medicine of University Clinic²;
 E.V. Belyaeva, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Microbiology¹;
 L.Y. Poslova, PhD, Senior Lecturer, Department of Epidemiology, Microbiology and Evidence-Based Medicine²;
 G.B. Ermolina, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology¹;
 I.V. Solovyeva, DSc, Leading Researcher, Head of Laboratory of Human Microbiome and Means for Its Correction¹

¹Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²Privolozhsky Research Medical University, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russia

The aim of the study was to assess the efficiency of a complex of molecular genetic techniques: PCR, RAPD, and MLST using MALDI-TOF mass-spectrometry to study the characteristics of hospital strains.

Materials and Methods. We identified 23 strains of *K. pneumoniae* isolated in a pediatric hospital using MALDI-TOF mass-spectrometer Autoflex and MALDI Biotyper software (Bruker Daltonics, Germany). Antibiotic sensitivity was analyzed by means of an automatic bacteriological analyzer Phoenix-100 (Becton Dickinson, USA) using chromogenic culture media (HiMedia, India). The search for resistance determinants and molecular typing were performed using PCR, RAPD, and MLST.

Results. All the strains were identified as *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*. According to antibiotic sensitivity, three groups were distinguished: group 1 (n=15) — sensitive strains (wt); group 2 (n=7) — potential carbapenemase-producers; group 3 (n=1) — extended-spectrum beta-lactamase producers. No resistance determinants were found in groups 1 and 2; beta-lactamases *bla_{SHV}* and *bla_{CTX-M}* were revealed in group 3 strain. We identified RAPD-type of the strain, a capsule type (K-23), it belonging to the sequence type 17. Strains with this sequence type are rarely isolated in Russia, however, they are known in Europe, USA, and Asian countries, they being associated with lethal human pathologies and a high epidemic potential.

Conclusion. The use of a complex of current techniques to study the phenotypic and genotypic properties of microorganisms enabled to isolate and characterize a hospital strain *K. pneumoniae*, which is antibiotic-resistant due to the presence of beta-lactamases: *bla_{CTX-M-15}* and *bla_{SHV-11}*, and it being dangerous in terms of resistance determinants transmission.

Key words: *K. pneumoniae*; sequence-type ST-17; antibiotic resistance; MLST; RAPD; PCR; MALDI-TOF spectroscopy.

Введение

Klebsiella pneumoniae — широко распространенный в природе представитель семейства *Enterobacteriaceae*, встречается в почве, поверхностных водах, на листьях растений, а также колонизирует слизистые оболочки млекопитающих, в том числе человека. В Российской Федерации, как и во всем мире, *K. pneumoniae* является клинически значимым госпитальным патогеном и вызывает широкий спектр патологий [1, 2].

Вспышечная заболеваемость, обусловленная этим микроорганизмом, регистрируется как в педиатрических стационарах, преимущественно в неонатальной реанимации и неонатологии, так и в стационарах хирургического и ортопедического профиля [3–5].

Выраженный патогенный потенциал *K. pneumoniae* обусловлен особенностями строения клетки: наличием липополисахаридной капсулы, которая препят-

ствует фагоцитозу и работе системы комплемента макроорганизма, и фимбрий нескольких типов, обеспечивающих успешную инвазию и образование биопленок. Микроорганизм продуцирует энтеротоксины и ряд ферментов — нейраминидазу, ДНК-азу, фосфатазу и сидерофоры (энтеробактин, аэробактин и др.), которые позволяют бактерии усваивать железо из клеток хозяина, повышая тем самым ее патогенный потенциал [6].

K. pneumoniae входят в группу антибиотикоустойчивых патогенов ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.*). По данным научной литературы, большинство госпитальных штаммов *K. pneumoniae* являются продуцентами бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и часто — карбапенемаз, расположенных на конъюгативных плазидах, т.е. ферментов, с которыми связывают высокие темпы распространения

антибиотикорезистентности в мире [7]. Данные штаммы зачастую обладают сочетанной устойчивостью к карбапенемам и цефалоспорином, что в ряде случаев может требовать пересмотра стандартных схем антимикробной терапии и включения в них антибиотиков резерва [8].

Изучение и мониторинг штаммов *K. pneumoniae* — важные направления исследований и в России, и за рубежом [9–13]. Одним из методов точной видовой идентификации микроорганизмов в последнее время является MALDI-TOF масс-спектрометрия [14], причем некоторые зарубежные исследователи предлагают использовать этот метод и для скрининга штаммов, несущих карбапенемазу bla_{KPC} (*K. pneumoniae* Carbapenemase — KPC), при наличии которой в масс-спектре регистрируется пик массой 11,109 Да. Данный пик связан с наличием белка p019, ген которого входит в состав транспозона Tn4401a, а он в 97,8% случаев представлен у KPC-положительных *K. pneumoniae* [15, 16]. Взаимосвязь данного пика с наличием bla_{KPC} признана статистически достоверной и используется в новом программном продукте, предложенном ф. Bruker Daltonics (Германия) — MALDI Biotyper Subtyping Module [17].

Для изучения чувствительности бактерий к антибиотикам используются современные хромогенные среды и автоматические бактериологические анализаторы, а для детекции генетических детерминант применяют тест-системы на основе ПЦР [18, 19]. Наиболее распространенными детерминантами бета-лактамаз *K. pneumoniae* в России на данный момент являются гены *CTX-M*, *TEM*, *SHV*, *OXA-48* и их сочетания [2, 13, 20–22].

Для типирования клинически значимых штаммов бактерий используют электрофорез в переменном поле (pulsed-field gel electrophoresis — PFGE), анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (restriction fragment length polymorphism — RFLP), а также методы амплификации нуклеиновых кислот: анализ полиморфизма амплифицированных фрагментов ДНК (random amplification of polymorphic DNA — RAPD), ПЦР межгенных повторов (enterobacterial repetitive intergenic consensus — ERIC-PCR) [21].

Для рутинного мониторинга за циркулирующими штаммами используют методы PFGE и RAPD. Метод PFGE признан «золотым стандартом» эпидемиологии, однако он относительно сложен в использовании и трудоемок. Среди преимуществ метода RAPD — доступность, методическая простота и короткий срок получения результата [23]. Этот метод успешно применяется и для типирования клинических штаммов *K. pneumoniae* [24–27].

Сделать заключительный вывод о патогенном потенциале, оценить клиническую роль и эпидемическую значимость изолята позволяет метод мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), основанный на анализе нуклеотидных последовательностей генов «домашнего хозяйства». Он позволяет определить си-

квенс-тип штамма и его клональную принадлежность, используя глобальные базы данных, сравнить исследуемый изолят со штаммами из различных регионов мира и изучить их взаимосвязь [13, 28, 29].

Цель исследования — выявление особенностей госпитальных штаммов *K. pneumoniae* с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии и комплекса молекулярно-генетических методов — ПЦР, RAPD и MLST.

Материалы и методы

Исследованы 23 штамма *K. pneumoniae*, выделенные из биологического материала больных инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, и объектов внешней среды (смывы с оборудования) в период эпидемического неблагополучия в педиатрическом стационаре. Все пробы были получены в августе — сентябре 2015 г.

Идентификацию штаммов проводили с помощью времяпролетного MALDI-TOF масс-спектрометра Autoflex и программно-аппаратного комплекса MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Германия). Пробоподготовку суточных культур исследуемых микроорганизмов выполняли методом прямого нанесения культуры по стандартному протоколу, представленному в руководстве пользователя. Идентификацию, запись, обработку и анализ масс-спектров проводили с помощью программно-аппаратного комплекса MALDI Biotyper.

Для выявления штаммов, продуцирующих БЛРС и обладающих сниженной чувствительностью к карбапенемам, использовали хромогенные среды M1829 HiCrome ESBL Agar Base и M1831 HiCrome KPC Agar Base производства HiMedia (Индия), высевы проводили в трех повторностях.

Чувствительность штаммов к антибиотикам определяли с использованием автоматического бактериологического анализатора Phoenix-100 (Becton Dickinson, США) и комбинированных ID/AST-панелей. При характеристике микроорганизмов применяли общепринятые показатели — «чувствительные», «умеренно резистентные» и «резистентные» штаммы, при учете и интерпретации результатов руководствовались стандартом EUCAST [30].

Выделение суммарной ДНК для последующей детекции генов бета-лактамаз проводили с использованием набора «ДНК-экспресс» («Литех», Россия). Детекцию генов bla_{TEM} и bla_{SHV} осуществляли методом ПЦР со специфичными праймерами [31, 32], а детерминант bla_{CTX-M} , bla_{KPC} , bla_{OXA-48} , bla_{NDM} , bla_{IMP} и bla_{VIM} — с использованием коммерческих тест-систем ф. «Литех». ПЦР выполняли на амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия). RAPD-типирование проводили с использованием праймеров, указанных в научной литературе [26].

Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе MiSeq (Illumina, США), сборку контигов проводили с помощью сборщика генома SPAdes v. 3.11.1 (СПбАУ РАН им. Ж.И. Алфёрова, Россия), а

аннотацию полученных контигов — с использованием программного обеспечения Prokka v. 1.12 [33].

С применением данных полногеномного секвенирования и биоинформатического сервиса, доступного онлайн на сайте Института Пастера (Франция) — <http://bigsdbs.pasteur.fr>, были определены геноварианты бета-лактамаз и их локализация, капсульный тип штамма (K-тип) и его сиквент-тип. Для установления K-типа анализировали нуклеотидную последовательность гена *wzi*, кодирующего белок лектин, ответственный за прикрепление капсулы к внешней мембране клетки. Аллели этого гена строго ассоциированы с капсульными типами штаммов [34].

MLST осуществляли согласно схеме, основанной на анализе последовательности 7 генов «домашнего хозяйства» [28].

Результаты

В ходе работы все штаммы были идентифицированы как *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, при этом значения коэффициента совпадения Score составили 2,1 и более, что говорит о точной видовой идентификации.

При анализе полученных масс-спектров и масс-листов пиков-маркеров *bla_{KPC}*, соответствующих размеру 11,109 Да, не выявлено (рис. 1).

При исследовании штаммов на наличие БЛРС и сниженную чувствительность к карбапенемам был отмечен рост одного штамма — *K. pneumoniae* 1013 на среде M1829 HiCrome ESBL Agar Base. На плотной питательной среде наблюдали крупные слизистые колонии серо-голубого цвета, которые, согласно инструкции, и характерны для штаммов, продуцирующих БЛРС (рис. 2). Штаммов со сниженной чувствительностью к карбапенемам с использованием хромогенных сред не выявлено.

Параллельно проводили изучение профилей антибиотикочувствительности всех исследуемых штаммов с использованием бактериологического анализатора Phoenix-100. Всего выделено три фенотипические группы.

В 1-ю группу вошли 15 штаммов *K. pneumoniae*, которые были чувствительны ко всем антибиотикам семейства цефалоспоринов и карбапенемам, устойчивы к ампициллину и умеренно чувствительны к одному из «защищенных» пенициллинов (пиперациллин/

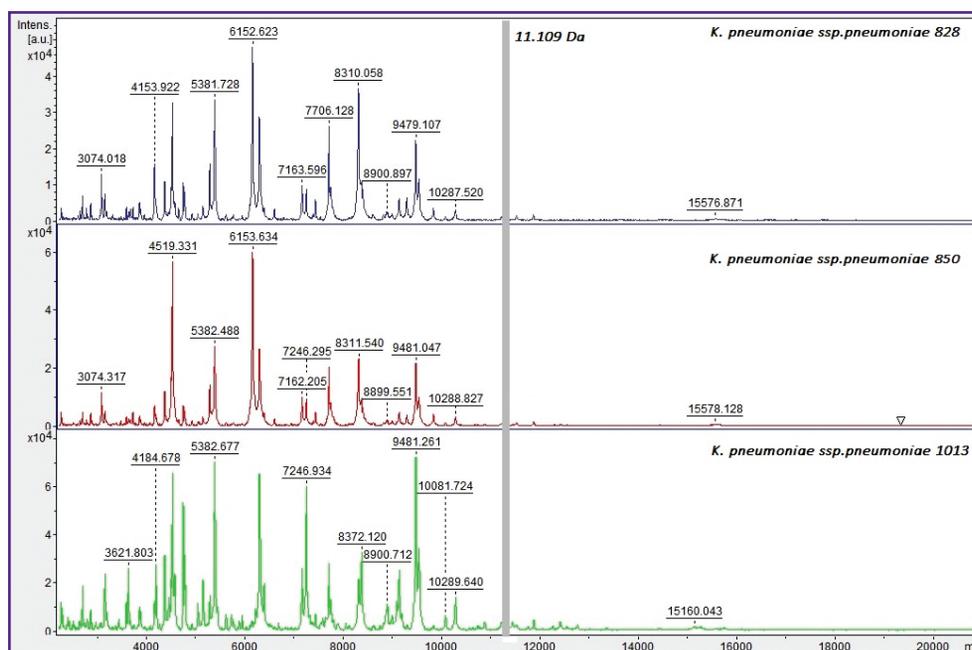


Рис. 1. Масс-спектры исследуемых штаммов *K. pneumoniae*

На оси абсцисс показано отношение массы иона к его заряду (m/z), на оси ординат — интенсивность сигнала (Intens.)

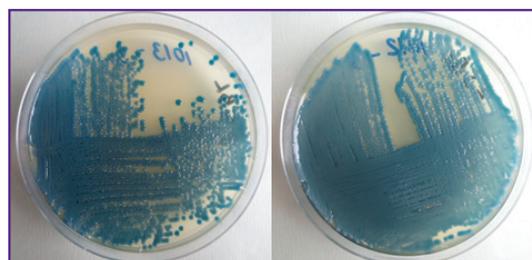


Рис. 2. Рост штамма *K. pneumoniae* 1013 на питательной среде HiCrome ESBL Agar Base (M1829; HiMedia, Индия)

Характеристика госпитальных штаммов *K. pneumoniae*

Изоляты	Чувствительность к антибиотикам, МПК/интерпретация											Фенотип антибиотико- резистентности	Рост на хромогенных средах	Наличие детерминант резистентности	Наличие MS-плак 11,109 Да	RAPD- тип		
	Am	Azt	Aug	Cf	Cpe	Cfx	Caz	Sax	Strm	Imp	Efp							
<i>K. pneumoniae</i> 828	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 829	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 830	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 832	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 833	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 834	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 835	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 836	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 837	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 838	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 841	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 842	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 843	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 844	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 846	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤1/S	≤0,25/S	wt	Нет	Нет	Нет	I
<i>K. pneumoniae</i> 840	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 845	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 850	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 852	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 853	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 863	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 893	>16/R	≤2/S	≤4/2/S	8/S	≤1/S	≤4/S	≤1/S	≤1/S	≤4/S	2/I	≤0,25/S	carb	Нет	Нет	Нет	Нет	II	
<i>K. pneumoniae</i> 1013	>16/R	>16/R	20/8/R	>16/R	>16/R	>16/R	>16/R	>32/R	>16/R	>16/R	≤1/S	≤0,25/S	ESBL Agar Base	ESBL	Нет	SHV-11 CTX-M-15	Нет	III

З д е с ь: МПК — минимальная подавляющая концентрация; Am — ампициллин; Azt — азтреонам; Aug — амоксилав; Aug — азтреонам; Aug — амоксилав; Aug — цефалотин; Cpe — цефепим; Cfx — цефотиксим; Cax — цефтазидим; Cax — цефтриаксон; Strm — цефуроксим; Imp — имипенем; Efp — эртапенем; wt — «джкий тип» по фенотипу антибиотикорезистентности; carb — потенциальные производители карбапенемазы; ESBL — продуцент БЛРС; S — чувствительный; I — частично резистентный; R — резистентный.

тазобактам). Штаммы, входящие в эту группу, были отнесены к «дикому типу» — wt (см. таблицу).

Ко 2-й группе — потенциальные производители карбапенемазы — отнесено 7 штаммов, устойчивых к ампициллину и обладающих умеренной резистентностью к имипенему.

В 3-ю группу вошел один штамм — *K. pneumoniae* 1013, отличающийся устойчивостью ко всем антибиотикам цефалоспоринового ряда, за исключением цефокситина, и сульфаниламидам (триметоприм/сульфометаксазол), т.е. может быть отнесен к штаммам, обладающим БЛРС.

У представителей 1-й и 2-й групп детерминант резистентности с использованием ПЦР не выявлено, а у штамма *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* 23 обнаружены бета-лактамазы двух классов — *bla_{SHV}* и *bla_{CTX-M}*.

Генотипирование исследуемой выборки штаммов с использованием метода RAPD позволило объединить анализируемые изоляты в три типа в соответствии с присутствующими штаммам электрофоретическими паттернами и фенотипом антибиотикорезистентности (рис. 3).

Анализ данных полногеномного секвенирования штамма *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* 1013 позволил идентифицировать выявленные ранее бета-лактамазы как *bla_{SHV-11}* и *bla_{CTX-M-15}*; установить, что первая имеет хромосомную локализацию, а *bla_{CTX-M-15}* расположена на плазмиде; определить принадлежность штамма к капсульному типу K-23 и провести MLST-анализ. В ходе проведения MLST-анализа штамма были определены аллельные профили 7 генов «домашнего хозяйства»: глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*gapA*), фактора инициации трансляции IF-2 (*infB*), малат дегидрогеназы (*mdh*), глюкозо-6-фосфатизомеразы (*pgi*), фосфорина E (*phoE*), бета-субъединицы РНК полимеразы (*rpoB*), периплазматического трансдуктора энергии (*tonB*) — и определена принадлежность штамма к 17-му сиквенс-типу.

Таким образом, госпитальный штамм, обладающий широким спектром антибиотикорезистентности, был идентифицирован как *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* 1013 ST-17^{K-23}.

Обсуждение

Анализ масс-спектров всех исследуемых штаммов позволил идентифицировать их как *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* и не выявил наличия пика, связанного с присутствием *bla_{KPC}*. Отсутствие карбапенемазной активности и этой детерминанты у штаммов в дальнейшем подтвердили данные, полученные с использованием хромогенных сред и ПЦР.

Изучение профилей антибиотикорезистентности показало, что все *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* устойчивы к ампициллину, что объясняется природной устойчивостью микроорганизма [8, 35]. К антибиотикам других групп большая часть штаммов устойчивости не проявляют и не несут в геноме соответствующих детерминант. В геномах штаммов 2-й группы, проявляющих промежуточную устойчивость к карбапенемам (имипенему), также не обнаружено детерминант резистентности. Это свидетельствует о том, что в данном случае устойчивость может быть результатом реализации других механизмов, например молекулярного эффлюкса.

Штамм *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* 1013, обладающий устойчивостью к цефалоспорином и фенотипически характеризуемый как продуцент БЛРС, несет в геноме детерминанты *bla_{SHV-11}* и *bla_{CTX-M-15}*. Согласно классификации К. Bush [36], обе детерминанты относятся к сериновым бета-лактамазам молекулярного класса А, группе 2be. Их наличие и обуславливает устойчивость штамма к защищенным пенициллинам (Амоксиклаву), цефалоспорином III, IV поколений и монобактамам (азтреонаму).

В научной литературе указано, что ген *bla_{CTX-M-15}* зачастую ассоциирован с плазмидами группы несовместимости IncF, IncL/M и IncA/C и мобильным генетическим элементом *ISEcp1* [37]. Это приводит к активному горизонтальному переносу гена в популяции и его распространению. Ген *bla_{CTX-M-15}* изучаемого нами штамма также имеет плазмидную локализацию и опасен в плане трансмиссивного переноса. Обращает на себя внимание отсутствие у изученного штамма бета-лактамаз типа TEM-1, обычно входящих в комплекс с *bla_{SHV-11}* и *bla_{CTX-M-15}* [20].

В ходе работы была показана возможность использования метода RAPD при изучении госпитальных штаммов. В нашем случае выделено три RAPD-типа, объединяющих культуры со схожим фенотипом. Поскольку в научной литературе есть данные, указывающие на то, что штаммы, принадлежащие к разным RAPD-типам, имеют и разные сиквенс-типы [26], можно предположить, что в данном случае в стационаре циркулируют три эпидемических клона *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*, один из которых обладает комплексом БЛРС и опасен в плане их трансмиссивного распространения. Это позволило более углубленно изучить свойства данного штамма с использованием полногеномного секвенирования.

Определенный в ходе данной работы капсульный

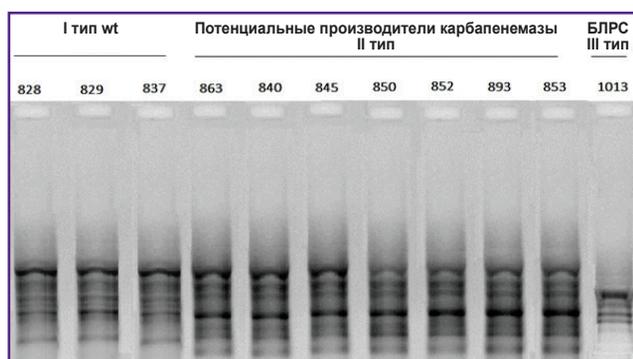


Рис. 3. Электрофореграмма паттернов RAPD-типирования госпитальных культур *K. pneumoniae ssp. pneumoniae*

тип *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* 1013 — K-23 — не характерен для высоковирулентных штаммов и штаммов с гипермукоидным фенотипом [1]. Однако MLST-анализ показал принадлежность штамма к 17-му сиквенс-типу, с которым связывают целый ряд инфекционных патологий человека: бактериемию, инфекции мочевыводящих путей, пневмонию, сепсис. Выявление такого штамма от пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, в условиях эпидемического неблагополучия в педиатрическом стационаре можно рассматривать с эпидемиологической точки зрения как прогностически неблагоприятный признак. В базе данных Института Пастера (Institut Pasteur MLST and whole genome MLST databases, <http://bigsd.b.pasteur.fr/klbsiella/klbsiella.html>) на момент обращения (25.07.2018) имеется информация о 25 изолятах *K. pneumoniae* ST-17, выделенных в Европе, США и странах Азии, связанных с тяжелыми и летальными патологиями человека и обладающих комплексом БЛРС. *K. pneumoniae* с данным сиквенс-типом на территории Российской Федерации встречается редко. По данным базы Института Пастера, штамм *K. pneumoniae* ST-17 был выделен лишь один раз в Москве из крови больного с сепсисом и зарегистрирован в базе в 2015 г.

Заключение

Применение современных технологий для изучения фенотипических и генотипических свойств штаммов *K. pneumoniae* позволило не только выделить, но и наиболее полно охарактеризовать госпитальный штамм, обладающий антибиотикорезистентностью, обусловленной наличием бета-лактамаз — *bla_{CTX-M-15}* и *bla_{SHV-11}*, который представляет опасность в плане трансмиссивного распространения детерминант резистентности и обуславливает возникновение эпидемического неблагополучия по инфекциям, связанным с оказанием медицинской помощи.

Финансирование исследования. Работа выполнена по государственному заданию №АААА-А16-116040810137-8.

Конфликта интересов нет.

Литература/References

1. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Malikov V.E., Bogun A.G., Borzilov A.I., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog Glob Health* 2018; 112(3): 142–151, <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1460949>.
2. Бисекенова А.Л., Рамазанова Б.А., Мусаева А.А., Нурмолдин Ш.М., Алибаева Ж.С., Угышова Ш.Е. Антибиотикорезистентность штаммов Enterobacteriaceae, выделенных от пациентов многопрофильных стациона-

ров. Вестник Казахского Национального медицинского университета 2016; 4: 50–54. Bisekenova A.L., Ramazanova B.A., Musayeva A.A., Nurmoldin Sh.M., Alibaeva Zh.S., Ugushova Sh.E. Antibiotic resistance of strains of Enterobacteriaceae isolated from patients in multidisciplinary hospitals. *Vestnik Kazakhskogo Natsional'nogo meditsinskogo universiteta* 2016; 4: 50–54.

3. Эйдельштейн М.В., Журавлев В.С., Шек Е.А. Распространенность карбапенемаз среди нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в России. Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология 2017; 17(1): 36–41. Edelstein M.V., Zhuravlev V.S., Shek E.A. Prevalence of carbapenemases among the nosocomial strains of Enterobacteriaceae in Russia. *Izvestiya Saratovskogo universiteta. Novaya seriya. Seriya: Khimiya. Biologiya. Ekologiya* 2017; 17(1): 36–41.

4. Angeletti S., Dicuonzo G., Lo Presti A., Cella E., Crea F., Avola A., Vitali M.A., Fagioni M., De Florio L. MALDI-TOF mass spectrometry and *bla_{KPC}* gene phylogenetic analysis of an outbreak of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains. *New Microbiol* 2015; 38(4): 541–550.

5. Шипицына И.В., Розова Л.В. Оценка патогенного потенциала штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом. Успехи современного естествознания 2015; 4: 93–96. Shipitsyna I.V., Rozova L.V. Evaluation of pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the wounds of patients with chronic osteomyelitis. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* 2015; 4: 93–96.

6. Piperaki E.T., Syrogiannopoulos G.A., Tzouveleki L.S., Daikos G.L. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 2017; 36(10): 1002–1005, <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001675>.

7. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю., Иванчик Н.В., Тимохова А.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С., Попов Д.А., Астанина М.А., Жданова О.А., Большеева Г.С., Новикова Р.И., Валиуллина И.Р., Кокарева Т.С., Частоедова А.Н., Рог А.А., Поликарпова С.В., Гординская Н.А., Некаева Е.С., Абрамова Н.В., Доманская О.В., Землянская О.А., Горюнова Л.А., Скальский С.В., Елохина Е.В., Попова Л.Д., Божкова С.А., Гомон Ю.М., Кречикова О.И., Мищенко В.М., Рачина С.А., Стрех Ю.А., Гудкова Л.В., Колосова И.П., Вунукайнен Т.М., Ортенберг Э.А., Хохлявина Р.М., Портнягина У.С., Шамаева С.Х., Матвеев А.С., Палютин Ш.Х., Власова А.В., Ершова М.Г., Лебедева М.С., Феоктистова Л.В., Гордеева С.А., Долинина В.В., Чернявская Ю.Л., Багин В.А., Розанова С.М., Перевалова Е.Ю. 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. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., Timokhova A.V., Dekhnic A.V., Kozlov R.S., Popov D.A., Astanina M.A., Zhdanova O.A., Bolysheva G.S., Novikova R.I., Valiullina I.R., Kokareva T.S., Chastoeдова A.N., Rog A.A., Polikarpova S.V., Gordinskaya N.A., Nekaeva E.S., Abramova N.V., Domanskaya O.V., Zemlyanskaya O.A., Goryunova L.A., Skal'skiy S.V., Elokhina E.V., Popova L.D., Bozhkova S.A., Gomon Yu.M., Krechikova O.I., Mishchenko V.M., Rachina S.A., Strezh Yu.A., Gudkova L.V., Kolosova I.P., Vunukaynen T.M., Ortenberg E.A.,

- Khokhlyavina R.M., Portnyagina U.S., Shamaeva S.Kh., Matveev A.S., Palyutin Sh.Kh., Vlasova A.V., Ershova M.G., Lebedeva M.S., Feoktistova L.V., Gordeeva S.A., Dolinina V.V., Chernyavskaya Yu.L., Bagin V.A., Rozanova S.M., Perevalova E.Yu. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacteriaceae isolates in Russia: results of national multicenter surveillance study "MARATHON" 2011–2012. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2014; 16(4): 254–265.
8. Крыжановская О.А., Лазарева А.В., Алябьева Н.М., Тепаев Р.Ф., Карасева О.В., Чеботарь И.В., Маянский Н.А. Устойчивость к антибиотикам и молекулярные механизмы резистентности у карбапенем-нечувствительных изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в педиатрических ОРИТ г. Москвы. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61(7–8): 22–26. Kryzhanovskaya O.A., Lazareva A.V., Alyabieva N.M., Tepaev R.F., Karaseva O.V., Chebotar I.V., Mayanskiy N.A. Antibiotic resistance and its molecular mechanisms in carbapenem-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* isolated in pediatric ICUs in Moscow. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2016; 61(7–8): 22–26.
9. Dubodelov D.V., Lubasovskaya L.A., Shubina E.S., Mukosey I.S., Korostin D.O., Kochetkova T.O., Bogacheva N.A., Bistritskiy A.A., Gordeev A.B., Trofimov D.Y., Priputnevich T.V., Zubkov V.V. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β -lactam antibiotics isolated in neonates. *Russian Journal of Genetics* 2016; 52(9): 993–998, <https://doi.org/10.1134/s1022795416090040>.
10. Тапальский Д.В., Петренев Д.Р. Распространенность *Klebsiella pneumoniae* — продуцентов карбапенемазы в Беларуси и их конкурентоспособность. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2017; 19(2): 139–144. Tapalskiy D.V., Petrenyov D.R. Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Belarus and their competitive ability. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2017; 19(2): 139–144.
11. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., Chan E.W., Shu L., Yu J., Zhang R., Chen S. 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).
12. Zheng X., Wang J.F., Xu W.L., Xu J., Hu J. Clinical and molecular characteristics, risk factors and outcomes of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in the intensive care unit. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017; 6: 102, <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0256-2>.
13. Лазарева И.В., Агеевец В.А., Ершова Т.А., Зуева Л.П., Гончаров А.Е., Дарина М.Г., Светличная Ю.С., Усков А.Н., Сидоренко С.В. Распространение и антибактериальная резистентность грамотрицательных бактерий, продуцентов карбапенемазы в Санкт-Петербурге и некоторых других регионов Российской Федерации. Антибиотики и химиотерапия 2016; 61(11–12): 28–38. Lazareva I.V., Ageevets V.A., Ershova T.A., Zueva L.P., Goncharov A.E., Darina M.G., Svetlichnaya Yu.S., Uskov A.N., Sidorenko S.V. Prevalence and antibiotic resistance of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in Saint Petersburg and some other regions of the Russian Federation. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2016; 61(11–12): 28–38.
14. Berrazeg M., Diene S.M., Drissi M., Kempf M., Richet H., Landraud L., Rolain J.M. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 2013; 8(4): e61428, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061428>.
15. Lau A.F., Wang H., Weingarten R.A., Drake S.K., Suffredini A.F., Garfield M.K., Chen Y., Gucek M., Youn J.H., Stock F., Tso H., DeLeo J., Cimino J.J., Frank K.M., Dekker J.P. A rapid matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based method for single-plasmid tracking in an outbreak of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2014; 52(8): 2804–2812, <https://doi.org/10.1128/jcm.00694-14>.
16. Gaibani P., Galea A., Fagioni M., Ambretti S., Sambri V., Landini M.P. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2016; 54(10): 2609–2613, <https://doi.org/10.1128/jcm.01242-16>.
17. Gaibani P., Ambretti S., Tamburini M.V., Vecchio Nepita E., Re M.C. Clinical application of Bruker Biotyper MALDI-TOF/MS system for real-time identification of KPC production in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *J Glob Antimicrob Resist* 2018; 12: 169–170, <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.016>.
18. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонко С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. Медицинский журнал 2012; 2(40): 10–15. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Meditinskiy zhurnal* 2012; 2(40): 10–15.
19. Afzali H., Firoozeh F., Amiri A., Moniri R., Zibaei M. Characterization of CTX-M-type extend-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* spp. in Kashan, Iran. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8(10): e27967, <https://doi.org/10.5812/jjm.27967>.
20. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А., Гординская Н.А. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия. Клиническая лабораторная диагностика 2017; 62(11): 699–704. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Solntsev L.A., Gordinskaya N.A. The molecular typing of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* producing beta-lactamases of extended specter of action. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* 2017; 62(11): 699–704.
21. Коробова А.Г. Мониторинг энтеробактерий с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра, выделенных у больных гемобластозами при химиотерапии. Дис. ... канд мед наук. М; 2018. Korobova A.G. *Monitoring enterobakteriy s produktsiey beta-laktamaz rasshirennogo spektra, vydelennykh u bol'nykh gemoblastozami pri khimioterapii*. Dis. ... kand med nauk [Monitoring of enterobacteria with the production of extended-spectrum beta-lactamases isolated in patients with hemoblastosis during chemotherapy. PhD Dissertation]. Moscow; 2018.
22. Ильина В.Н., Субботовская А.И., Козырева В.С., Сергеевичев Д.С., Шилова А.Н. Характеристика штаммов, продуцирующих БЛРС CTX-M типа, выделенных в кардиохирургическом стационаре. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2013; 15(4): 309–314. Ilyina V.N., Subbotovskaya A.I., Kozyreva V.S., Sergeevichev D.S., Shilova A.N. Characteristics of Enterobacteriaceae strains producing CTX-M type ESBL in

а Cardiac Surgery Hospital. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2013; 15(4): 309–314.

23. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия 2000; 2(3): 82–95. Shaginyan I.A. Role and significance of molecular methods in epidemiological analysis of nosocomial infections. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2000; 2(3): 82–95.

24. Асташкин Е.И., Лев А.И., Новикова Т.С., Карцев Н.Н., Федюкина Г.Н., Ершова М.Г., Полетаева Е.Д., Фурсова Н.К., Шепелин А.П. Характеристика антибиотикорезистентных клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Ярославле в 2016–2017 гг. *Бактериология* 2017; 2(3): 45. Astashkin E.I., Lev A.I., Novikova T.S., Kartsev N.N., Fedyukina G.N., Ershova M.G., Poletaeva E.D., Fursova N.K., Shepelin A.P. Characterization of the antibiotic-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* isolated in Yaroslavl in 2016–2017. *Bakteriologiya* 2017; 2(3): 45.

25. Deschaght P., Van Simaey L., Decat E., Van Mechelen E., Brisse S., Vanechoutte M. Rapid genotyping of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD). *Res Microbiol* 2011; 162(4): 386–392, <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.002>.

26. Sachse S., Bresan S., Erhard M., Edel B., Pfister W., Saube A., Rödel J. Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of β -lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80(4): 267–271, <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.005>.

27. Молекулярно-эпидемиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации. М; 2014. *Molekulyarno-epidemiologicheskij monitoring v sisteme epidemiologicheskogo nadzora za infektsiyami, svyazannymi s okazaniem meditsinskoj pomoshchi. Federal'nye klinicheskie rekomendatsii* [Molecular epidemiological monitoring in the system of epidemiological surveillance of infections associated with the provision of medical care. Federal clinical guidelines]. Moscow; 2014.

28. Guo C., Yang X., Wu Y., Yang H., Han Y., Yang R., Hu L., Cui Y., Zhou D. MLST-based inference of genetic diversity and population structure of clinical *Klebsiella pneumoniae*, China. *Sci Rep* 2015; 5: 7612, <https://doi.org/10.1038/srep07612>.

29. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A.,

Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43(8): 4178–4182, <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>.

30. *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*. Version 1.0, 2013. URL: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf.

31. Ikryannikova L.N., Shitikov E.A., Zhivankova D.G., Il'ina E.N., Edelstein M.V., Govorun V.M. A MALDI TOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J Microbiol Methods* 2008; 75(3): 385–391, <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.005>.

32. Eftekhari F., Naseh Z. Extended-spectrum β -lactamase and carbapenemase production among burn and non-burn clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Iran J Microbiol* 2015; 7(3): 144–149.

33. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 2014; 30(14): 2068–2069, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

34. Brisse S., Passet V., Haugaard A.B., Babosan A., Kassis-Chikhani N., Struve C., Decré D. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol* 2013; 51(12): 4073–4078, <https://doi.org/10.1128/jcm.01924-13>.

35. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П., Гоик В.Г. Устойчивость к антибиотикам клебсиелл различного происхождения. *Инфекция и иммунитет* 2016; 6(3): 48. Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P., Goik V.G. Resistance of *Klebsiella* of various origin to antibiotics. *Infektsiya i immunitet* 2016; 6(3): 48.

36. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969–976, <https://doi.org/10.1128/aac.01009-09>.

37. Фурсова Н.К., Прямчук С.Д., Абаев И.В., Ковалев Ю.Н., Шишкова Н.А., Печерских Э.И., Коробова О.В., Асташкин Е.И., Пачкунов Д.М., Светоч Э.А., Сидоренко С.В. Генетическое окружение генов *bla*_{CTX-M}, локализованных на конъюгативных плазмидах нозокомиальных изолятов Enterobacteriaceae, выделенных в России в 2003–2007 гг. *Антибиотики и химиотерапия* 2010; 55(11–12): 3–10. Fursova N.K., Pryamchuk S.D., Abaev I.V., Kovalev Yu.N., Shishkova N.A., Pecherskikh E.I., Korobova O.V., Astashkin E.I., Pachkunov D.M., Svetoch E.A., Sidorenko S.V. Genetic environments of *bla*_{CTX-M} genes located on conjugative plasmids of Enterobacteriaceae nosocomial isolates collected in Russia within 2003–2007. *Antibiotiki i khimioterapiya* 2010; 55(11–12): 3–10.