https://doi.org/10.34883/PI.2026.15.2.031
УДК 579.2:579.83:577.113.65

Скоповец Е.Я.[1] ✉, Мательский Н.А.[1], Горбич Ю.Л.[2], Горбич О.А.[3], Кульбицкая Т.Т.[1], Цуранова В.В.[1], Вертёлко В.Р.[1], Солнцева А.В.[1]
[1] Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии, Минск, Беларусь
[2] Комитет по здравоохранению Мингорисполкома, Минск, Беларусь
[3] 1-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

Молекулярно-генетическая характеристика колистинрезистентных изолятов Klebsiella pneumoniae

Конфликт интересов: не заявлен.
Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование, обработка, написание текста, статистическая обработка – Скоповец Е.Я.; концепция и дизайн исследования, сбор материала, редактирование, обработка, написание текста – Мательский Н.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Горбич Ю.Л., Горбич О.А.; сбор материала, редактирование – Кульбицкая Т.Т., Цуранова В.В.; биоинформатическая обработка данных секвенирования – Вертёлко В.Р.; концепция и дизайн исследования, редактирование – Солнцева А.В.
Благодарности: авторы выражают благодарность старшему научному сотруднику лаборатории «Центр аналитических и генно-инженерных исследований» ГНУ «Институт микробиологии Национальной академии наук Беларуси», к.б.н. Охремчук Е.В. за помощь и консультирование в процессе проведения полногеномного секвенирования, а также представительству в Республике Беларусь частной компании с ограниченной ответственностью Pfizer Export B.V. (Королевство Нидерланды).

Подана: 13.03.2026
Принята: 11.05.2026
Контакты: skopovets@yandex.by

Резюме

Цель. Определить генетические механизмы антибиотикорезистентности и вирулентности у колистинрезистентных клинических изолятов Klebsiella pneumoniae, выделенных от пациентов с сепсисом.

Материалы и методы. В исследование были включены изоляты, полученные от 12 пациентов с установленным диагнозом «сепсис», обусловленным K. pneumoniae. Идентификация выделенных штаммов выполнена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (VITEK MS, BioMérieux, Франция). Для выделения геномной ДНК применяли коммерческий набор NucleoSoin DNA Soil (Macherey-Nagel, Германия). Подготовка ДНК-библиотек для полногеномного секвенирования 10 культур осуществлялась с использованием протокола Nextera XT с последующим парноконцевым секвенированием (v3, 600 циклов) на генетическом анализаторе Illumina Miseq (Illumina, США). Для 2 культур, которым WGS выполнено не было, проводили анализ таргетных регионов генов mgrB, pmrA, pmrB и проверку наличия гена mcr1 с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием специфических праймеров и последующим секвенированием по методу Сэнгера. Экстракцию РНК осуществляли с помощью Trizol-реагента. Для анализа экспрессии генов PhoP, PhoQ, pmrK кДНК подвергалась количественной ПЦР на термоциклере cfx96 (BioRad, США).

Результаты. Из 10 колистинрезистентных штаммов Klebsiella pneumoniae, проанализированных методом WGS-секвенирования, выделены 3 сиквенс-типа: ST395, ST147

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

и ST101. Среди генов резистентности к аминогликозидам наиболее часто встречались: aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI и armA. Во всех изолятах отмечалось присутствие гена FosA, связанного с развитием резистентности к фосфомицину. Анализ генов, отвечающих за резистентность к фторхинолонам, выявил у всех штаммов мутации в генах GyrA (p.Ser83Ile) и ParC (p.Ser80Ile); у 9 из 10 штаммов был обнаружен ген qnrs1. Среди генов, обусловливающих резистентность к бета-лактамным антибиотикам, чаще встречались CTX-M-15 (у 9 штаммов) и SHV-11 (у 9 штаммов). Карбапенемаза bla-OXA-48 обнаруживалась у всех штаммов (10 из 10), а NDM-1 – у 60% (6 из 10). Из 12 бактериальных культур K. pneumoniae с МПК к колистину более и/или равной 2 мг/л у 5 штаммов детектировались вставки инсерционных последовательностей в гене mgrB, в 2 случаях – мутация C28F, у одной культуры – делеция mgrB:c.122del с сопутствующей заменой T140P в гене pmrB. Плазмидный ген mcr1 отсутствовал во всех случаях колистинрезистентных бактериальных культур. По результатам оценки экспрессии генов PhoP, PhoQ, pmrK была выявлена гиперэкспрессия по данным мишеням. Между уровнем относительной экспрессии гена PhoP и значениями МПК к колистину была обнаружена сильная положительная корреляция (r=0,79, p=0,00255). Положительная взаимосвязь также выявлена между уровнем относительной экспрессии гена PhoQ и значениями МПК к колистину (r=0,63, p=0,0267).

Заключение. Из 10 колистинрезистентных штаммов Klebsiella pneumoniae по данным WGS-секвенирования выявлено 3 сиквенс-типа: ST395, ST147 и ST101. Наиболее частыми генами резистентности к аминогликозидам были aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI и armA. Во всех случаях обнаружен ген FosA, связанный с резистентностью к фосфомицину. У всех штаммов также выявлены мутации GyrA (p.Ser83Ile) и ParC (p.Ser80Ile) и у 9 – ген qnrs1, что связано с резистентностью к фторхинолонам. У большинства штаммов присутствовали гены CTX-M-15 (90%) и SHV-11 (90%), bla-OXA-48 встречалась в 100%, а NDM-1 – у 60%. У 8 из 12 бактериальных культур K. pneumoniae детектировались функционально значимые мутации в гене mgrB, у одного изолята выявлена замена T140P в гене pmrB. Плазмидный ген mcr1 отсутствовал во всех случаях колистинрезистентных бактериальных культур. По результатам оценки экспрессии генов PhoP, PhoQ, pmrK была выявлена гиперэкспрессия по данным мишеням относительно референсного штамма. Полученные данные свидетельствуют, что точечные, функционально значимые мутации в гене mgrB нарушают работу регулировочных систем, приводят к гиперэкспрессии PhoP, PhoQ, pmrK. Это способствует снижению аффинитета колистина к бактериальной мембране, вызывая устойчивость бактерий к колистину.

Ключевые слова: колистин, секвенирование, ПЦР, резистентность, мутация

Skapavets K.[1] ✉, Matselski N.[1], Gorbich Yu.[2], Gorbich O.[3], Kulbitskaya T.[1], Tsuranova V.[1], Vertelko V.[1], Solntsava A.[1]
[1] Belarusian Research Center for Pediatric Oncology and Hematology, Minsk, Belarus
[2] Healthcare Committee of the Minsk City Executive Committee, Minsk, Belarus
[3] No. 1 City Clinical Hospital, Minsk, Belarus

Molecular Genetic Characterization of Colistin-Resistant Klebsiella Pneumoniae Isolates

Conflict of interest: nothing to declare.
Authors' contribution: concept and design of the study, editing, processing, writing of the text, statistical processing – Skapavets K.; concept and design of the study, collection of materials, editing, processing, writing of the text – Matselski N.; concept and design of the study, editing – Gorbich Yu., Gorbich O.; collection of material, editing – Kulbitskaya T., Tsuranova V.; bioinformatic processing of sequencing data – Vertelko V.; concept and design of the study, editing – Solntsava A.
Acknowledgments: the authors express their gratitude to E. Okhremchuk, PhD, Senior Researcher at the Laboratory of the Center for Analytical and Genetic Engineering Research of the Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, for assistance and consulting during the whole-genome sequencing process, as well as to the representative office of Pfizer Export B.V. (Kingdom of the Netherlands) in the Republic of Belarus.

Submitted: 13.03.2026
Accepted: 11.05.2026
Contacts: skopovets@yandex.by

Abstract

Purpose. To determine the genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae from patients with sepsis.
Materials and methods. The study included 12 patients with a confirmed diagnosis of sepsis caused by K. pneumoniae. Identification of the isolated strains was performed by MALDI-TOF mass spectrometry (VITEK MS, BioMérieux, France). Genomic DNA was isolated using the commercial NucleoSoin DNA Soil kit (Macherey-Nagel, Germany). DNA libraries for WGS of 10 cultures were prepared using the Nextera XT protocol, followed by paired-end sequencing (v3, 600 cycles) on an Illumina Miseq genetic analyzer (Illumina, USA). For 2 cultures for which WGS was not performed, analysis of the mgrB, pmrA, and pmrB target regions was performed, and the presence of the mcr1 gene was verified by PCR using specific primers. RNA extraction was performed using the Trizol reagent. To analyze the expression of the PhoP, PhoQ, and pmrK genes, cDNA was subjected to quantitative PCR on a cfx96 thermal cycler (BioRad, USA).
Results. Of 10 colistin-resistant Klebsiella pneumoniae strains analyzed by WGS sequencing, three sequence types were isolated: ST395, ST147, and ST101. The most frequently encountered aminoglycoside resistance genes were aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI, and armA. All isolates harbored the FosA gene, which is associated with fosfomycin resistance. Analysis of the genes responsible for fluoroquinolone resistance revealed mutations in the GyrA (p.Ser83Ile) and ParC (p.Ser80Ile) genes in all strains; the qnrs1 gene was detected in 9 of 10 strains. Among the genes conferring resistance to beta-lactam antibiotics, the most frequently detected were CTX-M-15 (in 9 strains) and SHV-11 (in 9 strains). Carbapenemase bla-OXA-48 was detected in all strains (10 out of 10), and NDM-1 – in 60% (6 out of 10). Of 12 bacterial cultures of K. pneumoniae with MIC to colistin greater than and/or equal to 2 mg/l, insertions of insertional sequences in the mgrB gene were detected in 5 strains, in 2 cases – the C28F mutation, in one culture – the

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

mgrB:c.122del deletion with a concomitant T140P substitution in the pmrB gene. The plasmid gene mcr1 was absent in all cases of colistin-resistant bacterial cultures. Based on the results of gene expression analysis of PhoP, PhoQ, and pmrK, overexpression of these targets was detected. A strong positive correlation was found between the relative expression level of the PhoP gene and the MIC values to colistin (r=0.79, p=0.00255). A positive relationship was also found between the relative expression level of the PhoQ gene and the MIC values to colistin (r=0.63, p=0.0267).

Conclusion. Of 10 colistin-resistant Klebsiella pneumoniae strains, three sequence types were identified using WGS sequencing data: ST395, ST147, and ST101. The most common aminoglycoside resistance genes were aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI, and armA. The FosA gene, associated with resistance to fosfomycin, was detected in all cases. All strains also had mutations in GyrA (p.Ser83Ile) and ParC (p.Ser80Ile), and 9 had the qnrs1 gene, which is associated with resistance to fluoroquinolones. The majority of strains had the CTX-M-15 (90%) and SHV-11 (90%) genes, while bla-OXA-48 was present in 100% and NDM-1 in 60%. Functionally significant mutations in the mgrB gene were detected in 8 of 12 K. pneumoniae bacterial cultures, and the T140P substitution in the pmrB gene was detected in one isolate. The plasmid mcr1 gene was absent in all cases of colistin-resistant bacterial cultures. Based on the results of gene expression assessment for PhoP, PhoQ, and pmrK, hyperexpression of these targets was detected relative to the reference strain. The obtained data indicate that functionally significant point mutations in the mgrB gene disrupt the functioning of regulatory systems, leading to hyperexpression of PhoP, PhoQ, and pmrK. This contributes to a decrease in colistin's affinity for the bacterial membrane, causing bacterial resistance to colistin.

Keywords: colistin, sequencing, PCR, resistance, mutation

■ ВВЕДЕНИЕ

Согласно мнению экспертов Всемирной организации здравоохранения, проблема устойчивости к противомикробным препаратам становится важнейшей угрозой здоровью мирового населения и ставит перед системами здравоохранения чрезвычайно сложные задачи. Klebsiella pneumoniae является одним из ведущих патогенов нозокомиальных инфекций, характеризующихся высокой степенью антибиотикорезистентности. За последние годы отмечается активное распространение гипервирулентных (hvKP) и мультирезистентных штаммов Klebsiella pneumoniae, что обусловливает осложнение терапии и повышает уровень смертности при инфекциях, вызванных данным возбудителем. Для данных штаммов характерно более быстрое развитие тяжелых инфекций, бактериемии, абсцессов, а также сепсиса.

Главной чертой, отличающей так называемые гипервирулентные штаммы K. pneumoniae, является их гипермукоидный фенотип. Данный фенотип характеризуется усиленной выработкой полисахаридов, которые формируют защитный слой, обуславливая высокую устойчивость бактерий к поглощению фагоцитами. Существует еще несколько факторов патогенности, относящих штамм к гипервирулентному, – синтез сидерофоров (аэробактин, сальмохелин, иерсиниябактин, энтеробактин). Поскольку железо является жизненно необходимым микроэлементом для бактерий, а в организме человека практически все железо находится в связанном состоянии

(трансферрин, лактоферрин), наличие сидерофоров (низкомолекулярных хелатирующих соединений с экстремально высоким сродством к ионам железа) резко повышает устойчивость бактерий в условиях железодефицита in vivo и реализацию их инвазивного потенциала [1, 2].

Ключевыми факторами быстрого накопления резистентных признаков у Klebsiella pneumoniae являются ее генетическая пластичность и способность к горизонтальному переносу генетического материала. Комплексный механизм резистентности включает синтез бета-лактамаз (гены bla_KPC, bla_NDM, bla_OXA-48 и другие), мутации поринов, активизацию эффективных систем эффлюкса, а также модификацию мишеней антибиотиков и выработку ферментов, метилирующих рРНК [3, 4].

Особенно актуальной является резистентность к полимиксинам, в том числе к колистину – последнему резерву антибиотиков, применяемому для борьбы с полирезистентными патогенами. Колистин, имеющий положительный заряд, связывается посредством электростатического взаимодействия с отрицательно заряженными фосфатными группами липида А, важного компонента липополисахарида (ЛПС) грамотрицательных бактерий. Липид А играет решающую роль в проницаемости бактерий и обмене с внешней средой клетки. Колистин конкурентно вытесняет двухвалентные катионы кальция (Ca^{2+}) и магния (Mg^{2+}), нарушая трехмерную структуру ЛПС. Это вызывает потерю целостности клеточной мембраны и в последующем приводит к гибели клетки.

Основные механизмы устойчивости к колистину включают модификацию ЛПС посредством присоединения к нему катионных групп (4-амино-4-дезокси-L-арабиноза, L-Ara4N, и фосфоэтаноламин, pEtN), мутации в генах, регулирующих липидные модификации мембраны, приобретение плазмид и сверхэкспрессию эффлюксных насосов.

Одной из распространенных причин резистентности является вставка инсерционных последовательностей (от англ. insertion sequences, IS) в ген mgrB – малый регуляторный ген, который в норме тормозит активацию системы pmrA/pmrB. Данная система обеспечивает передачу сигнала и регулирует экспрессию генов, ответственных за модификацию ЛПС. Различные инсерции нарушают целостность гена mgrB, что ведет к его частичной или полной инактивации, в результате чего супрессия системы pmrA/pmrB снижается либо утрачивается, приводя к увеличению частоты модификации липидов во внешней мембране, что снижает аффинитет колистина к бактериальной клеточной стенке [5–7].

Помимо вставок инсерционных последовательностей в ген mgrB, встречаются точечные мутации в двухкомпонентной системе pmrA/pmrB. Функционально значимые мутации в генах pmrA и pmrB приводят к гиперактивности системы pmrA/pmrB без необходимости внешних стимулов. Это вызывает повышенную экспрессию целевых генов, таких как pmrK, кодирующий ферменты для модификации ЛПС, что уменьшает связывание колистина с мембраной и способствует развитию резистентности [8–10].

Еще один из механизмов формирования резистентности к колистину – приобретение плазмид. Ген mcr1, плазмидный детерминант устойчивости к колистину, кодирует фермент, называемый фосфоэтаноламинтрансферазой, который изменяет липидную часть внешней мембраны бактерий, что препятствует связыванию и антибактериальной активности колистина. Благодаря своему расположению

на плазмидах ген может перемещаться горизонтально между штаммами и видами бактерий, что способствует распространению устойчивости к колистину по всему миру.

Изучение механизмов развития резистентности к колистину способствует разработке новых диагностических методов для быстрого выявления устойчивых штаммов, а также поиску целевых молекул для новых антибиотиков. Кроме того, знание молекулярно-генетических механизмов резистентности позволяет проводить мониторинг возникновения и распространения резистентных штаммов в клинической практике, что важно для разработки стратегий борьбы с антибиотикорезистентностью и сохранения эффективности существующих терапевтических средств [11, 12].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить генетические механизмы антибиотикорезистентности и вирулентности у колистинрезистентных клинических изолятов Klebsiella pneumoniae, выделенных от пациентов с сепсисом.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение бактериальных изолятов и определение чувствительности к антимикробным лекарственным средствам

В исследование были включены 12 пациентов, которые находились на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии онкогематологического стационара, возрастом от 1 месяца до 28 лет с установленным диагнозом «сепсис», обусловленным K. pneumoniae, в период с января 2022 по апрель 2025 г. Все культуры были выделены из клинически значимых локусов. Идентификация выделенных штаммов выполнена методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (VITEK MS, BioMérieux, Франция). Определение чувствительности к антимикробным лекарственным средствам выполнено с помощью автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция). МПК (минимальная подавляющая концентрация) колистина (от 0,25 до 16 мг/л) определяли коммерческим набором ComASP Colistin (Liofilchem, Италия). Результаты определения чувствительности интерпретировали согласно критериям Европейского комитета по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) – EUCAST (v. 15.0, 2025) (табл. 1).

Из 12 исследуемых культур устойчивость к цефепиму, левофлоксацину и меропенему наблюдалась у всех изолятов (100%), устойчивость к амикацину – среди 10 (83,3%) изолятов, устойчивость к колистину – среди 10 (83,3%) изолятов. При этом у 2 изолятов значения МПК к колистину были равны 2 мг/л, что соответствует пограничному значению для критерия чувствительного штамма. Следует отметить, что для данных 2 изолятов (№ 2 и 13) в последующем наблюдались повышенные уровни экспрессии в генах PhoP и PhoQ.

Для проведения дальнейших исследований штаммы были подвергнуты криоконсервации в бульоне с сердечно-мозговой вытяжкой и 30% глицерина и хранились при –80 °C.

Таблица 1
Определение чувствительности выделенных штаммов к стандартно назначаемым антимикробным лекарственным средствам
Table 1
Determination of the sensitivity of isolated strains to standardly prescribed antimicrobial drugs

№ изолята	МПК FEP	S/I/R FEP	МПК LVX	S/I/R LVX	МПК MEM	S/I/R MEM	МПК AN	S/I/R AN	МПК COL	S/I/R COL
1	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	>256	R
2	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	2	S
3	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	64	R
4	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	16	R
5	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	32	R
6	>8	R	>2	R	>8	R	≤8	S	32	R
11	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	128	R
13	>16	R	>8	R	>8	R	>32	R	2	S
14	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	64	R
16	>8	R	>2	R	>8	R	≤8	S	16	R
18	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	4	R
19	>8	R	>2	R	>8	R	>32	R	4	R

Примечания: FEP – цефепим; LVX – левофлоксацин; MEM – меропенем; AN – амикацин; COL – колистин.

Определение уровня экспрессии генов PhoP, PhoQ и pmrK с помощью ПЦР в режиме реального времени

Тотальная рибонуклеиновая кислота (РНК) была выделена из бактериальных культур, находящихся на экспоненциальной фазе роста, выращенных в LB-бульоне (Roth, Германия) с 2 мг/л колистина сульфата. Экстракцию РНК проводили с помощью Trizol-реагента согласно инструкции производителя, предварительно обработав лизоцимом (0,5 мг/мл). Для очистки РНК от геномной ДНК проводилась последующая обработка образцов РНК ДНКазой (Invitrogen, США). Определение концентрации и степени чистоты выделенной РНК проводили спектрофотометрическим методом (DeNovix). РНК подвергалась обратной транскрипции с использованием набора реагентов ArtMMLV Total (ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь). Для анализа экспрессии целевых генов кДНК подвергалась количественной ПЦР в 15 мкл реакции, содержащей 10 pM прямого и обратного праймера и 2x SYBR green PCR Master mix, на термоциклере cfx96 (BioRad, США). Экспрессию гена rpoB использовали в качестве внутреннего контроля. Праймеры и условия амплификации, использованные для анализа ОТ-кПЦР, перечислены в табл. 2. Нормализацию проводили относительно гена rpoB с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$, а полученные значения затем нормализовали относительно значений, обнаруженных в референсном штамме K. quasipneumoniae ATCC 700603.

Полногеномное секвенирование (WGS) и капиллярное секвенирование по методу Сэнгера

Для выделения геномной ДНК использовали коммерческий набор NucleoSoin DNA Soil (Macherey-Nagel, Германия). Верификацию качества выделенной ДНК и определение ее концентрации проводили спектрофотометрически (DeNovix), оценивая

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

Таблица 2
Последовательность олигонуклеотидов и условия реакции, используемые для определения экспрессии генов с помощью ОТ-кПЦР и амплификации продуктов генов mgrB, pmrA, pmrB, mcr1
Table 2
Oligonucleotide sequences and reaction conditions used for the determination of gene expression by RT-qPCR and amplification of the mgrB, pmrA, pmrB, and mcr1 gene products

	Последовательность (5′-3′)	Условия амплификации	Источник
ОТ-кПЦР			
rpoB_F	AAATCACCCAAGGCGACGAT	1 цикл: 95 °C – 5 мин. 40 циклов: 95 °C – 10 с 56 °C – 15 с – считывание флуоресцентного сигнала 67 °C – 15 с	[12]
rpoB_R	ACCCTTGTTACCGTGACGAC		
PhoP_F	ATTGAAGAGGTTGCCGCCCGC		[12]
PhoP_R	GCTTGATCGGCTGGTCATTCACC		
PhoQ_F	ATATGCTGGCGAGATGGGAAAACGG		[14]
PhoQ_R	CCAGCCAGGGAACATCACGCT		
pmrK_F	CGCTGAATATGCTCGACCCAGAAG		
pmrK_R	GCTGGCGGTAATCGTCTGTACG		
ПЦР			
mgrB_ext_F	AAGGCGTTCATTCTACCACC	1 цикл: 95 °C – 10 мин. 35 циклов: 95 °C – 30 с 60 °C – 30 с 72 °C – 120 с. 1 цикл: 72 °C – 10 мин	[12]
mgrB_ext_R	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC		
pmrA_F	CATTTCCGCGCACTGTCTGC		[13]
pmrA_R	CAGCTTTCAGTTGCAAACAG		
pmrB_F	GAATCTGATGCATTTGCGC		[15]
pmrB_R	TTATATCTGGTTTGCCACGTACTG		
mcr1_F	TCGTATCGCTATGTGCTAAAGC		[16]
mcr1_R	TCGGTCTGTAGGGCATTTTG		

соотношения при длинах волн 260 нм / 230 нм, 260 нм / 280 нм. Для 10 бактериальных культур с МПК к колистину более 2 мг/л было проведено полногеномное секвенирование (WGS). Подготовка ДНК-библиотек осуществлялась с использованием протокола Nextera XT с последующим парноконцевым секвенированием (v3, 600 циклов) на генетическом анализаторе Illumina Miseq (Illumina, США). Сборку геномных последовательностей и их аннотацию выполняли посредством программного пакета SPAdes (version 4.0), аннотация генома проводилась с использованием программного ресурса Prokka (version 1.14.5) [17, 18]. Выравнивание прочтений проводилось на референсный геном K. quasipneumoniae ATCC 700603 (NCBI: NZ_CP014696.2). Мультилокусное сиквенс-типирование (MLST), идентификация факторов вирулентности и генов резистентности осуществлялись с использованием программного пакета Kleborate v0.3.0. Инсерционные элементы идентифицировали в базе NCBI с помощью веб-ресурса ISFinder [19]. Для прогнозирования влияния нуклеотидных замен на структуру аминокислотных последовательностей и функциональную активность белков применяли программный инструмент PROVEAN Protein [20].

Для 2 культур, которым WGS выполнено не было, проводили анализ таргетных регионов mgrB, pmrA, pmrB и проверку наличия гена mcr1 с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров. Для амплификации данных регионов применяли комплект реагентов для ПЦР DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific, США) и пары специфических праймеров (табл. 2). Реакцию терминации проводили

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

с применением набора BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США). Для капиллярного секвенирования по Сэнгеру использовали генетический анализатор Applied Biosystems 3500/3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности биоинформатически обрабатывали и сравнивали с базой нуклеотидных последовательностей GenBank (NCBI).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате сравнения последовательностей гена mgrB исследованных образцов с референсным штаммом K. quasipneumoniae ATCC 700603 у 2 колистинрезистентных штаммов K. pneumoniae (МПК колистина 32 и 128 мг/л) было выявлено наличие однонуклеотидных замен, приводящих к изменению функциональной активности продуктов трансляции (C28F). Позиция 28 считается важной областью в mgrB из-за ключевой роли дисульфидных связей остатка цистеина в функциональности данного белка [21]. Еще у 5 штаммов устойчивость к колистину была вызвана вставкой инсерционных последовательностей семейств IS1 и IS5 в ген mgrB (рис. 1). У штамма № 3 с МПК 64 мг/л продукта амплификации гена mgrB по результатам ПЦР вовсе выявлено не было, при анализе данных WGS в данном гене определена крупная делеция mgrB: c.122del, однако у данного изолята также наблюдалась сочетанная замена T140P и в гене pmrB. Функциональная значимость данного генетического нарушения в возникновении колистинрезистентности у K. pneumoniae подтверждена другими исследованиями [22].

У 4 колистинрезистентных штаммов значимых генетических нарушений в гене mgrB выявлено не было (табл. 3). Во всех случаях в гене pmrB идентифицировали однонуклеотидную замену, приводящую к изменению аминокислотной последовательности (R256G), которая, согласно базе Provean Protein, отмечена как функционально значимая. Еще у одного клинического изолята K. pneumoniae с МПК 128 мг/л, помимо наличия замены C28F в гене mgrB, также было отмечено наличие замены G53S в гене pmrA. Данная замена, согласно базе данных Provean Protein, отмечена как оказывающая отрицательное влияние на функциональность белка. Отсутствие продукта амплификации гена mcr1 детектировалось во всех случаях.

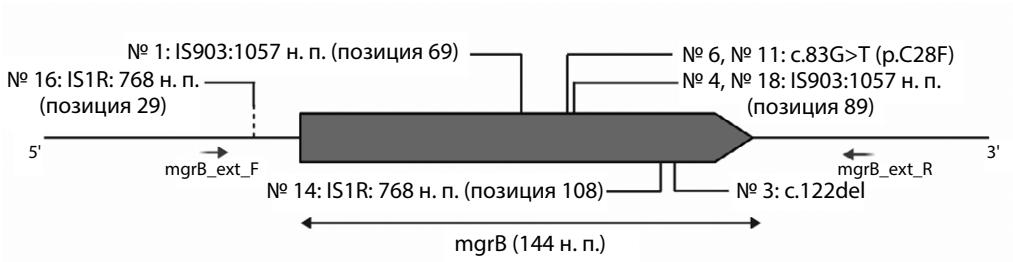


Рис. 1. Схема расположения генетических нарушений в гене mgrB у колистинрезистентных штаммов K. pneumoniae
Fig. 1. Schematic diagram of the location of genetic abnormalities in the mgrB gene in colistin-resistant K. pneumoniae strains

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

Таблица 3
Результаты молекулярно-генетических исследований механизмов резистентности к полимиксинам у колистинрезистентных штаммов Klebsiella pneumoniae
Table 3
Results of molecular genetic studies of the mechanisms of resistance to polymyxins in colistin-resistant strains of Klebsiella pneumoniae

№ изолята	МПК, мг/л	Метод анализа	mgrB	pmrA	pmrB	Результаты экспрессии		
						PhoP	PhoQ	pmrK
1	>256	WGS	69 н. п.: IS903 (1057 н. п.)	wt	R256G	7,88	9,61	5,12
2	2	Капиллярное секвенирование по Сэнгеру	wt	wt	R256G	1,32	1,91	0,52
3	64	WGS	c.122del	wt	R256G, T140P	5,54	6,78	14,84
4	16	WGS	89 н. п.: IS903 (1057 н. п.)	wt	R256G	3,63	6,11	3,21
5	32	WGS	wt	wt	R256G	3,44	3,61	1,55
6	32	WGS	C28F	wt	R256G	4,22	4,44	2,43
11	128	WGS	C28F	G53S	R256G	3,17	1,84	2,44
13	2	Капиллярное секвенирование по Сэнгеру	wt	wt	R256G	1,81	2,10	6,43
14	64	WGS	108 н. п.: IS1R (768 н. п.)	wt	R256G	5,08	4,39	1,53
16	16	WGS	29 н. п.: IS1R (768 н. п.)	wt	R256G	4,08	3,35	2,21
18	4	WGS	89 н. п.: IS903B (1057 н. п.)	wt	R256G	1,80	2,91	4,03
19	4	WGS	wt	wt	R256G	2,64	4,64	2,41

Анализ данных полногеномного секвенирования

Среди 10 изолятов K. pneumoniae было определено 3 различных типа последовательностей (ST); 6 из них были представлены одним сиквенс-типом ST395, 3 изолята ST147 и 1 изолят ST101. Каждый из изолятов имел от 2 до 8 мобильных генетических элементов, самое большое количество было определено у клинического изолята № 3 с ST-101 – Col440II, ColpVC, IncFIA(HI1), IncFIB(K), IncFII, IncL/M(pOXA-48), IncN, IncR. Большинство бактерий содержали плазмиды IncFIB(Mar) и IncR. На основании данных WGS-секвенирования определены капсульные типы. Среди 10 клинических изолятов 4 (40%) принадлежали к типу K2 и имели сиквенс-тип ST395 (№ 1, 5, 6 и 11). Были обнаружены и другие капсульные типы: K64 (30%), K39 (20%), K17 (10%). По результатам оценки вирулентности на основе наличия генетических детерминант иерсиниабактина, аэробактина, сальмохелина, колибактина и системы rmpADC с помощью программы Kleborate у 3 изолятов с ST395 показатель вирулентности был максимальный – 4 (№ 5, 19, 14), у остальных равен 1 (рис. 2).

Среди генов резистентности к аминогликозидам наиболее часто встречались: aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI и armA (рис. 3). Во всех случаях отмечалось наличие гена FosA, связанного с развитием резистентности к фосфомицину. Анализ генов резистентности к фторхинолонам позволил идентифицировать у всех изолятов наличие мутации в генах GyrA: p.Ser83Ile и ParC: p.Ser80Ile; кроме того, у 9 из 10 штаммов

НА ПЕРВУЮ | НА СЛЕДУЮЩУЮ | НА ПРЕДЫДУЩУЮ | К СОДЕРЖАНИЮ

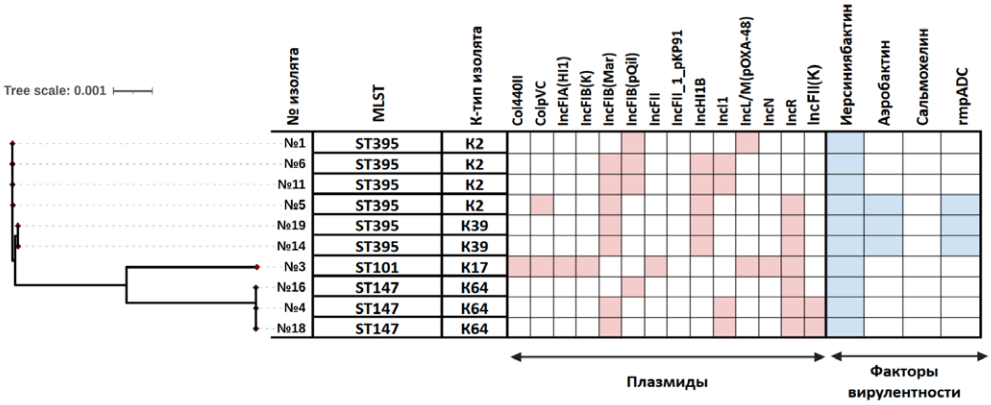


Рис. 2. Факторы вирулентности и плазмиды колистинрезистентных изолятов
Fig. 2. Virulence factors and plasmids of colistin-resistant isolates

было выявлено наличие гена qnrs1. Среди генов резистентности к бета-лактамным антибиотикам также часто встречались CTX-M-15 (9/10) и SHV-11 (9/10). Карбапенемаза bla-OXA-48 присутствовала в 100% случаев (10/10), NDM-1 – в 60% (6/10).

Анализ экспрессии генов PhoP, PhoQ и pmrK

Экспрессия генов PhoP и PhoQ, входящих в систему двухкомпонентной регуляции PhoP/PhoQ, также влияет на устойчивость к колистину. В ответ на внешние стимулы, такие как низкий уровень магния или цинка, PhoQ активирует PhoP, что, в свою очередь, регулирует гены, участвующие в модификации мембраны и формировании резистентных фенотипов.

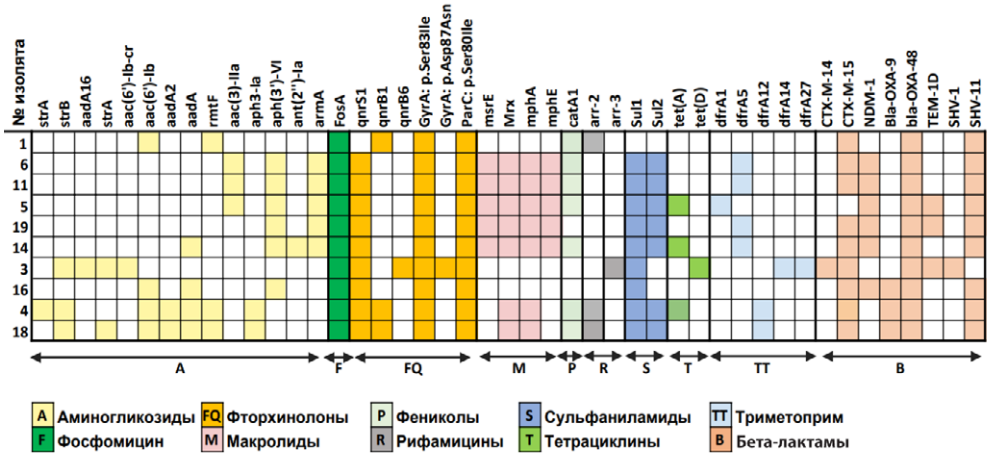


Рис. 3. Генетические детерминанты устойчивости к антибиотикам
Fig. 3. Genetic determinants of antibiotic resistance

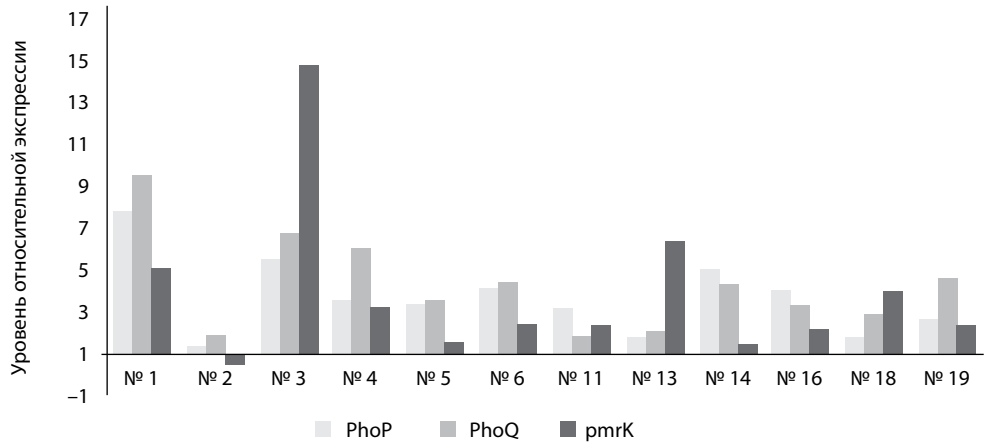


Рис. 4. Оценка уровней относительной экспрессии генов PhoP, PhoQ, pmrK у колистинрезистентных бактериальных штаммов Klebsiella pneumoniae
Fig. 4. Evaluation of the relative expression levels of the PhoP, PhoQ, and pmrK genes in colistin-resistant bacterial strains of Klebsiella pneumoniae

Анализ экспрессии генов PhoP и PhoQ у бактериальных культур с измененным mgrB выявил многократное увеличение транскрипции генов PhoP, PhoQ, а в некоторых случаях и pmrK (рис. 4).

Между уровнем относительной экспрессии гена PhoP и значениями МПК к колистину была обнаружена сильная положительная корреляция (r=0,79, p=0,00225), что указывает на тесную линейную связь между этими показателями (рис. 5). Положительная взаимосвязь также выявлена между уровнем относительной экспрессии гена PhoQ и значениями МПК к колистину (r=0,63, p=0,0267). Между уровнем

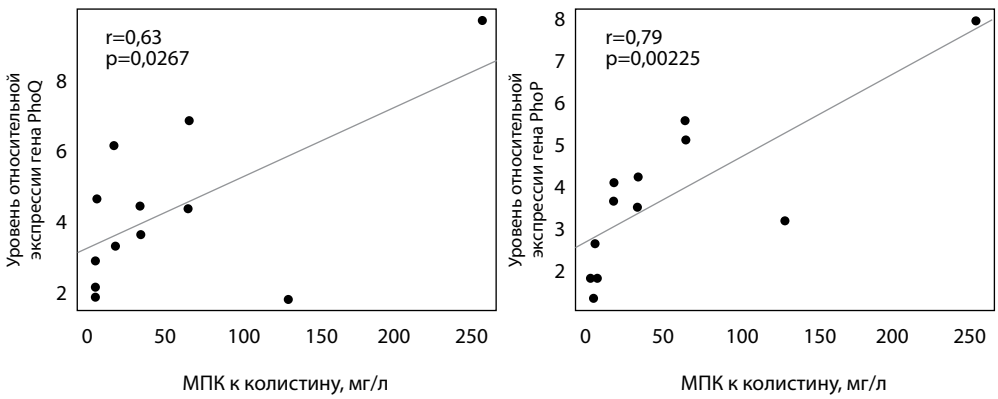


Рис. 5. Оценка корреляционных зависимостей между уровнями относительной экспрессии генов PhoP, PhoQ и значениями МПК к колистину
Fig. 5. Evaluation of correlations between the levels of relative expression of the PhoP, PhoQ genes and the MIC values to colistin

НА ПЕРВУЮ НА СЛЕДУЮЩУЮ НА ПРЕДЫДУЩУЮ К СОДЕРЖАНИЮ

относительной экспрессии гена pmrK и значениями МПК к колистину корреляция отсутствовала, что также было подтверждено статистически (p=0,612).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из 10 колистинрезистентных штаммов Klebsiella pneumoniae, проанализированных методом WGS-секвенирования, выделены 3 сиквенс-типа: ST395, ST147 и ST101. Согласно данным анализа, 4 из 10 клинических изолятов (40%) принадлежали к капсульному типу K2 и имели сиквенс-тип ST395. Были также выявлены и другие капсульные типы: K64 у 30%, K39 у 20% и K17 у 10%. Оценка вирулентности на основе наличия генетических детерминантов иерсиниябактина, аэробактина, колибактина, сальмохелина, а также генов системы rmpADC показала, что у 3 штаммов с сиквенс-типом ST395 уровень вирулентности был максимальным – 4 балла, тогда как у остальных он составлял 1.

Среди генов резистентности к аминогликозидам наиболее часто встречались: aac(6')-Ib, aadA, aac(3)-IIa, aph(3')-VI и armA. Во всех изолятах отмечалось присутствие гена FosA, связанного с развитием резистентности к фосфомицину. Анализ генов, отвечающих за резистентность к фторхинолонам, выявил у всех штаммов мутации в генах GyrA (p.Ser83Ile) и ParC (p.Ser80Ile); кроме того, у 9 из 10 штаммов был обнаружен ген qnrs1. Среди генов, обусловливающих резистентность к бета-лактамным антибиотикам, чаще всего встречались CTX-M-15 (у 9 штаммов) и SHV-11 (у 9 штаммов). Карбапенемаза bla-OXA-48 обнаруживалась у всех штаммов (10 из 10), а NDM-1 – у 60% (6 из 10).

Из 12 бактериальных культур Klebsiella pneumoniae с МПК к колистину более и/или равной 2 мг/л у 5 штаммов детектировались вставки IS-элементов в гене mgrB, в 2 случаях выявлена мутация C28F, у одной культуры наблюдалась делеция c.122del в гене mgrB с сопутствующей заменой T140P в гене pmrB. Анализ генов PhoP и PhoQ по результатам WGS-секвенирования не выявил отличных от референсной последовательности генетических изменений. Плазмидный ген mcr1 отсутствовал во всех случаях колистинрезистентных бактериальных культур, это свидетельствует о том, что резистентность в таких случаях чаще обусловлена другими механизмами, а не переносом плазмидного гена mcr1, что характерно для многих представителей семейства энтеробактерии.

По результатам оценки экспрессии генов PhoP, PhoQ, pmrK была выявлена гиперэкспрессия по данным мишеням относительно референсного чувствительного штамма. Между уровнем относительной экспрессии гена PhoP и значениями МПК к колистину была обнаружена сильная положительная корреляция (r=0,79, p=0,00255), что указывает на тесную линейную связь между этими показателями. Положительная взаимосвязь также выявлена между уровнем относительной экспрессии гена PhoQ и значениями МПК к колистину (r=0,63, p=0,0267). Между уровнем относительной экспрессии гена pmrK и значениями МПК к колистину корреляция отсутствовала, что также было подтверждено статистически (p=0,612).

Полученные данные показывают, что точечные однонуклеотидные, функционально значимые замены нуклеотидов, делеции и вставки инсерционных последовательностей в гене mgrB нарушают работу регулировочных систем, приводят к гиперэкспрессии PhoP, PhoQ, pmrK. Это способствует снижению аффинитета колистина к бактериальной мембране, вызывая устойчивость бактерий к колистину.

В случае выявления устойчивости к полимиксинам среди K. pneumoniae альтернативной терапией может стать назначение цефтазидима/авибактама для штаммов, продуцирующих сериновые бета-лактамазы, а при сопутствующей копродукции металлобеталактамаз – схемы терапии, основанные на комбинации цефтазидима/авибактама и азтреонама при обязательном условии их одномоментного введения через разные порты.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Al Ismail D., Campos-Madueno E.I., Donà V., et al. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae (hvKp): Overview, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Pathog Immun*. 2025 Jan 24;10(1):80–119. doi: 10.20411/pai.v10i1.777
2. Marr C.M., Russo T.A. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a new public health threat. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2019;17(2):71–3. doi: 10.1080/14787210.2019.1555470
3. Karami-Zarandi M., Rahdar H.A., Esmaeili H., et al. Klebsiella pneumoniae: An Update on Antibiotic Resistance Mechanisms. *Future Microbiology*. 2023;18(1):65–81. https://doi.org/10.2217/fmb-2022-0097
4. Shah A.A., Alwashmi A.S.S., Abalkhail A., et al. Emerging challenges in Klebsiella pneumoniae: Antimicrobial resistance and novel approach. *Microb Pathog*. 2025 May;202:107399. doi: 10.1016/j.micpath.2025.107399
5. Luo Q., Wang Y., Xiao Y. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (mcr) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosaf. Health*. 2020;2:71–78. doi: 10.1016/j.bsheal.2020.05.001
6. Khondker A., Rheinstadter M.C. How do bacterial membranes resist polymyxin antibiotics? *Commun. Biol.* 2020;3:77. doi: 10.1038/s42003-020-0803-x
7. Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.M. Mechanisms of polymyxin resistance: Acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front. Microbiol*. 2014;5:643. doi: 10.3389/fmicb.2014.00643
8. Cannatelli A., Giani T., D'Andrea M.M., et al.; COLGRIT Study Group. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing Klebsiella pneumoniae of clinical origin. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2014;58:5696–5703. doi: 10.1128/AAC.03110-14
9. Da Silva K.E., Thi Nguyen T.N., Boinett C.J., et al. Molecular and epidemiological surveillance of polymyxin-resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated from Brazil with multiple mgrB gene mutations. *Int. J. Med. Microbiol*. 2020;310:151448. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151448
10. Poirel L., Jayol A., Bontron S., et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in Klebsiella pneumoniae. *J. Antimicrob. Chemother*. 2015;70:75–80. doi: 10.1093/jac/dku323
11. Nwabor O.F., Terbtothakun P., Voravuthikunchai S.P., et al. A Bibliometric Meta-Analysis of Colistin Resistance in Klebsiella pneumoniae. *Diseases*. 2021;9:44. doi: 10.3390/diseases9020044
12. Cannatelli A., D'Andrea M.M., Giani T., et al. In vivo emergence of colistin resistance in Klebsiella pneumoniae producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013;57:5521–5526. doi: 10.1128/AAC.01480-13
13. Zhu X., Yan J., Lai X., et al. Polymyxin-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae clinical isolates from a tertiary hospital in China: molecular mechanisms, antimicrobial susceptibility, and virulent phenotypes. *Front. Microbiol*. 2025;16:1705471. doi: 10.3389/fmicb.2025.1705471
14. Cannatelli A., Giani T., D'Andrea M.M., et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing Klebsiella pneumoniae of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(10):5696–5703. doi: 10.1128/AAC.03110-14
15. Kim S., Woo J.H., Kim N., et al. Characterization of chromosome-mediated colistin resistance in Escherichia coli isolates from livestock in Korea. *Infect. Drug Resist*. 2019;12:3291–3299. doi: 10.2147/IDR.S225383
16. Dung T.T.N., Phat V.V., Vinh C., et al. Development and validation of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of six bacterial pathogens causing lower respiratory tract infections and antimicrobial resistance genes. *BMC Infect Dis.* 2024;24:164. https://doi.org/10.1186/s12879-024-09028-2
17. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012 May;19(5):455–77. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
18. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014;30(14):2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153
19. ISfinder. Available at: https://isfinder.com (date of access: 19.12.2025).
20. Provean Protein. Available at: https://provean.jcvi.org (date of access: 19.12.2025).
21. Kong Y., Li C., Chen H., et al. In vivo emergence of colistin resistance in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae mediated by premature termination of the mgrB Gene regulator. *Front Microbiol*. 2021;12:656610.
22. Shahab M., et al. Investigating the role of pmrB mutation on Colistin antibiotics drug resistance in Klebsiella pneumoniae. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;281:136414.