

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И БАКТЕРИОФАГАМ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* С КЛАССИЧЕСКИМ И ГИПЕРМУКОИДНЫМ ФЕНОТИПАМИ

УО «Гомельский государственный медицинский университет»

Изучена чувствительность к антибиотикам и препаратам для фаготерапии 136 клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в 2012–2015 гг. от госпитализированных пациентов. Выявлено 14 изолятов с гипермукоидным фенотипом (hvKP) и 122 изолята с классическим фенотипом (сKP). Показана большая антибиотико- и фагочувствительность гипермукоидных изолятов по сравнению с классическими. Продуценты карбапенемаз (OXA-48, NDM) обнаруживались только среди изолятов с классическим фенотипом.

Ключевые слова: клебсиеллы, капсула, гипермукоидный фенотип, гипервирулентность, антибиотики, бактериофаги.

A. I. Kozlova, D. V. Tapalski

SENSITIVITY OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL ISOLATES WITH CLASSICAL AND HYPERMUCOID PHENOTYPES TO ANTIBIOTICS AND BACTERIOPHAGES

The sensitivity of 136 *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates collected in 2012–2015 years from hospitalized patients to antibiotics and phage therapy preparations was studied. 14 isolates with a hypermucoid phenotype (hvKP) and 122 isolates with a classical phenotype (сKP) were identified. A larger antibiotic and phage sensitivity of hypermucoid isolates in comparison with the classical ones is shown. Carbapenemase producers (OXA-48, NDM) were found only among isolates with a classical phenotype.

Key words: *Klebsiella*, capsule, hypermucoid phenotype, hypervirulence, antibiotics, bacteriophages.

Клебсиеллы широко распространены в окружающей среде, а также входят в состав микробиома человека, колонизируя носоглотку и кишечник. *Klebsiella pneumoniae* представляет собой факультативно-анаэробную грамотрицательную палочку из семейства *Enterobacteriaceae*, которая характеризуется способностью образовывать слизистые (мукоидные)

колонии на обогащенных углеводами средах благодаря наличию полисахаридной капсулы у большинства штаммов. В ряде случаев у культур *K. pneumoniae* отмечается так называемая «гипермукоидность» (hypermucoviscosity), т.е. избыточная продукция капсульного материала, придающая колониям ярко выраженную «слизистость». Многочисленными исследованиями под-

тверждено, что именно гипермукоидные культуры *K. pneumoniae* в большей степени обладают потенциалом вирулентности [7, 8].

В настоящее время известны две эволюционные ветви *K. pneumoniae*: классические (classical *K. pneumoniae* – сКР) и их филогенетически более поздние гипервирулентные варианты (hypervirulent *K. pneumoniae* – hvКР) [8]. Классические штаммы *K. pneumoniae* выделяются главным образом из клинических образцов у госпитализированных иммунокомпрометированных пациентов и являются ведущими возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, различной нозологии: инфекций мочевыводящих путей, респираторного тракта, кровотока, ЦНС и других систем органов. Штаммы гипервирулентных *K. pneumoniae* являются основными возбудителями пиогенного абсцесса печени, пневмонии, менингита и эндофталмита у иммунокомпетентных лиц и в настоящее время играют значимую роль в этиологии внебольничных инфекций.

Как правило, сКР обладают классическим (мукоидным) фенотипом с типичными мукоидными колониями, тогда как гипермукоидный фенотип в большей степени присущ hvКР [7], так что данный признак может рассматриваться как первичный ориентировочный фенотипический маркер гипервирулентного штамма. Гипермукоидный фенотип идентифицируют визуально с помощью string-теста или молекулярно-генетическими методами путем детекции в геноме изолята определенных генов вирулентности [9].

Большинство выделяемых от пациентов клинических изолятов сКР являются продуцентами β-лактамаз расширенного спектра и/или карбапенемаз в комбинации с резистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам. На сегодняшний день известно, что в Беларуси экстремальная антибиотикорезистентность *K. pneumoniae* как правило ассоциирована с продукцией карбапенемаз NDM и OXA-48 [5]. Относительно недавно были выделены панрезистентные колистин-нечувствительные изоляты *K. pneumoniae*. HvКР остаются в большей степени чувствительными к антибиотикам, однако в последнее время все чаще появляются сообщения о появлении «клонов двойного риска», обладающих как гипервирулентным потенциалом, так и множественной или экстремальной антибиотикорезистентностью [6].

Сдерживающим фактором распространения классических и гипервирулентных *K. pneumoniae* могут являться клебсиеллезные бактериофаги, продуцирующие специфические ферменты – деполимеразы, разрушающие капсульные полисахариды. В исследованиях различных авторов отмечен варибельный уровень фагочувствительности культур *K. pneumoniae*. Так, показано, что коммерческие препараты бактериофагов обладали недостаточной активностью в отношении клинических изолятов *K. pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности [4]. В других исследованиях установлено, что выделенные из объектов окружающей среды и клинического материала литические бактериофаги эффективно лизировали большинство включенных в исследование гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* [2, 3].

Цель исследования – оценить чувствительность клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с гипермукоидным и классическим фенотипами к антибиотикам и коммерческим препаратам бактериофагов.

Материалы и методы

В исследование включены 136 клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в 2012–2015 гг. от госпитализированных пациентов в лечебных учреждениях из трех регионов Беларуси (Гомель, Минск, Могилев). Все изоляты были выделены из различных видов клинического материала – крови, мочи, мокроты, крови, раневого отделяемого. Идентификация микроорганизмов осуществлялась на микробиологических анализаторах VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция) и VITEK MS (bioMérieux, Франция).

Гипермукоидный фенотип штаммов определяли при постановке string-теста [8] с использованием суточной культуры возбудителя, выращенной на коммерческом кровяном агаре с 5% бараньих эритроцитов. Тест считали положительным, если за бактериологической петлей тянулся слизистый тяж высотой более 5 мм от поверхности питательной среды.

Чувствительность к семи антибиотикам (амоксциллину-клавуланату, азтреонаму, цефотаксиму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, амикацину) определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона (Becton Dickinson, США). При выполнении исследования и интерпретации результатов руководствовались стандартами EUCAST v.6.0. Для

изолятов *K. pneumoniae* с выявленной устойчивостью (R) или умеренной устойчивостью (I) хотя бы к одному из карбапенемов методом real time-ПЦР осуществляли детекцию генов карбапенемаз KPC, OXA-48 (диагностический набор «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) и металло-β-лактамаз групп VIM, IMP, NDM (диагностический набор «АмплиСенс MDR MBL-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация). Экстракцию ДНК бактериальных культур, амплификацию с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия), анализ и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с инструкциями производителя диагностических наборов.

В исследование включены препараты для фаготерапии производства НПО «Микроген» (Российская Федерация) с заявленной активностью против клебсиелл: «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» (флаконы по 20 мл, серия У15 01/2014, г. Уфа) и «Секстафаг» (флаконы по 20 мл, серия 688 02/04/2014, г. Пермь).

Определение чувствительности изолята к коммерческим препаратам бактериофагов проводили капельным методом (spot-test) [1]. Для приготовления инокулюма использовали чистые суточные бактериальные культуры. По стандартной методике готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду (контроль с помощью денситометра) и хлопковым тампоном проводили инокуляцию на поверхность среды в трех направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Далее чашки подсушивали 30–60 мин при комнатной температуре, накрыв их стериль-

ными бумажными фильтрами. На подсушенную поверхность пипеткой наносили препараты бактериофагов в объеме 20 мкл. Чашки повторно подсушивали 15–30 мин, закрывали, переворачивали и инкубировали 18–20 ч при температуре 37 °С. Учет степени лизиса выполняли по четырехкестной системе. Результаты от 3+ до 4+ учитывали как положительные реакции. Исследование проводили в трех повторах.

Статистическая обработка данных выполнялась непараметрическими методами (χ-квadrat). Различия считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди 136 клинических изолятов *K. pneumoniae* на основании string-теста выявлено 14 (10,3%) изолятов с гипермукоидным фенотипом, а также 122 (89,7%) изолята с классическим (мукоидным) фенотипом. Все включенные в исследование изоляты *K. pneumoniae* были устойчивы как минимум к одному антибиотику, при этом наибольшей активностью обладали карбапенемы (64,0% изолятов, чувствительных к имипенему, и 55,2% изолятов, чувствительных к меропенему). Чувствительность к амикацину сохраняли 51,5% изолятов. Уровни чувствительности к другим антибактериальным препаратам были значительно ниже и не превышали 15%. Обнаружено 38 (27,9%) экстремально-антибиотикорезистентных изолята *K. pneumoniae*, нечувствительных ко всем тестируемым антибиотикам, 36 из которых обладали классическим и только 2 – гипермукоидным фенотипом. Результаты определения чувствительности к антибиотикам, препаратам бактериофагов, а также детекции генов карбапенемаз представлены в таблице 1.

Таблица 1. Чувствительность к антибиотикам, препаратам бактериофагов и продукция карбапенемаз среди клинических изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным и классическим фенотипами

Признак	Гипермукоидный фенотип (n = 14)		Классический фенотип (n = 122)		χ ²	p
	n	%	n	%		
Чувствительность к антибиотикам						
– амоксициллин-клавуланат	8	57,1%	14	11,5%	24,25	<0,001
– азтреонам	6	42,9%	11	9,0%	13,15	<0,001
– цефотаксим	7	50,0%	13	10,7%	15,49	<0,001
– имипенем	12	85,7%	75	61,5%	3,20	0,074
– меропенем	12	85,7%	63	51,6%	5,89	0,016
– ципрофлоксацин	7	50,0%	13	10,7%	15,49	<0,001
– амикацин	11	78,6%	59	48,4%	4,58	0,033
2. Продукция карбапенемаз	0	0	18	14,8%	2,38	0,123
3. Фагочувствительность						
– поливалентный фаг	6	42,9%	14	11,5%	9,86	0,002
– секстафаг	4	28,6%	23	18,9%	0,75	0,388

В целом, штаммы с гипермукоидным фенотипом обладали большей чувствительностью к антибиотикам и были резистентны к $3,35 \pm 0,58$ из 7 антибиотиков, включенных в исследование, соответственно штаммы с классическим фенотипом проявляли меньшую чувствительность к антибиотикам и были в среднем устойчивы к $4,98 \pm 0,18$ антибиотикам, $p < 0,001$. Полученные результаты исследования согласуются с данными зарубежных источников литературы [6, 7], в подавляющем большинстве которых утверждается, что hvKP с гипермукоидным фенотипом обладают низкой антибиотикорезистентностью. Исключение составил имипенем, на чувствительность к которому характер фенотипа изолята *K.pneumoniae* не влиял ($\chi^2 = 3,20$, $p = 0,074$).

Для изолятов *K.pneumoniae* с выявленной устойчивостью хотя бы к одному из карбапенемов осуществляли детекцию генов карбапенемаз. Выявлено 13 продуцентов NDM и 5 продуцентов OXA-48. Все карбапенемазопродуцирующие изоляты имели фенотип СКР. Тем не менее, присутствует возможность появления конвергентных штаммов *K. pneumoniae* «двойного риска», зарождающихся в результате горизонтального переноса генов, когда в геном hvKP попадают эпидемические гены карбапенемаз или, напротив, полирезистентные штаммы приобретают гены вирулентности. Поэтому необходима повышенная настороженность лабораторных служб в отношении гипервирулентных антибиотикорезистентных клинических изолятов *K. pneumoniae*, сообщения о которых в последнее время все чаще поступают из различных регионов мира, в том числе из России. К примеру, в 2017 году в Казани описан случай менингита, вызванный гипермукоидным штаммом, продуцирующим β -лактамазу расширенного спектра [8].

В целом среди 136 исследованных штаммов обнаружен 31 (22,8%) фагочувствительный изолят *K. pneumoniae*, что отражает недостаточную активность коммерческих препаратов бактериофагов и прогнозирует низкую эффективность эмпирической фаготерапии при клебсиеллезных инфекциях. Низкий уровень активности бактериофагов может быть связан с клональным распространением антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, в результате чего действующие препараты для фаготерапии становятся неактуальными. Вместе с тем, в ряде исследований российских авторов отмечается выраженная активность бактериофагов в отношении

гипермукоидных антибиотикочувствительных штаммов *K. pneumoniae* [2, 3]. Нами выполнен сравнительный анализ чувствительности к препаратам бактериофагов для гипермукоидных и классических изолятов *K. pneumoniae*. Показано, что исследуемые культуры *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом более чувствительны к препарату «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» по сравнению с классическими изолятами ($\chi^2 = 9,86$, $p = 0,002$). На литическую активность препарата «Секстафаг» наличие гипермукоидного фенотипа у штамма существенного влияния не оказывало ($\chi^2 = 0,75$, $p = 0,388$). Ввиду небольшого количества гипермукоидных изолятов *K. pneumoniae* в исследовании нельзя достоверно утверждать, какой из препаратов бактериофагов более активен в отношении данной популяции бактерий, но, фактически, «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» характеризовался более выраженной литической активностью в отношении штаммов с гипермукоидным фенотипом (42,9% фагочувствительных изолятов) по сравнению с «Секстафагом» (28,6%). Достаточно выраженная литическая активность поливалентного бактериофага в отношении штаммов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом указывает на возможность его перспективного использования для терапии инвазивных инфекций, вызванных hvKP, с обязательным условием предварительного определения фагочувствительности выделенных изолятов.

Анализ многочисленных зарубежных и российских источников показал, что большинство исследований по фагочувствительности *K. pneumoniae* посвящены антибиотикорезистентным штаммам и критически мало информации по чувствительности гипермукоидных hvKP к бактериофагам. Несомненно, эпидемиологическая ситуация в мире требует целенаправленного поиска во внешней среде новых безопасных литических бактериофагов, активных в отношении гипермукоидных hvKP.

Таким образом, в сложившейся эпидемиологической ситуации в спектр микробиологического мониторинга должны быть включены не только экстремально-резистентные, но и гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*. Рекомендуется определение их фагочувствительности, так как препараты коммерческих бактериофагов могут служить в ряде случаев альтернативой антибиотикам, особенно в условиях неуклонно возрастающей антибиотикорезистентности.

Выводы

1. Выявлено 14 (10,3%) клинических изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом, которые характеризовались достоверно большей чувствительностью к антибиотикам по сравнению с классическими изолятами.

2. Продуценты карбапенемаз (OXA-48, NDM) обнаруживались только среди изолятов *K. pneumoniae* с классическим фенотипом.

3. Изоляты *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом были более чувствительны к препарату «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» по сравнению с классическими изолятами. На литическую активность препарата «Секстафаг» характер фенотипа существенно влияния не оказывал.

Литература

1. Асланов, Б. И., Зуева Л. П., Кафтырева Л. А. и др. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации. – Москва, 2014. – 39 с.

2. Воложанцев, Н. В., Мякинина В. П., Светоч Э. А. и др. Бактериофаги, активные против гипервирулентных (гипермукоидных) штаммов *Klebsiella pneumoniae* // Материалы III Санкт-Петербургского международного экологического форума «Окружающая среда и здоровье человека: фундаментальные, клинические и экологические аспекты современной микробиологии» – 2014. – спец. вып. – С. 94–97. – С. 73.

3. Комисарова, Е. В., Мякина В. П., Красильникова В. М., Князева А. И. и др. Выделение и характеристика бактериофагов, активных против гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* // Сборник тезисов X Молодежной школы-конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии». – 2015. – С. 94–97.

4. Тапальский, Д. В., Козлова А. И. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – № 1 (55). – С. 56–62.

5. Тапальский, Д. В., Осипов В. А., Евсеенко Е. О. и др. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси // Здоровоохранение. – 2017. – № 3. – С. 40–47.

6. Bialek-Davenet, S., Criscuolo A., Ailloud F. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups // Emerging infectious diseases. – 2014. – Vol. 20, № 11. – P. 1812–1820.

7. Catalan-Najera, J. C. Ulises Garza-Ramos, Humberto Barrios-Camacho. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? // Virulence. – 2017. – Vol. 8, № 7. – P. 1111–1123.

8. Khaertynov, Khalit S., Anokhin V. A., Davidyuk Y. N., et al. Case of meningitis in a neonate caused by an extended-spectrum-beta-lactamase-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* // Frontiers in Microbiology – 2017. – Vol. 8 – P. 1–6.

9. Shon, A. S., Bajwa R. P., Russo T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed // Virulence. – 2013. – Vol. 4, № 2. – P. 107–118.