



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.2.011>

УДК 616.944-022.7:579.842.16-06-085.33:577.182.34]-078.088.7



Руденкова Т.В.✉, Костюк С.А., Горбич Ю.Л.
Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Беларусь

Выявление молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: Руденкова Т.В. – проведение исследования, анализ данных, написание текста; Костюк С.А. – редактирование текста; Горбич Ю.Л. – сбор материала, анализ данных, написание и редактирование текста.

Подана: 15.03.2023

Принята: 02.05.2023

Контакты: t.rudenkova@mail.ru

Резюме

Цель. Установить частоту выявления молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*.

Материалы и методы. В бактериальных культурах *K. pneumoniae* проводили определение нуклеотидной последовательности гена *mgrB* с применением анализа кривых плавления, электрофореза и сиквенс-анализа. Для генов *phoP*, *phoQ* и *pmrK* определяли процент уровня нормализованной экспрессии данных генов с использованием метода ПЦР с обратной транскрипцией и расчета $\Delta\Delta Ct$. Выявление мобильных плазмидных генетических элементов устойчивости *mcr* проводили с применением метода ПЦР в режиме реального времени.

Результаты. В исследованных бактериальных культурах *K. pneumoniae* нарушения структуры гена *mgrB* были выявлены в трех вариантах: полная делеция локуса гена (10,45%), делеция части локуса гена (10,00%), вставка инсерционных последовательностей (10,91%). Изменения структуры гена *mgrB* были обнаружены в 85,19% колистинрезистентных изолятов. Выявлены изоляты *K. pneumoniae* с гиперэкспрессией (уровень нормализованной экспрессии больше 100%) гена *PhoQ* (31,94%) и гена *pmrK* (3,70%). Для гена *pmrK* было зафиксировано отсутствие экспрессии в 6,94% проанализированных образцов, для гена *PhoP* отсутствие экспрессии было выявлено в 19,91% образцов. В исследованных бактериальных культурах *K. pneumoniae* не было зафиксировано присутствия генов семейства *mcr*.

Заключение. В ходе проведенного исследования установлено, что такие молекулярно-генетические маркеры, как повышенная экспрессия генов двухкомпонентных систем *phoPQ* и *pmrAB* (*PhoQ* и/или *pmrK*), а также изменения в структуре гена *mgrB* (инсерции или делеции) выявляются у изолятов *K. pneumoniae*, резистентных к колистину, в то же время в изученных образцах не было выявлено генетических элементов (*mcr* гены), отвечающих за плазмидопосредованные механизмы формирования резистентности к полимиксинам (колистину).

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибактериальные лекарственные средства, колистин, *mgrB* ген, экспрессия, *mcr* гены

Tatiana V. Rudenkova✉, Svetlana A. Kostiuk, Yuri. L. Gorbich
Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Belarus

Identification of Resistance Molecular Genetic Markers to Antibacterial Drugs of the Polymyxins Group (Colistin) in Bacterial Cultures of *Klebsiella pneumoniae*

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Tatiana V. Rudenkova – research conducting, data analysis, text writing; Svetlana A. Kostiuk – text editing; Yuri. L. Gorbich – material collection, data analysis, text writing and editing.

Submitted: 15.03.2023

Accepted: 02.05.2023

Contacts: t.rudenkova@mail.ru

Abstract

Purpose. To establish the rate of detecting resistance molecular genetic markers to antibacterial drugs of the polymyxins group (colistin) identification in bacterial cultures of *Klebsiella pneumoniae*.

Materials and methods. In bacterial cultures of *K. pneumoniae* (n=220), the nucleotide sequence of the *mgrB* gene was determined using melting curve analysis, electrophoresis, and sequence analysis. For the *phoP*, *phoQ*, and *pmrK* genes, the percentage of normalized expression of these genes was determined using reverse transcription PCR and $\Delta\Delta C_t$ calculation. Detection of *mcr* mobile plasmid genetic elements of resistance was carried out using real-time PCR.

Results. In the studied bacterial cultures of *K. pneumoniae*, structural disorders of the *mgrB* gene were detected in three variants: complete gene locus deletion (10.45%), a part of the gene locus deletion (10.00%), and insertion sequences (10.91%). Changes in the *mgrB* gene structure were detected in 85.19% of colistin-resistant isolates. Isolates of *K. pneumoniae* with overexpression (the level of normalized expression being more than 100%) of the *PhoQ* gene (31.94%) and the *pmrK* gene (3.70%) were identified. For the *pmrK* gene, the absence of expression was recorded in 6.94% of the analyzed samples; for the *PhoP* gene, the absence of expression was detected in 19.91% of samples. In the studied bacterial cultures of *K. pneumoniae*, the presence of the *mcr* family genes was not recorded.

Conclusion. The study revealed that such molecular genetic markers as increased expression of the genes of the two-component systems *phoPQ* and *pmrAB* (*PhoQ* and/or *pmrK*), as well as changes in the structure of the *mgrB* gene (insertions or deletions) were detected in *K. pneumoniae* isolates resistant to colistin; at the same time, no genetic elements (*mcr* genes) responsible for plasmid-mediated mechanisms of resistance formation to polymyxins (colistin) were found in the studied samples.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibacterial drugs, colistin, *mgrB* gene, expression, *mcr* genes



■ ВВЕДЕНИЕ

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) является клинически значимым видом микроорганизмов рода *Klebsiella*, а также одним из широко распространенных условно-патогенных грамотрицательных микроорганизмов. *K. pneumoniae* может вызывать различные заболевания человека, включая инфекции мочевыводящих путей, пневмонию, бактериемию и абсцесс печени [1].

Антибактериальные лекарственные средства группы полимиксинов (колистин) применяют в качестве препаратов последней линии терапии при лечении инфекционных процессов, обусловленных грамотрицательными патогенами, которые обладают множественной лекарственной резистентностью, в том числе и *K. pneumoniae*. Несмотря на тяжелые побочные эффекты при применении данной группы лекарственных средств, проявляющиеся нефротоксичностью и нейротоксичностью, колистин является ключевым компонентом комбинированных антимикробных схем, используемых для лечения тяжелых инфекций. Накопленный практический опыт применения колистина, а также новые данные о фармакокинетике, фармакодинамике и токсических эффектах позволили оптимизировать его использование и достичь, с одной стороны, максимально эффективного уничтожения возбудителя, а с другой – минимизации вреда, наносимого пациенту побочными реакциями [2–4].

Использование комбинации нескольких антибактериальных лекарственных средств различных групп при лечении инфекционных процессов, обусловленных микроорганизмами с фенотипом множественной (MDR) и экстремальной (XDR) устойчивости, в большинстве случаев является единственной эффективной тактикой лечения. Так, для лечения сепсиса, обусловленного MDR и XDR штаммами *K. pneumoniae*, используют комбинации карбапенемов и колистина. Несмотря на широкое распространение генов карбапенемаз среди циркулирующих штаммов возбудителя и, соответственно, высокий уровень резистентности к лекарственным средствам группы карбапенемов, использование комбинированного подхода при назначении антибактериальной терапии доказало свою эффективность в клинической практике. Однако распространение штаммов *K. pneumoniae*, которые наряду с устойчивостью к карбапенемам обладают и устойчивостью к полимиксинам (колистину), представляет собой большую проблему из-за ограничения вариантов лечения инфекций, вызванных подобными штаммами возбудителя [5–7].

Полимиксины представляют собой амфипатические молекулы, включающие гидрофильные и гидрофобные участки, которые обеспечивают им свойства, необходимые для антимикробной активности. Точный механизм антибактериального действия полимиксинов изучен не полностью, общепринятая точка зрения состоит в том, что на начальном этапе происходит связывание полимиксинов с липополисахаридами (ЛПС) клеточной стенки грамотрицательных микроорганизмов, после чего через ряд электростатических и гидрофобных взаимодействий происходит дестабилизация клеточной мембраны и разрушение ее структуры, что способствует проникновению полимиксина внутрь бактериальной клетки, нарушению обменных процессов и формированию осмотического дисбаланса, который вызывает гибель клеток [7, 8].

Вторичный механизм антибактериального действия полимиксинов заключается в ингибировании ферментов семейства никотинамидадениндинуклеотидоксидазы. Такой эффект полимиксинов был выявлен у *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и *Mycobacterium smegmatis* [9].

Для реализации антимикробного действия полимиксинов необходимо их взаимодействие с ЛПС. Для *K. pneumoniae* выявлено несколько механизмов, которые способствуют формированию устойчивости к колистину, одним из которых является модификация ЛПС клеточной стенки микроорганизма, что приводит к уменьшению отрицательного заряда ЛПС, снижает его сродство к колистину и создает условия для формирования резистентности [10].

Мутации и нарушение работы генов двухкомпонентных систем *pmrAB* и *phoPQ* или их регуляторов (таких как ген *mgrB*) приводят к модификации липида А, изменяя сродство ЛПС к полимиксинам [11, 12].

Гены *phoP* и *phoQ* кодируют белки двухкомпонентной системы *PhoPQ*, которая регулирует транскрипцию оперона *pmrHFIJKLM*, активацию ферментов, участвующих в модификации ЛПС, а также белков, контролирующих транспорт ионов магния. Система *PhoPQ* регулируется геном *mgrB* по принципу отрицательной обратной связи, и при инактивации гена *mgrB* происходит гиперактивация системы *PhoPQ*, что ведет к усилению процессов, направленных на адаптацию микроорганизма к экстремальным условиям внешней среды, за счет модификации ЛПС и повышения интенсивности транспорта ионов [12–14].

Ген *pmrK* является частью *pmrHFIJKLM* оперона, гены которого кодируют ферменты, непосредственно участвующие в модификации ЛПС, являющегося основной мишенью полимиксинов (колистина).

В 2016 году китайские ученые впервые сообщили о выявлении плазмидопосредованного механизма устойчивости к полимиксинам посредством передачи гена *mcr-1* среди микроорганизмов рода *Enterobacteriaceae* [15]. Гены *mcr* относят к мобильным детерминантам резистентности, присутствие которых приводит к модификации ЛПС и обуславливает формирование резистентности к полимиксинам (колистину). Наиболее распространенным вариантом является ген *mcr-1*, экспрессия которого активирует синтез ферментов семейства фосфоэтаноламинтрансферазы, что приводит к добавлению фосфоэтанолamina к липиду А и модифицирует сайты связывания полимиксинов [9, 16].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установить частоту выявления молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину) в бактериальных культурах *Klebsiella pneumoniae*.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные культуры *K. pneumoniae* были выделены из крови 223 пациентов, находившихся на лечении в стационарах учреждений здравоохранения г. Минска. Возраст пациентов составил 54 (31...84) года. Среди обследованных пациентов было 136 мужчин (60,99%) и 87 женщин (39,01%). Включенным в исследование пациентам был установлен диагноз сепсиса ($n=137$; 61,43%) или септического шока ($n=86$; 38,57%), вызванного карбапенем-резистентными изолятами *K. pneumoniae*. Выделение микроорганизмов из крови пациентов осуществлялось по технологии стандартных микробиологических исследований, проводимых для обследования пациентов с диагнозом «сепсис» и/или «септический шок», на базе микробиологических лабораторий УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска



и микробиологической лаборатории ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии» с использованием автоматических бактериологических анализаторов VITEK 2 Compact и VITEK VS (bioMérieux, Франция). Определение фенотипической чувствительности к колистину осуществлялось методом последовательных микро-разведений в бульоне Мюллера – Хинтона с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК). Чистые культуры *K. pneumoniae* на транспортной среде доставлялись в Научно-исследовательскую лабораторию БелМАПО, где их замораживали и оставляли для хранения при температуре -18°C .

Чистоту бактериальных культур проверяли с использованием автоматических микробиологических анализаторов VITEK 2 Compact и VITEK VS (bioMérieux, Франция), а также метода ПЦР в режиме реального времени – для исключения присутствия микроорганизмов *Enterococcus* spp., *Candida* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* и *E. coli*.

Бактериальные культуры *K. pneumoniae* ($n=223$) были исследованы с использованием молекулярно-биологического метода. Для выделения РНК из бактериальных культур *K. pneumoniae* использовали набор реагентов «АртРНК Магнит» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), выделение проводили согласно инструкции организации-производителя.

Определение концентрации и степени чистоты выделенной РНК проводили спектрофотометрически («NanoDrop 1000», «Thermo scientific») при длинах волн 230 и 260 нм. После оценки качества выделенной РНК ее подвергали реакции обратной транскрипции и последующей постановке TaqMan ПЦР-РВ для амплификации целевых генов (*PhoQ*, *PhoP*, *pmrK*) и гена внутреннего контроля (*rpsL*) с использованием реагента «ArtMix-RT ревертаза» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь), специально подобранных пар праймеров для каждого гена [17]. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Амплификацию выполняли на термоциклере Rotor-Gene-6000 (Corbett research, Австралия). Расчет процента уровня нормализованной экспрессии (% УНЭ) генов проводился по методу $\Delta\Delta\text{Ct}$ [18].

Таблица 1
Последовательности праймеров для определения уровней экспрессии генов *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* и *rpsL* *K. pneumoniae*

Table 1
Primer sequences for determining of *K. pneumoniae* *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK*, and *rpsL* genes expression levels

Ген	Праймер	Нуклеотидная последовательность
PhoQ	Прямой (forward)	ATATGCTGGCGAGATGGGAAAACGG
	Обратный (reverse)	CCAGCCAGGGAACATCACGCT
PhoP	Прямой (forward)	ATTGAAGAGGTTGCCGCCCGC
	Обратный (reverse)	GCTTGATCGGCTGGTCATTCACC
pmrK	Прямой (forward)	CGCTGAATATGCTCGACCCAGAAG
	Обратный (reverse)	GCTGGCGTAATCGTCTGTACG
rpsL	Прямой (forward)	GCCGTAATTGGAGCGAGCCTG
	Обратный (reverse)	CCGTGGCGGTCGTGTTAAAGA

Выделение ДНК из бактериальных культур *K. pneumoniae* проводили с использованием набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», Республика Беларусь). Анализ структуры гена *mgrB* осуществляли в несколько этапов. Начальную амплификацию гена выполняли с использованием специфических праймеров (forward – *mgrB*-EE-F – GGCTATGGCGAGGATAATGAG и reverse – *mgrB*-EE-R – GCTGTGATGTAAGCGTCTGGTG), мастер-микса «ArtMix Форез ДНК-полимераза» (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для амплификации использовали прибор QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific). Для оценки результатов амплификации проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ полученных ампликонов.

В ходе подготовки ампликонов к постановке секвенирующей ПЦР использовали набор для ферментативной очистки ExS-Pure™ (Nimagen). Секвенирующую ПЦР проводили с применением набора BrilliantDye™ Terminator v3.1 Cucle Sequencing Kit (Nimagen). Очистку полученных фрагментов выполняли с использованием набора реагентов iX-Pure™ DyeTerminator Cleanup Kit (Nimagen). Анализ фрагментов проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 310 (Applied biosystems). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности обрабатывали и сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank (NCBI). Идентификацию встроенных в ген IS-элементов проводили на основе базы данных ISfinder.

В образцах выделенной ДНК *K. pneumoniae* проводили выявление приобретенных генов резистентности *mcr* 1-10. Для амплификации генов *mcr* использовали пары специфических праймеров (табл. 2) [19].

Амплификацию выполняли с использованием мастер-микса ArtMix Форез ДНК-полимераза (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для амплификации использовали прибор QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific). Для оценки результатов амплификации дополнительно проводили анализ кривых плавления.

Таблица 2
Последовательности праймеров для идентификации генов семейства *mcr*
Table 2
Primer sequences for identification of the *mcr* family genes

Название гена	Последовательность праймера
MCR-1/2/6-F	GCGTAYTCTGTGCCGTGTATG
MCR-1/2/6-R	GGTATTGGCGGTATCGACATCA
MCR-3-F	GGTGATGATGCAAAACGGGATA
MCR-3-R	GTCCACACGAACGAACATCA
MCR-4-F	AGGCGTTACATTGTCCCTACCT
MCR-4-R	ACGACTGGCATTCTTCGCATCT
MCR-5-F	GCCATGCTGCGGAATCTGAT
MCR-5-R	AGGGCAGCATTCTCCATTGC
MCR-7-F	ATGCCAAAGTCGTCGCCAAA
MCR-7-R	CCCCACCACCAGAAACATC
MCR-8-F	GGATGCGTGACGTTGCTATGA
MCR-8-R	GCTTTCCCCAGCGATTCTC
MCR-9/10-F	GCAGCCATGGACCGACYTAT
MCR-9/10-R	CGATGCTCWGCCGGATAACG



Оценка нормальности распределения количественных признаков проводилась графическим способом и по методу Шапиро – Уилка. Для описания частоты выявления признака приводили абсолютные (n) и относительные (%) значения. Количественные данные представляли в виде медианы (Me) и размаха ($min...max$). Результаты всех этапов исследования признавались статистически достоверными, если значение ошибки 1-го рода (p) было меньше 0,05.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе оценки результатов бактериологического исследования все выделенные от пациентов изоляты карбапенем-резистентных *K. pneumoniae* ($n=223$), были отнесены к экстремально-резистентному фенотипу. Частота встречаемости устойчивых к колистину изолятов составила 36,32% ($n=81$). В результате проведения молекулярно-генетического анализа (методом ПЦР в режиме реального времени) ДНК *K. pneumoniae* была выявлена в 220 бактериальных культурах, хранившихся в лаборатории после бактериологического исследования. Количество образцов, включенных в дальнейшее исследование по выявлению молекулярно-генетических маркеров устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам группы полимиксинов (колистину), составило 220, из которых по результатам бактериологического исследования 81 (36,82%) был устойчив к колистину.

В ходе исследования структуры гена *mgrB* в бактериальных культурах *K. pneumoniae* ($n=220$) с применением анализа кривых плавления и электрофоретического анализа ампликонов, полученных после проведения ПЦР, а также с применением секвенирующей ПЦР, были выявлены изменения структуры в 69 образцах (31,36%). В 10,45% случаев ($n=23$) было установлено отсутствие амплификации гена *mgrB* из-за делеции всего локуса данного гена. В 24 образцах (10,91%) в гене присутствовали инсерционные последовательности IS1 и IS5 (100–500 п. о.). В 22 образцах (10,00%) в нуклеотидной последовательности гена были зафиксированы делеции части локуса гена (табл. 3).

При определении уровней нормализованной экспрессии генов *PhoQ*, *PhoP*, *pmrK* для ряда образцов ($n=4$; 1,82%) после этапа выделения РНК и спектрофотометрического исследования было установлено низкое содержание РНК в биологическом материале; для данных образцов на этапе анализа результатов ПЦР с обратной транскрипцией было зафиксировано также отсутствие амплификации РНК гена внутреннего контроля (*rpsL* ген *K. pneumoniae*) и других исследуемых генов. Поскольку бактериальные культуры возбудителя хранились в замороженном состоянии, это могло стать причиной угнетения процессов жизнедеятельности микроорганизма и деградации РНК. При этом ДНК, выделенная из данных образцов, была пригодна

Таблица 3
Результаты изучения структуры гена *mgrB* в бактериальных культурах *K. pneumoniae*
Table 3
Results of the *mgrB* gene structure study in bacterial cultures of *K. pneumoniae*

Вид изменения	Количество образцов с изменениями, n (%)
Вставка инсерционных последовательностей	24 (10,91)
Делеции части локуса гена	22 (10,00)
Делеция всего локуса гена	23 (10,45)

Таблица 4
Значения процента уровня нормализованной экспрессии генов PhoQ, PhoP, pmrK в бактериальных культурах *K. pneumoniae*
Table 4

Values of normalized expression of the PhoQ, PhoP, pmrK genes level percentage in bacterial cultures of *K. pneumoniae*

Ген	%УНЭ, Me (min...max) (%)
PhoQ	77,11 (1,56...805,56)
PhoP	0,08 (0,00...37,83)
pmrK	7,31 (0,00...151,57)

Таблица 5
Частота выявления гиперэкспрессии и полного отсутствия экспрессии генов PhoQ, pmrK в бактериальных культурах *K. pneumoniae* (n=216)
Table 5

Detection rate of overexpression and complete absence of expression of PhoQ, pmrK genes detection in bacterial cultures of *K. pneumoniae* (n=216)

Ген	Количество		УНЭ, Me (min...max) (%)
	n	%	
Гиперэкспрессия PhoQ	69	31,94	131,04 (100,70...805,56)
Гиперэкспрессия pmrK	8	3,70	115,67 (104,25...151,57)
Отсутствие экспрессии PhoP	43	19,91	0
Отсутствие экспрессии pmrK	15	6,94	0

как для постановки ПЦР, так и для проведения сиквенс-анализа, что объясняется более высокой стабильностью молекул ДНК.

При анализе процента уровня нормализованной экспрессии (%УНЭ) целевых генов в бактериальных культурах *K. pneumoniae* медиана и размах (Me (min...max)) значений составили: для гена PhoQ – 77,11 (1,56...805,56)%, для гена PhoP – 0,08 (0,00...37,83)%, для гена pmrK – 7,31 (0,00...151,57)%. Полученные результаты представлены в табл. 4.

После анализа полученных данных были выявлены образцы с гиперэкспрессией (УНЭ >100%) гена PhoQ (n=69; 31,94%) и гена pmrK (n=8; 3,70%). Для гена pmrK было зафиксировано отсутствие экспрессии в 15 проанализированных образцах (6,94%), для гена PhoP отсутствие экспрессии было выявлено в 43 образцах (19,91%). Для гена PhoP не было выявлено случаев гиперэкспрессии в исследованных образцах бактериальных культур *K. pneumoniae*. Полученные результаты представлены в табл. 5.

В 220 образцах ДНК, выделенной из бактериальных культур *K. pneumoniae*, было проведено выявление генов семейства *mgr* методом ПЦР в режиме реального времени с анализом кривых плавления. В ходе исследования в изученных культурах *K. pneumoniae* (n=220) не было выявлено присутствия генов семейства *mgr*.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

В исследованных бактериальных культурах *K. pneumoniae* нарушения структуры гена *mgrB* были выявлены в трех вариантах: полная делеция локуса гена (n=23; 10,45%), делеция части локуса гена (n=22; 10,00%) и вставка инсерционных



последовательностей ($n=24$; 10,91%). При проведении бактериологического исследования устойчивость к колистину была выявлена в 81 образце *K. pneumoniae*. Изменения структуры гена *mgrB* были установлены только среди данных образцов, что составило 85,19% ($n=69$) колистинрезистентных изолятов.

Гиперэкспрессия генов *PhoQ* и *pmrK* была выявлена в 69 и 8 изученных образцах соответственно. Одновременное увеличение экспрессии обоих генов было установлено для 6 бактериальных культур *K. pneumoniae*. Изменения уровня нормализованной экспрессии генов *PhoQ* и *pmrK* были установлены только среди образцов, которые по данным бактериологического исследования были идентифицированы как устойчивые к колистину.

Генетические маркеры устойчивости к колистину были выявлены в 78 образцах (96,29%) колистинрезистентных бактериальных культур *K. pneumoniae*: 7 образцов – изменения только в гене *mgrB*; 9 образцов – изменения только в уровне экспрессии генов (*PhoQ* и/или *pmrK*); 62 образца – одновременное увеличение уровня нормализованной экспрессии генов (*PhoQ* и/или *pmrK*) и изменение структуры гена *mgrB*.

В тех образцах, в которых было установлено отсутствие экспрессии генов *pmrK* или *PhoP*, изменений в структуре гена *mgrB* выявлено не было, все эти изоляты по результатам бактериологического анализа были идентифицированы как чувствительные к колистину.

В бактериальных культурах *K. pneumoniae* не было выявлено присутствия генов семейства *mcr*, что позволяет сделать вывод об отсутствии плазмидопосредованных механизмов резистентности к полимиксинам (колистину) в изученных образцах.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования установлено, что такие молекулярно-генетические маркеры, как повышенная экспрессия генов двухкомпонентных систем *phoPQ* и *pmrAB* (*PhoQ* и/или *pmrK*), а также изменения в структуре гена *mgrB* (инсерции или делеции) выявляются у изолятов *K. pneumoniae*, резистентных к колистину. На основании полученных данных, соответствующих ряду описанных в литературе сведений, установлены наиболее распространенные молекулярно-генетические характеристики, ассоциированные с развитием устойчивости к полимиксинам (колистину), что было выявлено в исследованных бактериальных культурах, полученных от пациентов с сепсисом и септическим шоком. Изучение генетических механизмов, лежащих в основе формирования резистентности к антибактериальным лекарственным средствам, является важной стратегической задачей клинической лабораторной диагностики.

Широкое использование большого спектра антибактериальных и дезинфицирующих средств неизбежно приводит к ускорению формирования и распространения микроорганизмов, несущих в своем геноме различные факторы генетически опосредованной устойчивости к антибактериальным лекарственным средствам. Результатом этого процесса является появление и экспансия штаммов *K. pneumoniae*, устойчивых как к действию широко применяемых в клинической практике лекарственных средств группы карбапенемов, так и препаратов последней линии терапии – группы полимиксинов (колистину).

Распространение резистентных к колистину штаммов *K. pneumoniae* представляет серьезную проблему для общественного здоровья и здравоохранения. Разработка

и внедрение в практическое здравоохранение новых методов определения резистентности возбудителя к колистину позволит не только оптимизировать и персонализировать лечебную тактику ведения пациентов, но и усовершенствовать систему контроля за распространением резистентных штаммов возбудителя.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252–275. doi: 10.1093/femsre/fux013
2. Wang X., Liu Y., Qi X. 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;50(4):536–541. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.009
3. Cai Y., Lee W., Kwa A.L. Polymyxin B versus colistin: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13(12):1481–1497. doi: 10.1586/14787210.2015.1093933
4. Olaitan A.O., Diene S.M., Kempf M. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44(6):500–507. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020
5. Karaiskos I., Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 2014;15(10):1351–70. doi: 10.1517/14656566.2014.914172
6. Huang Y.H., Chou S.H., Liang S.W. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(8):2039–2046. doi: 10.1093/jac/dky164
7. Krapp F., Ozer E.A., Qi C., Hauser A.R. Case Report of an Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection With Genomic Characterization of the Strain and Review of Similar Cases in the United States. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(5):ofy074. Published 2018 Apr 6. doi: 10.1093/ofid/ofy074
8. Falagas M.E., Rafailidis P.I., Matthaiou D.K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat.* 2010;13(4–5):132–138. doi: 10.1016/j.drup.2010.05.002
9. Kaye K.S., Pogue J.M., Tran T.B. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):391–414. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.005
10. Trimble M.J., Mlynářčík P., Kolář M., Hancock R.E. Polymyxin: alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10):a025288. doi: 10.1101/cshperspect.a025288
11. Yang Q., Pogue J.M., Li Z. Agents of Last Resort: An Update on Polymyxin Resistance. *Infect Dis Clin North Am.* 2020;34(4):723–750. doi:10.1016/j.idc.2020.08.003
12. Lippa A.M., Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet.* 2009;5(12):e1000788. doi: 10.1371/journal.pgen.1000788
13. Cheng H.Y., Chen Y.F., Peng H.L. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed Sci.* 2010;17(1):60. doi: 10.1186/1423-0127-17-60
14. Groisman E.A. The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bacteriol.* 2001;183(6):1835–1842. doi: 10.1128/JB.183.6.1835-1842.2001
15. Gao R., Hu Y., Li Z. Dissemination and Mechanism for the MCR-1 Colistin Resistance. *PLoS Pathog.* 2016;12(11):e1005957. doi: 10.1371/journal.ppat.1005957
16. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R. 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;16(2):161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7
17. Novović K., Trudić A., Brkić S. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):e02550-16. doi: 10.1128/AAC.02550-16
18. Kostiuk S., Rudenkova T., Demidchik U., Tretiak I. Procedure development for some ABC and GST family genes expression levels detection in breast cancer tissue FFPE specimens. *Meditinskije novosti.* 2014;12:55–58. (in Russian)
19. Mentasti M., David S., Sands K. Rapid detection and differentiation of mobile colistin resistance (mcr-1 to mcr-10) genes by real-time PCR and melt-curve analysis. *J Hosp Infect.* 2021;110:148–155. doi: 10.1016/j.jhin.2021.01.010