

## Характеристика штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка по результатам полногеномного секвенирования

А. В. Устюжанин\*, А. А. Маханек, Г. Н. Чистякова, И. И. Ремизова, С. В. Бычкова, Д. А. Абакарова

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург

### Резюме

**Актуальность.** *Klebsiella pneumoniae* является распространенным внутрибольничным возбудителем в педиатрических стационарах, зачастую характеризующимся наличием широкого спектра факторов вирулентности и генетических детерминант антибиотикорезистентности. **Цель.** Характеристика штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка по результатам полногеномного секвенирования. **Материалы и методы.** Секвенирование бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) продуцирующего штамма *K. pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры новорожденного недоношенного ребенка выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК полного генома *K. pneumoniae* проводили с использованием сайта Центра геномной эпидемиологии. Поиск генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности осуществляли с использованием онлайн-сервисов. **Результаты и обсуждение.** Полученная нуклеотидная последовательность была длиной 5 414 099 п.н., доля азотистых оснований GC составила 57,3%. Выделенный штамм относится к сиквенс-типу ST3559, имеет 4 гена, кодирующих синтез ферментов, гидролизующих антибактериальные препараты из группы бета-лактамов, 2 гена, обеспечивающих устойчивость к хинолонам/фторхинолонам, по 1 гену резистентности к триметоприму, хлорамфениколу, фосфомицину и антибиотикам группы аминогликозидов. Большинство генов факторов вирулентности, выявленных в изучаемом штамме, обеспечивают распознавание и поглощение ионов железа, необходимых для конкурентоспособного функционирования бактериальной клетки. *K. pneumoniae* обладает геном эффлюксных насосов *acrA* и его регуляторами, а также 4 профаговыми частицами и одной системой CRISPCas IE. **Заключение.** Полногеномное секвенирование штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка, позволяет подробно охарактеризовать возбудителя генерализованной инфекции, детектировать широкий спектр генетических детерминант факторов вирулентности и антибиотикорезистентности. БЛРС-продуцирующий штамм *K. pneumoniae* как этиологический агент неонатального сепсиса характеризуется наличием генов вирулентности, множественной лекарственной устойчивостью, сформированной за счет генов, кодирующих ферменты, гидролизующие антибиотики, и наличия эффлюксных насосов и их регуляторов. Использование результатов традиционных культуральных методов исследования совместно с данными высокопроизводительного секвенирования является перспективным направлением научных исследований, имеет резерв практического применения в области клинической медицины, генетики микроорганизмов, молекулярной эпидемиологии на локальном и глобальном уровнях.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, полногеномное секвенирование, гены факторов вирулентности, гены резистентности  
Конфликт интересов не заявлен.

**Для цитирования:** Устюжанин А. В., Маханек А. А., Чистякова Г. Н. и др. Характеристика штамма *Klebsiella pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка по результатам полногеномного секвенирования. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2024;23(4):96-103. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-4-96-103>

### Characteristics of the *Klebsiella Pneumoniae* Strain Isolated from a Positive Blood Culture of a Premature Newborn Baby According to the Results of Whole Genome Sequencing

AV Ustyuzhanin\*\*, AA Makhanyok, GN Chistyakova, II Remizova, SV Bychkova, DA Abakarova  
Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Yekaterinburg, Russia

\* Для переписки: Устюжанин Александр Владимирович, к. м. н., старший научный сотрудник научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 1. +7 (908) 924-94-19, факс +7 (343) 371-87-68, [ust103@yandex.ru](mailto:ust103@yandex.ru). ©Устюжанин А. В. и др.

\*\* For correspondence: Ustyuzhanin Alexander V., Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 1, St. Repina, Yekaterinburg, 620028, Russia. +7 (908) 924-94-19, [ust103@yandex.ru](mailto:ust103@yandex.ru). ©Ustyuzhanin AV, et al.

**Abstract**

**Relevance.** *K. pneumoniae* is a common nosocomial pathogen in pediatric hospitals, often characterized by the presence of a wide range of virulence factors and genetic determinants of antibiotic resistance. **Aim.** To analyze the results obtained during whole-genome sequencing of a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a positive blood culture of a premature newborn. **Materials and methods.** An ESBL-producing strain of *K. pneumoniae* isolated from a positive blood culture of a newborn premature infant. Sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina). Analysis of DNA nucleotide sequences of the complete genome of *K. pneumoniae* was carried out using the website of the Center for Genomic Epidemiology. The search for genetic determinants of antibiotic resistance and virulence was carried out using online services. **Results and its discussion.** The resulting nucleotide sequence was 5,414,099 bp in length, and the proportion of GC nitrogenous bases was 57.3%. The isolated strain belonged to the sequence type ST3559, had 4 genes encoding the synthesis of enzymes that hydrolyze antibacterial drugs from the beta-lactam group, 2 genes providing resistance to quinolones/fluoroquinolones, 1 resistance gene each to trimethoprim, chloramphenicol, fosfomycin and aminoglycoside antibiotics. Most of the virulence factor genes identified in the studied strain ensure the recognition and absorption of iron ions necessary for the competitive functioning of the bacterial cell. *K. pneumoniae* possesses the *acrA* efflux pump gene and its regulators, as well as 4 prophage particles and 1 CRISPCas IE system. **Conclusions.** Whole-genome sequencing of the *K. pneumoniae* strain isolated from a positive blood culture of a premature newborn allows us to characterize in detail the causative agent of a generalized infection and detect a wide range of genetic determinants of virulence factors and antibiotic resistance. The ESBL-producing strain of *K. pneumoniae*, as the etiological agent of neonatal sepsis, was characterized by the presence of virulence genes, multidrug resistance, both due to genes encoding enzymes that hydrolyze antibiotics, and due to the presence of efflux pumps and their regulators. The use of the results of traditional cultural research methods together with high-throughput sequencing data is a promising area of scientific research and has a reserve of practical application in the field of clinical medicine, genetics of microorganisms, molecular epidemiology at the local and global levels.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, complete genome sequencing, virulence factor genes, antibiotic resistance genes  
No conflict of interest to declare.

**For citation:** Ustyuzhanin AV, Makhanyok AA, Chistyakova GN, et al. Characteristics of the *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a positive blood culture of a premature newborn baby according to the results of whole genome sequencing. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(4):96-103 (In Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2024-23-4-96-103>

**Введение**

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) – типичный представитель энтеробактерий, колонизирующий нестерильные локусы человеческого организма, и при развитии инфекционно-воспалительных процессов может осложнить их течение [1,2]. *K. pneumoniae* является распространенным внутрибольничным возбудителем в педиатрических стационарах, зачастую характеризующимся наличием широкого спектра факторов вирулентности и генетических детерминант антибиотикорезистентности [3,4]. Это также один из наиболее часто встречающихся этиологических агентов неонатального сепсиса, проникновение в кровеносное русло которого реализуется путем транслокации через стенку кишки ранее колонизированного новорожденного ребенка. При этом открытым остается вопрос в причинах развития инфекционного процесса при колонизации нестерильного в норме кишечного биотопа. В настоящее время сохраняются трудности в прогнозировании и профилактике инфекционных осложнений у госпитализированных пациентов. Сложность патогенеза генерализации инфекционного процесса заключается в преодолении физического, химического и биологического барьеров кишечника за счёт таких генетически детерминированных факторов вирулентности, как адгезины, инвазины, капсула и др. [5].

**Цель** – анализ результатов, полученных в ходе полногеномного секвенирования штамма *Klebsiella*

*pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка.

**Материалы и методы**

Штамм *K. pneumoniae*, продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра (БЛРС+), получен от ребенка П., который родился на 29,5 неделе гестации, весом 1190 г. После рождения был переведен в ОРИТН, где находился на искусственной вентиляции легких в течение 21 суток. На 26-е сутки ребенок из ОРИТН переведен в ОПННД. При проведении локального микробиологического мониторинга установлено, что кишечник новорожденного колонизирован БЛРС продуцирующим штаммом на 39-е сутки жизни. На 49-е сутки выделена *K. pneumoniae* БЛРС+ из положительной гемокультуры, доставленной при ухудшении клинического состояния (субфебрилитет до 37,3, «мраморность» кожного покрова, СРБ 20,4 г/л).

Культивирование педиатрического флакона с пробой крови проводили в анализаторе «VasT/ALERT», bioMerieux, Франция.

Высев положительной гемокультуры осуществляли на питательные среды: дифференциально-диагностическую питательную среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия) и на кровяно-сыровоточный агар (основа-Conda, Испания).

Идентификацию бактерии до вида и определение чувствительности к антибактериальным препаратам (ампициллин, амоксициллин + клавулановая кислота,

цефотаксим, цефтазидим, цефепим, эртапенем, меропенем, амикацин, гентамицин, цiproфлоксацин, тайгециклин, фосфомицин, нитрофурантоин, триметоприм сульфаметоксазол) проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе VITEK 2 compact (Bio Mérieux, Франция, входит в перечень оборудования ЦКП «Инновационный научно-лабораторный центр перинатальной и репродуктивной медицины» ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России), согласно инструкции производителя с использованием карт VITEK 2 GN (идентификация) и AST-N360 – определение антибиотикочувствительности.

С целью выявления пленкообразующей способности культивировали чистую суточную культуру бактерий в 300 мкл тиогликолевой среды («Питательная среда для контроля стерильности, ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск, Россия») в ячейке 96-луночного планшета (МиниМед, г. Брянск, Россия) в течение 24 часов. Затем удаляли культуральную жидкость, однократно промывали лунки стерильным физиологическим раствором, высушивали в течение 2 часов при температуре 37 °С в термостате. Добавляли кристаллический генцианвиолет (BD BBL, США), выдерживали экспозицию в течение 10 минут. Удаляли краситель, трижды промывали дистиллированной водой, добавляли 96° этиловый спирт, выдерживали экспозицию 10 минут и измеряли поглощение световой волны на микропланшетном фотометре (ImmunoChem-2100, США).

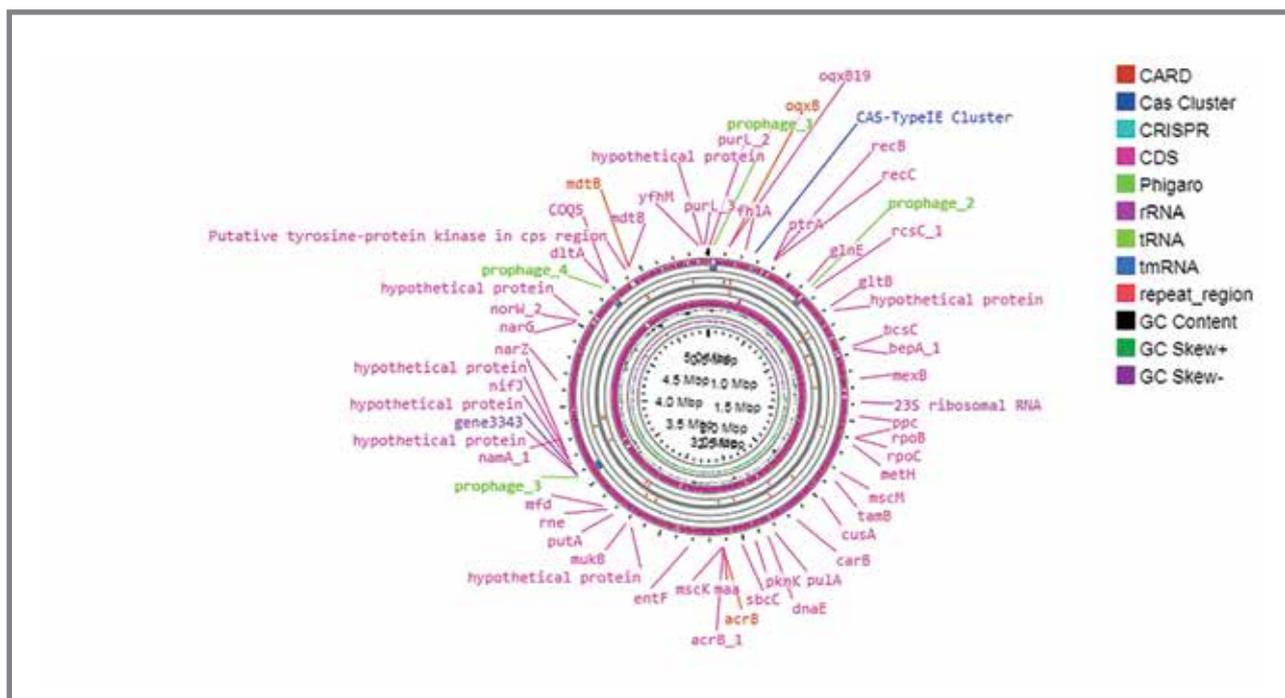
Для выделения ДНК использовали суточную культуру. Бактериальную ДНК выделяли с использованием

коммерческих наборов D-Cells-10, согласно инструкции производителя (ООО «Биолабмикс», Россия). Секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Качество прочтений оценивали с помощью программного инструмента FastQC [6]. Генотипирование штамма проводили методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) по методике, предложенной Институтом Пастера (Франция, Париж) [7]. Осуществляли анализ нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства»: *groB* (бета-субъединицы РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), *mdh* (малатдегидрогеназы), *pgi* (фосфоглюкозаизомеразы), *phoE* (фосфорина E), *infB* (фактора инициации трансляции 2), *tonB* (периплазматического энергетического трансдучера) с использованием базы данных Pubmlst ([https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=sequenceQuery)) (дата обращения: 28 января 2024 г.).

Анализ нуклеотидных последовательностей ДНК полного генома *K. pneumoniae* проводили с использованием сайта Центра геномной эпидемиологии (<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). Для поиска генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности использовали онлайн сервисы: VirulenceFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/VirulenceFinder>); ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>). Типирование капсульных локусов (K-локусы) осуществляли с помощью сайта Kaptive (<https://kaptive-web.erc.monash.edu/>) [8].

**Рисунок 1. Схематическая круговая карта хромосомы *K. pneumoniae*. Характерные гены, включая гены устойчивости CARD, мобильные гены и сайты CDS отмечены различимыми цветами**

**Figure 1. Schematic circular map of chromosomes. Characteristic genes, including resistance genes, mobile genes and CDS sites marked with distinguishable colors**



**Таблица 1. Чувствительность штамма *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам**  
**Table 1. *K. pneumoniae* sensitivity to antimicrobial drugs**

Антибиотик Antibiotic	МПК, мг/л MIC, mg/l	Интер. Interpr.
Ампициллин Ampicillin	≥32	R
Амоксициллина клавуланат Amoxicillin clavulanate	≥ 32	R
Цефотаксим Cefotaxime	≥64	R
Цефтазидим Ceftazidime	32	R
Цефепим Cefepime	≥32	R
Эртапенем Ertapenem	≤0,12	S
Меропенем Meropenem	≤0,25	S
Амикацин Amikacin	4	S
Гентамицин Gentamicin	≥16	R
Ципрофлоксацин Ciprofloxacin	1	R
Фосфомицин Fosfomycin	≤ 16	S
Триметоприм Trimethoprim	≥320	R
Колистин Colistin	≤ 0,5	S

### Результаты

Выделенная нуклеотидная последовательность была длиной 5 414 099 п.н., доля азотистых оснований GC составила 57,3%. В ходе мультилокусного сиквенс-типирования установлено, что выделенный штамм относится к сиквенс-типу ST3559. Капсульный тип идентифицирован как KL64.

Круговая карта нуклеотидной последовательности построена с помощью компьютерной программы Proksee [9] и представлена на рисунке 1.

Фенотипическая характеристика антибиотикорезистентности представлена в таблице 1.

Как видно из представленных данных, изучаемый штамм был чувствителен к 5 из 12 тестируемых антибактериальных препаратов.

Перечень генетических детерминант антибиотикорезистентности представлен в таблице 2.

С помощью ResFinder выявлено 4 гена, кодирующих синтез ферментов, гидролизующих антибактериальные препараты из группы бета-лактамов, 2 гена, обеспечивающих устойчивость к хинолонам/фторхинолонам, по 1 гену резистентности к триметоприму, хлорамфениколу, фосфомицину и антибиотиков группы аминогликозидов.

Перечень генов факторов вирулентности представлен в таблице 3.

Большинство генов факторов вирулентности, выявленных в изучаемом штамме, обеспечивает распознавание и поглощение ионов железа, необходимых для конкурентоспособного функционирования бактериальной клетки.

В ходе проведенного анализа данных, полученных после полногеномного секвенирования, установлено, что *K. pneumoniae* обладает геном эффлюксных насосов *acrA* и его регуляторами *acrR*, *marA*, *marR*, *soxS*, *soxR*, *ramA*, *rob*, *sdiA*, *fis*, *oqxA*, *oqxR*, *papA*. Также штамм обладает 4 профаговыми частицами и 1 системой CRISPCas IE (см. рис. 1).

### Обсуждение

После проведения эффективного лечения, назначенной антибиотикотерапии меропенемом отмечена положительная динамика состояния ребенка. При достижении постконцептуального возраста 40–41 неделя ребенок был переведен в отделение патологии новорожденных по месту жительства матери.

Сиквенс-тип ST3559, к которому относится изучаемый штамм, упоминается в работе К. Kopotsa, et al. (2020), в которой дана характеристика штаммов, выделенных в странах Африки, и описан новый субвариант ST3559, имеющий ген *bla*<sub>oxa-48\*</sub>

**Таблица 2. Генетические детерминанты антибиотикорезистентности**  
**Table 2. Genetic determinants of antibiotic resistance**

Ген Gene	Идентичность, % Identity, %	Длина гена, п.н. Alignment length, bp	Фенотип Phenotype	Референс Reference
aac (6')-Ib-cr	100%	600	Аминогликозиды Aminoglycosides	DQ303918
bla <sub>CTX-M-15</sub>	100%	876	Бета-лактамы Beta-lactams	AY044436
bla <sub>SHV-11</sub>	99,6%	861	Бета-лактамы Beta-lactams	KR347170
bla <sub>TEM-1B</sub>	100%	861	Бета-лактамы Beta-lactams	AY458016
fosA6	98,8%	413	Фосфомицин Fosfomycin	KU254579
oqxV	98,8%	3153	Хинолоны/фторхинолоны Quinolones/fluoroquinolones	EU370913
oqxA	99,5%	1176	Хинолоны/фторхинолоны Quinolones/fluoroquinolones	EU370913
bla <sub>OXA-1</sub>	100%	831	Бета-лактамы Beta-lactams	HQ170510
catB3	100%	442	Хлорамфеникол Chloramphenicol	AJ009818
dfra1	100%	474	Триметоприм Trimethoprim	X00926

**Таблица 3. Перечень генов факторов вирулентности штамма *K. pneumoniae*, выделенных из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного**  
**Table 3. List of genes for virulence factors of the *K. pneumoniae* strain isolated from a positive blood culture of a premature newborn**

Ген Gene	Значение кодируемого фактора патогенности The meaning of the encoded pathogenicity factor	Литература Literature
fyuA	Рецептор иерсинибактина yersinibactin receptor	[30]
irp1	Иерсинибактин yersinibactin	[17]
irp2	Иерсинибактин Yersinibactin	[17]
kfuA	Поглощение железа Iron absorption	[19]
kfuB	Поглощение железа Iron absorption	[19]
mrk A, B, C, D, F, H, I, J	Оперон, обеспечивающий синтез фимбрий Operon providing fimbriae synthesis	[20]
ybt A, E, P, Q, S, T, U, X	Регулятор транскрипции иерсинибактина Transcriptional regulator of yersiniabactin	[18]

[10]. В исследованном нами изоляте ген *bla*<sub>OXA-48</sub> не обнаружен. Указанный сиквенс-тип был зарегистрирован в Танзании [11], выделен из воды, используемой для орошения сельскохозяйственных культур в других странах Африки и определен как этиологический агент вспышечной заболеваемости в отделении по уходу за новорожденными [12].

Среди генов, обеспечивающих резистентность к бета-лактамам антибиотикам в штамме, выделенном из гемокультуры от недоношенного

ребенка, обнаружены *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *bla*<sub>CTX-15</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>. Доминирующим геном антибиотикорезистентности в штаммах БЛРС-продуцирующих бактерий, выделенных у пациентов перинатального центра, является *bla*<sub>CTX-15</sub> [13], который имеет глобальное распространение в популяции штаммов энтеробактерий [14]. Оксациллиназа OXA-1, как и OXA-2 и OXA-101, входит в группу I, принадлежащую к приобретенным бета-лактамазам класса D с узким спектром действия, и регистрируется

в 51,5% штаммов *K. pneumoniae*, распространенных в всех странах мира [15].

Устойчивость к аминогликозидам представителей порядка *Enterobacterales* в большинстве случаев обусловлена способностью продуцировать аминогликозид-модифицирующие ферменты (AMEs) и/или присутствием 16S рибосомальных РНК-метилтрансфераз (16S-RMTases) [16]. В изучаемом изоляте был обнаружен ген фторхинолон-ацетилирующей аминогликозид 6'-N-ацетилтрансферазы *AAC(6')-Ib-cr*, обусловивший устойчивость к гентамицину и повышенную МПК к амикацину на уровне 4 мг/л при сохранившейся чувствительности [11]. Обращает на себя внимание присутствие гена *fosA6* устойчивости к фосфомицину при сохранившейся фенотипической чувствительности к этому антибиотику. Молекулярно-генетические исследования дополняют классические бактериологические методы и объясняют возможную клиническую неэффективность использования некоторых антибактериальных препаратов. В целом генетический профиль антибиотикорезистентности соответствует фенотипической резистентности по всем группам антибактериальных препаратов за исключением фосфомицина.

При определении генетических детерминант вирулентности установлено, что гены, кодирующие иерсиниабактин, *irp1*, *irp2* обнаружены в большинстве выделенных в Китае клинических штаммов, принадлежащих ST11 *K. pneumoniae*. Следует отметить, что указанные гены не были обнаружены у штамма *K. pneumoniae* ST258, что является основным отличием обозначенных сиквенс-типов [17]. Ген *ybt*, регулятор транскрипции иерсиниабактина, был также детектирован в 40% геномов *K. pneumoniae*, связанных с инвазивными инфекциями. Иерсиниабактин, в отличие от другого сидерофора энтеробактина, ингибирует воспалительную реакцию макроорганизма, усиливая при этом рост бактерий и их распространение по организму. Иерсиниабактин на сегодняшний день является наиболее распространенным маркером вирулентности *K. pneumoniae*, присутствующим в трети клинических изолятов, выделенных при бактериемии [18], и может быть рассмотрен как индикаторный маркер, свидетельствующий о высоком риске генерализации инфекционного процесса после колонизации кишечного биотопа недоношенного новорожденного ребенка, находящегося на стационарном этапе выхаживания.

Ген *kfi*, обеспечивающий усиленное связывание, поглощение и последующее вовлечение в обменные процессы бактериальной клетки ионов железа (Fe<sup>3+</sup>), обнаружен в 4,5% БЛРС продуцирующих штаммов *K. pneumoniae* в Иране, при этом в публикации указано, что нет значительной корреляционной связи между наличием генов факторов вирулентности и продукцией БЛРС [19], что может свидетельствовать о низкой распространенности плазмид, с одновременным присутствием генов

факторов вирулентности и антибиотикорезистентности в исследуемой популяции.

С экспрессией гена *mrk* связано образование биопленок [20]. Оперон *mrkA,B,C,D,F* кодирует различные компоненты фимбрий 3 типа. Установлено, что *mrkH* контролирует экспрессию промотора *mrkA* [21]. У изучаемого штамма отмечена биопленкообразующая способность (ОП=0,2), несмотря на отсутствие гена *fimH*, детектированного в штаммах, выделенных нами ранее [22], что, скорее всего, связано с экспрессией гена *mrk*. Обращает на себя внимание, что в данном варианте не обнаружен ген *uge*, детектируемый нами в более чем 50% штаммов *K. pneumoniae*, обнаруженных у пациентов педиатрических отделений перинатального центра [23].

Сочетание факторов вирулентности бактериального штамма *K. pneumoniae* и морфофункциональной незрелости органов и систем недоношенного новорожденного ребенка привели к развитию генерализованного инфекционного процесса при транслокации через стенку кишки после девятидневной колонизации кишечного биотопа. Описанный факт подтверждает необходимость проведения локального микробиологического мониторинга в отделениях стационарного выхаживания недоношенных детей для определения спектра потенциальных возбудителей инфекционных процессов и определения их генетического профиля факторов вирулентности и антибиотикорезистентности.

Изучаемый штамм *K. pneumoniae* устойчив к более чем трем группам антибактериальных препаратов. Ранее было установлено, что в формировании множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), прежде всего у штаммов *K. pneumoniae*, большую роль играют эффлюксные насосы [24]. Поэтому актуально было определить наличие в изучаемом изоляте наличие генов эффлюксных насосов и их регуляторов. Периплазматический эффлюксный насос, кодируемый геном *acrA*, описан в статье Abid Fazaa S. Almiyah, et al. (2023) как один из наиболее часто встречающихся в штаммах *K. pneumoniae* [25]. Мутации в гене *acrR* приводят к сверхэкспрессии генов эффлюксных насосов *AcrA,B* и *OqxA,B* и формированию устойчивости к тигециклину [26] и ципрофлоксацину [27]. Гены *ramA*, *marA*, *soxS*, *rob*, *fis* являются регулятором эффлюксных насосов *AcrAB* и *OqxAB* [28,29], и определение их роли в формировании устойчивости к антибактериальным препаратам требует дальнейшего изучения.

### Заключение

Полногеномное секвенирование штамма *K. pneumoniae*, выделенного из положительной гемокультуры недоношенного новорожденного ребенка, позволяет подробно охарактеризовать возбудителя генерализованной инфекции, детектировать широкий

спектр генетических детерминант факторов вирулентности и антибиотикорезистентности. БЛРС-продуцирующий штамм *K. pneumoniae* как этиологический агент неонатального сепсиса характеризуется наличием генов вирулентности, множественной лекарственной устойчивостью как за счет генов, кодирующих ферменты, гидролизующие антибиотики, так и за счет наличия эффлюксных насосов и их

регуляторов. Использование результатов традиционных культуральных методов исследования, совместно с данными высокопроизводительного секвенирования, является перспективным направлением научных исследований, имеет резерв практического применения в области клинической медицины, генетики микроорганизмов, молекулярной эпидемиологии на локальном и глобальном уровнях.

## Литература

1. Воропаева Н. М., Немченко У. М., Григорова Е. В. и др. Этиологическая структура инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и антибиотикорезистентность основных возбудителей инфекций. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023;22(1):68–73.
2. Сергеев В. И., Рожкова М. В., Овчинников К. В. и др. Этиологическая структура внебольничных пневмоний в период эпидемии COVID-19. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2024;23(1):51–56.
3. Сергеев В. И., Кудрявцева Л. Г., Пезушина О. Г. и др. Групповая заболеваемость гнойно-септическими инфекциями клебсиеллезной этиологии пациентов кардиохирургического стационара. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020;19(1):90–98.
4. Садеева З. З., Новикова И. Е., Лазарева А. В. и др. Бактериемии и инфекции ЦНС у детей, ассоциированные с *Klebsiella pneumoniae*: молекулярно-генетическая характеристика и клинические особенности. *Инфекция и иммунитет*. - 2023. - Т. 13. - №6. - С. 1117–1128.
5. Cheng S, Fleres G, Chen L, et al. Within-Host Genotypic and Phenotypic Diversity of Contemporaneous Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from Blood Cultures of Patients with Bacteremia. *mBio*. 2022 Dec 20;13(6):e0290622.
6. Leggett R.M., Ramirez-Gonzalez R.H., Clavijo B.J., et al. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Front Genet*. 2013 Dec 17;4:288.
7. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 4178–4182.
8. Lam M.M.C., Wick R.R., Judd L.M., et al. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex. *Microb. Genom.* 2022;8(3):000800.
9. Grant J.R., Enns E., Marinier E., et al. Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 2023, gkad326.
10. Kopotska K., Mbelle N.M., Osei Sekyere J. Epigenomics, genomics, resistome, mobilome, virulome and evolutionary phylogenomics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Microb Genom*. 2020 Dec;6(12):mgen000474.
11. Kibwana U.O., Manyahi J., Sandnes H.H., et al. Fluoroquinolone resistance among fecal extended spectrum beta lactamases positive Enterobacterales isolates from children in Dar es Salaam, Tanzania. *BMC Infect Dis*. 2023 Mar 7;23(1):135.
12. Richter L., du Plessis E.M., Duvenage S., et al. Whole Genome Sequencing of Extended-Spectrum- and AmpC-β-Lactamase-Positive Enterobacterales Isolated From Spinach Production in Gauteng Province, South Africa. *Front Microbiol*. 2021 Oct 1;12:734649.
13. Устюжанин А. В., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И. и др. Филогенетический анализ гена *ige* *Klebsiella pneumoniae* в локальном микробиологическом мониторинге. *Инфекция и иммунитет*. - 2023. - Т. 13. - №4. - С. 735–742.
14. Макарова М. А., Крузлов Е. Е., Кафтырева Л. А. Биологическая характеристика энтероагрегативного штамма *Escherichia coli* ont:h30 18-726 (№ 8-8857), выделенного от пациента с язвенным колитом, и новый способ ПЦП-идентификации. *Инфекция и иммунитет*. - 2023. - Т. 13. - №5. - С. 899–908.
15. Meng L, Liu Z, Liu C, et al. The distribution characteristics of global blaOXA-carrying *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infect Dis*. 2023 Mar 29;23(1):182.
16. Foudraine D.E., Strepis N., Stingl C., et al. Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in *E. coli* and *K. pneumoniae* using proteogenomics. *Sci Rep*. 2021 Jun 14;11(1):12472.
17. Dong N, Zhang R, Liu L, et al. Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China. *Microb Genom*. 2018 Feb;4(2):e000149.
18. Lam M.M.C., Wick R.R., Wyres K.L., et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom*. 2018 Sep;4(9):e000196.
19. Goudarzi G., Shakib P., Karami S., et al. The Prevalence of Virulence Factors among ESBLs-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Khorramabad Hospitals, Iran. *Clin Lab*. 2023 Oct 1;69(10).
20. Gual-de-Torrella A., Delgado-Valverde M., Pérez-Palacios P, et al. Prevalence of the fimbrial operon mrkABCD, mrkA expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging or not belonging to high-risk clones. *Int J Antimicrob Agents*. 2022 Oct;60(4):106663.
21. Yang J, Wilksch J.J., Tan J.W., et al. Transcriptional activation of the mrkA promoter of the *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS One*. 2013 Nov 14;8(11).
22. Устюжанин А. В., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *ige* и *fim*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. - 2020. - Т. 97. - №6. - С. 556–563.
23. Устюжанин А. В., Чистякова Г. Н., Ремизова И. И. и др. Генетические детерминанты антибиотикорезистентности энтеробактерий, выделенных в ходе микробиологического мониторинга в перинатальном центре. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2023;22(4):49–55.
24. Albarri O., AlMatar M., Var I., et al. Antimicrobial Resistance of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates: Involvement of AcrAB and OqxAB Efflux Pumps. *Curr Mol Pharmacol*. 2024;17(1).
25. Abid Faza Almiyah S. Detection of AcrA and AcrB Efflux Pumps in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* that Isolated from Wounds Infection Patients in Al-Diwaniyah Province. *Arch Razi Inst*. 2023 Feb 28;78(1):269–276.
26. Sun L., Sun L., Li X., et al. A Novel Tigecycline Adjuvant ML-7 Reverses the Susceptibility of Tigecycline-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jan 5;11:809542.
27. Albarri O., AlMatar M., Öcal M.M., et al. Overexpression of Efflux Pumps AcrAB and OqxAB Contributes to Ciprofloxacin Resistance in Clinical Isolates of *K. pneumoniae*. *Curr Protein Pept Sci*. 2022;23(5):356–368.
28. Xu Q, Sheng Z, Hao M, et al. RamA upregulates multidrug resistance efflux pumps AcrAB and OqxAB in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2021 Feb;57(2).
29. Veleba M., Higgins P.G., Gonzalez G., et al. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Aug;56(8):4450–8.
30. Kumar A., Harjai K., Chhibber S., et al. Early cytokine response to lethal challenge of *Klebsiella pneumoniae* averted the prognosis of pneumonia in FyuA immunized mice. *Microb Pathog*. 2020 Jul;144:104161.

## References

1. Voropaeva NM, Nemchenko UM, Grigorova EV, et al. Structure and Antibiotic Resistance of the Main Causative agents of Infections Associated with the Provision of Medical care. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2023;22(1):68–73. (In Russ.) <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2023-22-1-68-73>
2. Sergeev V.I., Rozhkova M.V., Ovchinnikov K.V., et al. Etiological structure of community-acquired pneumonia in the period of COVID-19 epidemic. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2024;23(1):51–56. (In Russ.) doi:10.31631/2073-3046-2024-23-1-51-56
3. Sergeev V.I., Kudryavtseva L.G., Pegyshina O.G., et al. Group Incidence by Purulent-Septic Infections of Klebsiellous Etiology in Cardiosurgical Patients. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(1):90–98. (In Russ.) doi: 10.31631/2073-3046-2020-19-1-90-98
4. Sadeeva Z.Z., Novikova I.E., Lazareva A.V., et al. Pediatric bacteremia and CNS infections associated with *Klebsiella pneumoniae*: molecular genetic characteristics and clinical features. *Russian Journal of Infection and Immunity*. - 2023. - Vol. 13. - No. 6. - P. 1117–1128. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-PBA-14482
5. Cheng S, Fleres G, Chen L, et al. Within-Host Genotypic and Phenotypic Diversity of Contemporaneous Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from Blood Cultures of Patients with Bacteremia. *mBio*. 2022 Dec 20;13(6):e0290622. doi: 10.1128/mbio.02906-22
6. Leggett R.M., Ramirez-Gonzalez R.H., Clavijo B.J., et al. Sequencing quality assessment tools to enable data-driven informatics for high throughput genomics. *Front Genet*. 2013 Dec 17;4:288. doi: 10.3389/fgene.2013.00288
7. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 4178–4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005

8. Lam MMC, Wick RR, Judd LM, et al. *Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the Klebsiella pneumoniae species complex*. *Microb. Genom.* 2022;8(3):000800. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000800>
9. Grant JR, Enns E, Marinier E, et al. *Proksee: in-depth characterization and visualization of bacterial genomes* *Nucleic Acids Research*, 2023, *gkad326*, doi: 10.1093/nar/gkad326
10. Kopotsa K, Mbelle NM, Osei Sekyere J. *Epigenomics, genomics, resistome, mobilome, virulome and evolutionary phylogenomics of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae clinical strains*. *Microb Genom.* 2020 Dec;6(12):mgen000474. doi: 10.1099/mgen.0.000474
11. Kibwana UO, Manyahi J, Sandnes HH, et al. *Fluoroquinolone resistance among fecal extended spectrum beta lactamases positive Enterobacterales isolates from children in Dar es Salaam, Tanzania*. *BMC Infect Dis.* 2023 Mar 7;23(1):135. doi: 10.1186/s12879-023-08086-2
12. Richter L, du Plessis EM, Duvenage S, et al. *Whole Genome Sequencing of Extended-Spectrum- and AmpC-  $\beta$ -Lactamase-Positive Enterobacterales Isolated From Spinach Production in Gauteng Province, South Africa*. *Front Microbiol.* 2021 Oct 1;12:734649. doi: 10.3389/fmicb.2021.734649
13. Ustyuzhanin AV, Chistyakova GN, Remizova II, et al. *Phylogenetic analysis of the Klebsiella pneumoniae uge gene in local microbiological monitoring*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. - 2023. - Vol. 13. - N. 4. - P. 735–742. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-PAO-12421
14. Makarova MA, Kruglov EE, Kaftyreva LA, *Biological characteristics of the enteroaggregative Escherichia coli ont:h30 18-726 (no. B-8857) strain isolated from a patient with ulcerative colitis and a new method of PCR identification*. *Russian Journal of Infection and Immunity*. - 2023. - Vol. 13. - N. 5. - P. 899–908. (In Russ.) doi: 10.15789/2220-7619-BCO-1858
15. Meng L, Liu Z, Liu C, et al. *The distribution characteristics of global blaOXA-carrying Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infect Dis.* 2023 Mar 29;23(1):182. doi: 10.1186/s12879-023-08156-5
16. Foudraine DE, Strepis N, Stingl C, et al. *Exploring antimicrobial resistance to beta-lactams, aminoglycosides and fluoroquinolones in E. coli and K. pneumoniae using proteogenomics*. *Sci Rep.* 2021 Jun 14;11(1):12472. doi: 10.1038/s41598-021-91905-w
17. Dong N, Zhang R, Liu L, et al. *Genome analysis of clinical multilocus sequence Type 11 Klebsiella pneumoniae from China*. *Microb Genom.* 2018 Feb;4(2):e000149. doi: 10.1099/mgen.0.000149
18. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, et al. *Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in Klebsiella pneumoniae populations*. *Microb Genom.* 2018 Sep;4(9):e000196. doi: 10.1099/mgen.0.000196
19. Goudarzi G, Shakib P, Karami S, et al. *The Prevalence of Virulence Factors among ESBLs-Producing Klebsiella pneumoniae Isolated from Khorramabad Hospitals, Iran*. *Clin Lab.* 2023 Oct 1;69(10). doi: 10.7754/Clin.Lab.2023.230322
20. Gual-de-Torrella A, Delgado-Valverde M, Pérez-Palacios P, et al. *Prevalence of the fimbrial operon mrkABCD, mrkA expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae isolates belonging or not belonging to high-risk clones*. *Int J Antimicrob Agents.* 2022 Oct;60(4):106663. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2022.106663
21. Yang J, Wilksch JJ, Tan JW, et al. *Transcriptional activation of the mrkA promoter of the Klebsiella pneumoniae type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein*. *PLoS One.* 2013 Nov 14;8(11):e79038. doi: 10.1371/journal.pone.0079038
22. Ustyuzhanin AV, Chistyakova GN, Remizova II. *The relatedness of Klebsiella pneumoniae strains based on phylogenetic analysis of uge and fim genes*. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. - 2020. - Vol. 97. - N. 6. - P. 556–563. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-6
23. Ustyuzhanin AV, Chistyakova GN, Remizova II, Makhanyok AA. *Genetic determinants of antibiotic resistance in enterobacteria isolated during microbiological monitoring in the perinatal center*. *Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2023;22(4):49–55. (In Russ.) doi:10.31631/2073-3046-2023-22-4-49-55
24. Albarri O, AIMatar M, Var I, et al. *Antimicrobial Resistance of Clinical Klebsiella pneumoniae Isolates: Involvement of AcrAB and OqxAB Efflux Pumps*. *Curr Mol Pharmacol.* 2024;17(1) doi: 10.2174/1874467217666230331081434
25. Abid Faza'a AlMiyah S. *Detection of AcrA and AcrB Efflux Pumps in Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae that Isolated from Wounds Infection Patients in Al-Diwaniyah Province*. *Arch Razi Inst.* 2023 Feb 28;78(1):269–276. doi: 10.22092/ARI.2022.358956.2342
26. Sun L, Sun L, Li X, et al. *A Novel Tigecycline Adjuvant ML-7 Reverses the Susceptibility of Tigecycline-Resistant Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 5;11:809542. doi: 10.3389/fcimb.2021.809542
27. Albarri O, AIMatar M, Ócal MM, et al. *Overexpression of Efflux Pumps AcrAB and OqxAB Contributes to Ciprofloxacin Resistance in Clinical Isolates of K. pneumoniae*. *Curr Protein Pept Sci.* 2022;23(5):356–368. doi: 10.2174/1389203723666220630162920
28. Xu Q, Sheng Z, Hao M, et al. *RamA upregulates multidrug resistance efflux pumps AcrAB and OqxAB in Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2021 Feb;57(2):106251. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2020.106251
29. Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, et al. *Characterization of Rara, a novel AraC family multidrug resistance regulator in Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Aug;56(8):4450–8. doi: 10.1128/AAC.00456-12
30. Kumar A, Harjai K, Chhibber S. *Early cytokine response to lethal challenge of Klebsiella pneumoniae averted the prognosis of pneumonia in FyuA immunized mice*. *Microb Pathog.* 2020 Jul;144:104161. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104161

## Об авторах

- **Александр Владимирович Устюжанин** – к. м. н., старший научный сотрудник научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (908) 924-94-19, ust103@yandex.ru. ORCID 0000-0001-8521-7652.
- **Анна Алексеевна Маханек** – младший научный сотрудник ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (343) 371-28-30, makhanechek@bk.ru. ORCID 0000-0002-2834-6754.
- **Гузель Нуховна Чистякова** – д. м. н., профессор, руководитель научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (343) 371-42-60, chistyakovagn@niiomm.ru. ORCID 0000-0002-0852-6766.
- **Ирина Ивановна Ремизова** – к. б. н., старший научный сотрудник научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (343) 371-28-30, Remizovall@yandex.ru. ORCID 0000-0002-4238-4642.
- **Светлана Владимировна Бычкова** – к. м. н., руководитель научного отделения ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (343) 371-28-30, simomm@mail.ru. ORCID 0000-0002-8892-7585.
- **Диана Арсеновна Абакарова** – младший научный сотрудник отделения реанимации и интенсивной терапии новорожденных ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества» Минздрава России, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1. +7 (343) 371-28-30, dianka.abakarova@yandex.ru. ORCID 0000-0002-2900-4422.

Поступила: 05.03.2024. Принята к печати: 25.04.2024.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

## About the Authors

- **Alexander V. Ustyuzhanin** – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (908) 924-94-19, ust103@yandex.ru. ORCID 0000-0001-8521-7652.
- **Anna A. Makhanyok** – junior researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (343) 371-28-30, makhanechek@bk.ru. ORCID 0000-0002-2834-6754.
- **Guzel N. Chistyakova** – Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (343) 371-42-60, chistyakovagn@niiomm.ru. ORCID 0000-0002-0852-6766.
- **Irina Iv. Remizova** – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (343) 371-28-30, Remizovall@yandex.ru. ORCID 0000-0002-4238-4642.
- **Svetlana V. Bychkova** – Cand. Sci. (Med.), Head of the Department, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (343) 371-28-30, simomm@mail.ru. ORCID 0000-0002-8892-7585.
- **Diana A. Abakarova** – junior researcher, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care. +7 (343) 371-28-30, dianka.abakarova@yandex.ru. ORCID 0000-0002-2900-4422.

Received: 05.03.2024. Accepted: 25.04.2024.

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.