

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA* *MICHIGANENSIS*

Е.П. Сиволодский^{1,2}, О.А. Фрейлихман²

¹ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

² ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — выявить оптимальный объект поиска изолятов *Klebsiella michiganensis*, определить их генетические и фенотипические характеристики, необходимые для идентификации. Объектом исследования были 11 штаммов *Klebsiella oxytoca*, атипичные (отрицательные) по уникальному для клебсиелл маркеру 5-аминосалицилат декарбоксилазе. Они были отобраны для генетического исследования после фенотипического изучения клинических изолятов *K. oxytoca*, выделенных в 2015–2018 гг. в лечебных учреждениях Санкт-Петербурга. В контроле использовали по два клинических штамма *K. oxytoca* и *Raoultella ornithinolytica* с типичными свойствами. Наличие 5-аминосалицилат декарбоксилазы определяли по хромогенной реакции на питательной среде «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода выявляли на плотной минимальной синтетической среде с 2 г/л субстрата при инкубации посевов в течение 72 ч при 37°C. Биохимические признаки бактерий изучали микрообъемным методом тест-системой «Рапид-Энтеро» (НИИЭМ им. Пастера, Санкт-Петербург). Для генетической характеристики штаммов использовали гены *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB*, *pehX*. Амплификацию фрагментов генов *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* проводили методом стандартной ПЦР с использованием праймеров, имеющих описанные ранее последовательности. Были амплифицированы два фрагмента гена *rpoB*, общей длиной 834 п.н., фрагмент гена *16SrRNA* длиной 387 п.н., фрагмент гена *gyrA* длиной 441 п.н. Амплифицированные фрагменты секвенировали по Сенгеру на автоматическом капиллярном секвенаторе ABI 3130 (Applied Biosystems, США) с последующим применением методов определения уровней сходства секвенированных фрагментов генов. ПЦР фрагментов гена *pehX* для определения паттерна его амплификации проводили по ранее описанной методике с использованием двух пар праймеров, фланкирующих фрагмент AD длиной 513 п.н. и CD длиной 344 п.н. При изучении 11 штаммов бактерий, идентифицированных ранее как *K. oxytoca*, атипичных (негативных) по маркеру 5-аминосалицилат декарбоксилазе, были выявлены генетическим методом 9 штаммов *K. michiganensis*, 1 штамм-мутант *K. oxytoca* и 1 штамм с высокой степенью гомологии с *Klebsiella kielensis* по нуклеотидной последовательности гена *rpoB*, что подтверждает высокую информативность этого объекта исследования. У 4 штаммов *K. oxytoca* выявлено 99–100% сходства с *K. michiganensis* по всем фрагментам секвенированных генов. Только секвенирование гена *rpoB* обнаружило сходство всех 9 выявленных штаммов с *K. michiganensis*, что позволяет рекомендовать этот подход как наиболее информативный. Наличие гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу, подтверждено методом ПЦР у большинства штаммов *K. michiganensis*, поэтому это исследование нецелесообразно для их идентификации (дифференциации с *K. oxytoca*). Наиболее информативными для фенотипической идентификации *K. michiganensis* являются тесты, по которым боль-

Адрес для переписки:

Фрейлихман Ольга Александровна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (812) 232-01-08 (служебн.).
E-mail: olga1-7@mail.ru

Contacts:

Olga A. Freylikhman
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (812) 232-01-08 (office).
E-mail: olga1-7@mail.ru

Библиографическое описание:

Сиволодский Е.П., Фрейлихман О.А. Генетическая и фенотипическая характеристика изолятов *Klebsiella michiganensis* // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 648–654. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-648-654

Citation:

Sivolodskii E.P., Freylikhman O.A. Genetic and phenotypic characteristics of *Klebsiella michiganensis* isolates // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 648–654. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-648-654

шинство штаммов имеют единый профиль: отсутствие 5-аминосалицилат декарбоксилазы, утилизации гистамина, дульцитол, трикарбаллиловой кислоты; наличие продукции индола, утилизации D-мелицитозы, путресцина.

Ключевые слова: *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella kielensis*, *Klebsiella oxytoca*, уникальный фермент клебсиелл 5-АСК декарбоксилаза, секвенирование гена *rpoB*.

GENETIC AND PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *KLEBSIELLA MICHIGANENSIS* ISOLATES

Sivolodskii E.P.^{a,b}, Freylikhman O.A.^b

^a S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, Russian Federation

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to identify an optimal research target for detection of *Klebsiella michiganensis* isolates, determine their genetic and phenotypic characteristics necessary for identification. Here, we examined 11 *Klebsiella oxytoca* strains, lacking (atypical, negative) a marker 5-aminosalicylate decarboxylase (detected by the chromogenic reaction by 5-aminosalicylic acid) unique for the genus *Klebsiella* bacteria. They were selected for genetic analysis subsequent to a phenotypic characterization of *K. oxytoca* clinical isolates, collected in within 2015–2018 period in medical institutions in St. Petersburg. Two *K. oxytoca* and two *Raoultella ornithinolytica* clinical strains displaying typical properties were used as a control. The presence of 5-aminosalicylate decarboxylase was detected by the chromogenic reaction with the “Klebsiella 5-ASK CHROME C” nutrient medium (Pasteur Institute, St. Petersburg). Substrate utilization as the sole carbon source was detected on a solid minimal synthetic medium added with 2 g/L substrate during incubation for 72 hours at 37°C. Biochemical bacteria features were studied by the microvolume method with the “Rapid-Enterо” test system (Pasteur Institute, St. Petersburg). Genetic strain characterization was performed by estimating *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* by using a routine PCR with primer sequences described before. Two *rpoB* gene fragments with a total length 834 bp, *16S rRNA* gene fragment — 387 bp, and *gyrA* gene fragment — 441 bp were amplified followed by their sequencing by Singer on an ABI 3130 automatic capillary sequencer (Applied Biosystems, USA) and subsequently determined similarity levels. Amplification pattern for *pehX* gene PCR fragments was performed by using a method described elsewhere with two primer pairs flanking fragment AD with a 513 bp length and 344 bp CD-long motifs. While examining 11 clinical bacterial strains identified earlier as *Klebsiella oxytoca*, lacking (atypical, negative) a 5-aminosalicylate decarboxylase (detected by the chromogenic reaction by 5-aminosalicylic acid) unique for the genus *Klebsiella*, molecular techniques identified 9 *K. michiganensis* strains and 1 strain highly homologous to *Klebsiella kielensis* based on the *rpoB* gene nucleotide sequence, confirming its high informative value. We used the methods for estimating a similarity level for sequenced fragments of *16S rRNA* genes (fragment length 387 bp), *gyrA* gene (fragment length 441 bp), *rpoB* gene (*rpoB-b* and *rpoB-e* with a total fragments length 834 bp), and the analysis of marker amplicon patterns for *pehX* gene (AD, CD). It was shown that for the 4 *K. oxytoca* strains, 99–100% similarity to *K. michiganensis* was identified for all fragments in the sequenced genes. Moreover, similarity of all 9 strains detected with *K. michiganensis* was revealed only in the *rpoB* gene, hereby allowing to recommend it as the most informative approach. The *pehX* gene encoding polygalacturonase was verified by PCR in the majority of *K. michiganensis* strains, pointing that this approach is not rational for their identification (distinguish with *K. oxytoca*). The most informative for the phenotypic identification of *K. michiganensis* are were assays characterized by a common profile for the majority of strains: lack of 5-aminosalicylate decarboxylase, lack of utilized histamine, dulcitol, tricarballylic acid; positive for indole production, as well as D-melezitose and putrescine utilization.

Key words: *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella kielensis*, *Klebsiella oxytoca*, unique *Klebsiella* enzyme 5-aminosalicylate decarboxylase, *rpoB* gene sequencing.

Введение

В последние 5 лет были открыты 3 новых вида клебсиелл, филогенетически связанных с видом *Klebsiella oxytoca*. В 2013 г. было опубликовано описание бактерий нового вида, *Klebsiella michiganensis*, выделенных в штате Мичиган (США) из держателя зубной щетки [8]. Сведений о выделении этих бактерий из клинического материала очень мало. В 2018 г. опубликовано сообщение о выделении у пациента с диареей в больнице университета Чжэцзян (Китай) штамма *K. michiganensis*, продуцирующего три

типа карбапенемаз: KPC-2, NDM-1, NDM-5 [9]. В 2018 г. в Институте Пастера (Париж) был открыт новый вид клебсиелл *Klebsiella grimontii* [7]. Штаммы этого вида выделяли у пациентов с антибиотик-ассоциированным геморрагическим колитом и раневыми инфекциями. В мае 2018 г. исследователи сообщили о выделении в Китае из мочи человека нового вида *Klebsiella huaxiensis* (неопубликованные данные). Ранее нами было установлено, что родоспецифический маркер клебсиелл декарбоксилаза 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК декарбоксилаза) встречается у бактерий *K. oxytoca* реже (88,0±4,9%), чем

у клебсиелл других видов — *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (94,4±2,3%), *K. mobilis* (92,5±4,3) [1]. Это позволило предположить, что среди атипичных (отрицательных по маркеру 5-АСК декарбоксилазе) штаммов *K. oxytoca* могут быть, кроме мутантов по этому признаку, представители новых видов клебсиелл.

Цель исследования — выявить оптимальный объект поиска изолятов бактерий *Klebsiella michiganensis*, определить их генетические и фенотипические характеристики, необходимые для идентификации.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. Объектами исследования были 11 штаммов *K. oxytoca* атипичных (отрицательных) по уникальному для клебсиелл маркеру 5-АСК декарбоксилазе. Штаммы были отобраны нами для генетического изучения после фенотипического исследования многочисленных клинических изолятов *K. oxytoca*, выделенных в 2015–2018 гг. в бактериологических лабораториях Военно-медицинской академии, ЗАО «Ситилаб» и других учреждений Санкт-Петербурга. В контроле использовали по два клинических штамма *K. oxytoca* и *Raoultella ornithinolytica* с типичными свойствами. Видовая принадлежность всех используемых штаммов была подтверждена методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS). Все указанные штаммы находятся в рабочей коллекции культур Е.П. Сиволодского на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии.

Питательные среды. Для культивирования бактерий использовали «Колумбийский агар» (НИЦФ, Санкт-Петербург). 5-АСК декарбоксилазу выявляли по хромогенной реакции на хромогенной питательной среде «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ-С» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург) [2]. Биохимические признаки клебсиелл и других энтеробактерий изучали микрообъемным методом с использованием тест-системы «Рапид-Энтеро» производства НИИЭМ имени Пастера (Санкт-Петербург) и микробиологическим анализатором «Vitek 2 Compact» (bioMérieux, Франция). Утилизацию субстратов в качестве единственного источника углерода осуществляли на минимальном солевом агаре (г/л): NH_4Cl — 5; NH_4NO_3 — 1; Na_2SO_4 — 2; K_2HPO_4 — 3; KH_2PO_4 — 1; MgSO_4 — 0,1; агар — 15; 1,6%-ный водный раствор бромтимолового синего — 4 мл, дистиллированная вода — 1 л; рН — 7,2; стерилизация при 121°C 20 мин. Каждый субстрат вносили по 0,1 г в отдельную колбу с 50 мл стерильной горячей среды, корректировали рН до значения 7,2, раз-

ливали в чашки Петри. Использовали субстраты: Histidine dihydrochloride, D-Melezitose monohydrate, Tricarballic acid, Putrescine dihydrochloride (Sigma-Aldrich, Швейцария).

Методика определения утилизации субстратов в качестве единственного источника углерода. Суточные агаровые культуры бактерий по полной петле ($d = 2$ мм) суспендировали в 0,2 мл стерильного 0,85% раствора NaCl в лунках стерильного полимерного планшета. Чашки сред с субстратами (состав сред указан выше) и контрольную среду без субстрата разделяли на 8 секторов и маркировали по номерам штаммов. Засевали исследуемые культуры по полной петле взвеси бактерий из лунки радиальным штрихом на сектор чашки с субстратом и контролем. Посевы выращивали при 37°C в течение 3 суток, просматривая ежедневно. Положительным результатом утилизации субстрата считали наличие четко выраженного газона бактерий по следу посева при отсутствии роста бактерий на контрольной среде без субстрата.

Тест на наличие 5-АСК декарбоксилазы — маркера бактерий рода *Klebsiella*. Исследуемый материал — суточную агаровую культуру бактерий — засевали петлей на поверхность сектора (¼ часть чашки) хромогенной питательной среды «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» в виде блюдца диаметром 5–6 мм, инкубировали посев при 37°C в аэробных условиях в течение 24 ч, учитывали результат: появление зоны темно-коричневой окраски питательной среды вокруг газона бактерий на бесцветном фоне среды указывало на наличие у бактерий 5-АСК декарбоксилазы; отсутствие темно-коричневой зоны окраски среды вокруг выросшего газона бактерий указывало на отсутствие у бактерий фермента 5-АСК декарбоксилазы.

Состав среды, методика приготовления и контроля указаны в инструкции по применению, а также в [2].

Идентификация видов бактерий методом MALDI-TOF MS. Использовали настольный MALDI-TOF масс-спектрометр «Microflex» с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics Inc., Germany) в соответствии с инструкцией по применению.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Выделение ДНК из суспензии колоний бактериальной культуры проводилось методом температурного лизиса по стандартной методике. В качестве мишеней для амплификации были использованы гены *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB*. Амплификацию фрагментов данных генов проводили методом стандартной ПЦР с использованием праймеров, имеющих описанные ранее последовательности, и при описанных ранее условиях. Были амплифицированы два фрагмента гена *rpoB*, общей длиной 834 п.н. [8], фрагмент гена *16S rRNA*,

длиной 387 п.н. [4], фрагмент гена *gyrA* длиной 441 п.н. [3]. Далее полученные фрагменты были использованы для их секвенирования. ПЦР фрагментов гена *pehX* для определения паттерна его амплификации проводилась по ранее описанной методике с использованием двух пар праймеров, фланкирующих фрагменты AD, длиной 513 п.н., и CD, длиной 344 п.н. [5]. ПЦР для каждой мишени проводилась с использованием реакционной смеси объемом 25 мкл, которая содержала 5 мкл универсального 5x Screen Mix (Евроген, Россия), включающего смесь дНТФ, MgCl₂, реакционный буфер и Taq-полимеразу, 15 мкл стерильной деионизированной воды, 1 нМ каждого праймера и 2 мкл ДНК-матрицы.

Секвенирование по Сенгеру. Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили

на капиллярном секвенаторе «ABI 3130» (Applied Biosystems, США) с использованием реакционной смеси «BigDye Terminator v3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Анализ и выравнивание полученных сиквенсов были проведены с помощью программы Geneious v.7, нумерация нуклеотидов и номенклатура мутаций основана на референсной нуклеотидной последовательности *Klebsiella* sp. (код доступа NCBI GenBank No CP020657.1).

Результаты

Изучение уровней сходства нуклеотидной последовательности секвенированных фрагментов генов *16S rRNA*, *gyrA*, *rpoB* выявило среди атипичных по 5-АСК декарбоксилазе штаммов *K. oxytoca* 3 группы по сходству с *K. michiganensis*

Таблица 1. Генетическая характеристика атипичных штаммов *K. oxytoca*

Table 1. Genetic characteristic of *K. oxytoca* atypical strains

Вид, штамм Species, strain	Уровень сходства секвенированных фрагментов генов (%) Similarity levels for sequenced genes fragments (%)								ПЦР-анализ гена <i>pehX</i> * PCR analysis of <i>pehX</i> gene*		
	16S rRNA		<i>gyrA</i>		<i>rpoB-b</i>		<i>rpoB-e</i>		AD	CD	
	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.	К.м.	К.ох.			
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> for all sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 404	100	100	100	100	100	100	100	100	100	–	–
<i>K. oxytoca</i> 409	100	100	100	100	100	100	100	100	100	–	–
<i>K. oxytoca</i> 31	100	100	100	< 99	99**	100	100	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 32	100	100	100	100	99**	100	100	100	< 99	–	+
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> не по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> not for all sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 1124	100	100	< 99	100	99**	100	< 99	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 29	100	100	100	100	100	100	< 99	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 41	< 99	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 2947	< 99	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 1442	100	100	< 99	100	100	100	100	100	100	–	+
Штаммы, имеющие невысокое сходство с <i>K. michiganensis</i> по секвенированным генам Strains with low similarity with <i>K. michiganensis</i> for sequenced genes											
<i>K. oxytoca</i> 9Б	< 99	100	< 97	99**	< 99	100	< 99	100	100	+	+
<i>K. oxytoca</i> 27	< 99	100	< 97	100	<i>K. kielensis</i> 100	<i>K. kielensis</i> 100	< 99	100	100	+	+
Контрольные штаммы <i>K. oxytoca</i> и <i>Raoultella ornithinolytica</i> Control strains <i>K. oxytoca</i> and <i>Raoultella ornithinolytica</i>											
<i>K. oxytoca</i> 820	< 99	100	< 99	100	< 99	100	< 99	99**	100	–	+
<i>K. oxytoca</i> 862	< 99	100	< 99	100	< 99	100	< 99	100	100	–	+
<i>R. ornithinolytica</i> 1240	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	–	–
<i>R. ornithinolytica</i> 433	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	< 99	–	–
Типовой штамм <i>K. michiganensis</i> W14T*** Typical <i>K. michiganensis</i> strain W14T***											
<i>K. michiganensis</i> W14		99		98			97			–	–

Примечание. К.м. — *K. michiganensis*, К.ох. — *K. oxytoca*, **pehX* — ген полигалактуроназы с анализом паттерна маркерных ампликонов AD, CD; **есть уникальные нуклеотидные замены, ***по [8].

Note. К.м. — *K. michiganensis*, К.ох. — *K. oxytoca*, **pehX* — the gene encoding polygalacturonase with the analysis of marker amplicons patterns (AD, CD), ** there are unique nucleotide substitutions, ***according to [8].

(табл. 1). Первая группа (штаммы 404, 409, 31, 32) имела 99–100% сходства с нуклеотидной последовательностью *K. michiganensis* и *K. oxytoca* у всех изученных генов; вторая группа (штаммы 1124, 29, 41, 2947, 1442) имела 99–100% сходства не по всем генам с *K. michiganensis* и 100% сходства с *K. oxytoca*. Третья группа (штаммы 9Б, 27) имела сходство менее 97% с генами *K. michiganensis* и 99–100% сходства с генами *K. oxytoca*, но при этом обнаруживались уникальные однонуклеотидные замены (SNP) в генах *rpoB* и *gyrA* у штамма *K. oxytoca* 9Б: 3 SNP в гене *gyrA* — G > A в положении 2390 п.н., T > C в положении 2393 п.н., C > T в положении 2396 п.н.

Штамм *K. oxytoca* 27 имел в фрагменте гена *rpoB* (*rpoB-b*) 100% сходство последовательностей с *K. kielensis*. Контрольные штаммы типичных *K. oxytoca* имели 99–100% сходства только с последовательностями генов *K. oxytoca*.

Контрольные штаммы *R. ornithinolytica* имели невысокое сходство (менее 99%) с генами *K. michiganensis* и *K. oxytoca*, но имели 100% сходства с последовательностями генов *R. ornithinolytica*.

Изучение у штаммов *K. michiganensis* и *K. oxytoca* методом ПЦР паттернов амплификации гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу (гидролиз пектина), показало, что амплификация этого гена не воспроизводится у некоторых штаммов, что предположительно связано с полной или частичной делецией гена.

Все выявленные штаммы *K. michiganensis* имели характерные для клебсиелл признаки. Их культуральные и биохимические свойства соответствовали, в основном, типовому штамму этого вида [8]. Однако, отмечена вариабельность штаммов по гидролизу мочевины, не обнаружены штаммы отрицательные по утилизации путресцина. Важным для идентификации

Таблица 2. Фенотипическая характеристика штаммов *K. michiganensis* и атипичных *K. oxytoca*

Table 2. Phenotypic characteristic of *K. michiganensis* strains and *K. oxytoca* atypical strains

Вид, штамм Species, strain	Вид по MALDI-TOF MS** Species by MALDI-TOF MS**	5-АСК декарбоксилаза 5-ASA decarboxylase	Индол Indole	Уреаза Urease	Утилизация Utilization				
					Гн Hn	Мц D Mc D	Дц Dc	Тк Ta	Пц Pc
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> for all sequenced genes									
<i>K. michiganensis</i> 404	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 409	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 31	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	–	+
<i>K. michiganensis</i> 32	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	–	+
Штаммы сходные с <i>K. michiganensis</i> не по всем секвенированным генам Strains similar to <i>K. michiganensis</i> not for all sequenced genes									
<i>K. michiganensis</i> 1124	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	+	+
<i>K. michiganensis</i> 29	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	+	+	+
<i>K. michiganensis</i> 41	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	–	+	+
<i>K. michiganensis</i> 2947	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	+	+	+
<i>K. michiganensis</i> 1442	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	–	+	+	+
Штаммы, имеющие невысокое сходство с <i>K. michiganensis</i> по секвенированным генам Strains with low similarity with <i>K. michiganensis</i> for sequenced genes									
<i>K. oxytoca</i> 9Б	<i>K. oxytoca</i>	–	+	+	–	+	–	+	+
<i>K. oxytoca</i> 27	<i>K. oxytoca</i>	–	+	–	–	–	–	+	+
Контрольные штаммы <i>K. oxytoca</i> и <i>Raoultella ornithinolytica</i> Control strains <i>K. oxytoca</i> and <i>Raoultella ornithinolytica</i>									
<i>K. oxytoca</i> 820	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>K. oxytoca</i> 862	<i>K. oxytoca</i>	+	+	+	–	+	+	+	+
<i>R. ornithinolytica</i> 1240	<i>R. ornithinolytica</i>	–	+	+	+	–	–	–	+
<i>R. ornithinolytica</i> 433	<i>R. ornithinolytica</i>	–	+	+	+	–	–	–	+
Типовой штамм <i>K. michiganensis</i> W 14Т*** Typical <i>K. michiganensis</i> strain W14Т***									
<i>K. michiganensis</i> W14т	<i>K. oxytoca</i> (score 1.998)	*	+	–	–	+	–	*	–

Примечание. Гн — гистамин, Мц D — D-мелицитоза, Дц — дульцит, Тк — трикарбаллиловая кислота, Пц — путресцин; *неизвестно, **в базе данных нет *K. michiganensis*, ***по [8].

Note. Hn — histamine, Mc D — D-melezitose, Dc — dulcitol, Ta — tricarballylic acid, Pc — putrescine;

*unknown, ***K. michiganensis* is absent in the database, ***according to [8].

K. michiganensis является их отношение к утилизации гистамина, D-мелицитозы, дульцитола, трикарбаллиловой кислоты, путресцина. Штаммы *K. michiganensis*, имеющие высокий уровень сходства по всем фрагментам секвенированных генов, имели одинаковый профиль по этим субстратам (табл. 2). Остальные штаммы этого вида имели различные варианты профилей.

Обсуждение

Наличие у 4 атипичных штаммов *K. oxytoca* (404, 409, 31, 32) 99–100% сходства с *K. michiganensis* и *K. oxytoca* по всем фрагментам секвенированных генов в сочетании с единым профилем фенотипических признаков (отсутствие 5-АСК декарбоксилазы; утилизации гистамина, дульцита, трикарбаллиловой кислоты; наличие продукции индола, утилизации D-мелицитозы, путресцина) позволяет идентифицировать их как вид *K. michiganensis*. Указанные фенотипические признаки совпадают с признаками типового штамма *K. michiganensis* W 14T, за исключением тех, которые отсутствуют в описании типового штамма [8].

Штаммы второй группы (1124, 29, 41, 2947, 1442), имеющие 99–100% сходства с *K. michiganensis* и *K. oxytoca* только по секвенированному фрагменту гена *rpoB* (*rpoB-b*), различались также по утилизации дульцита и D-мелицитозы. Поэтому мы рассматриваем эти штаммы как варианты вида *K. michiganensis*. Так как все 9 штаммов *K. michiganensis* были выявлены методом секвенирования гена *rpoB*, мы считаем этот подход наиболее информативным для их идентификации. Бактерии вида *K. michiganensis* выявлены нами впервые в России.

Штамм 9Б является видом *K. oxytoca*, так как имеет только 97% сходства с генами *K. michiganensis* и 99–100% сходства с генами *K. oxytoca*.

Его атипичность, возможно, связана с тремя SNP в гене *gyrA*. Фенотипические признаки его соответствуют виду *K. oxytoca*.

Штамм *K. oxytoca* 27 неожиданно показал в фрагменте гена *rpoB* (*rpoB-b*) 100% сходства последовательностей с бактериями вида *K. kielenensis*. Вид *K. kielenensis* пока представлен только отдельными нуклеотидными последовательностями в базе данных NCBI GenBank (идентификатор txid 20423021).

Описание этого вида пока не опубликовано. Поэтому этот штамм имеет научное значение для характеристики нового вида клебсиелл.

Исследование методом ПЦР паттернов амплификации гена *pehX*, кодирующего полигалактуроназу (гидролиз пектина), показало его наличие у большинства штаммов *K. michiganensis* и всех штаммов *K. oxytoca*, что определяет нецелесообразность этого исследования для дифференциации указанных видов.

Все 9 штаммов *K. michiganensis* были идентифицированы методом MALDI-TOF при сравнении с типовым штаммом *K. oxytoca* ATCC 13182T базы данных как вид *K. oxytoca* с низким уровнем вероятности вида (score 1.870–1.977). Эти данные полностью совпадают с характеристикой типового штамма *K. michiganensis* W14T, который был идентифицирован методом MALDI-TOF MS с тем же типовым штаммом сравнения базы данных как *K. oxytoca* с низким уровнем вероятности вида (score 1.998). Однако при использовании некоторых других нетиповых штаммов сравнения базы данных все 9 штаммов *K. michiganensis*, были определены как вид *K. oxytoca* с высокой вероятностью вида (score > 2.300). Вероятно, среди штаммов сравнения базы данных были штаммы *K. michiganensis*, которые трактовались как *K. oxytoca*. Примером пересмотра видовой принадлежности *K. oxytoca* на вид *K. michiganensis* является штамм *K. oxytoca* E718 [6]. Штамм был выделен в 2010 г. на Тайване у больного после операции на печени, отличался наличием R-плазмиды с геном NDM-1 карбапенемазы. Полная последовательность генома и плазмиды штамма *K. oxytoca* E178 была депонирована в 2012 г. в NCBI GenBank. После открытия *K. michiganensis* видовая принадлежность штамма была пересмотрена и в NCBI GenBank он обозначен как *K. michiganensis* E718 (NCBI GenBank No CP003681).

По нашим данным наиболее важным признаком *K. michiganensis* является отсутствие уникального фермента клебсиелл 5-АСК декарбоксилазы, который определяет хромогенную реакцию с 5-АСК в питательной среде [1, 2]. Этот признак имеет 100% специфичность, так как за период тридцатилетних наблюдений не выявлено ни одного ложноположительного результата у других видов бактерий. У некоторых штаммов клебсиелл (4–12%) отсутствует 5-АСК декарбоксилаза как результат естественной изменчивости или ошибочного причисления к клебсиеллам бактерий других родов со схожим фенотипом: например, бактерии рода *Raoultella* ранее считали клебсиеллами. В данном исследовании были выявлены 9 штаммов *K. michiganensis* при изучении 11 штаммов *K. oxytoca* атипичных (негативных) по 5-АСК декарбоксилазе. Поэтому оптимальным объектом поиска изолятов *K. michiganensis* являются бактерии с фенотипом *K. oxytoca*, негативные по хромогенной реакции с 5-АСК в питательной среде. Для идентификации *K. michiganensis* эти штаммы следует исследовать методом секвенирования гена *rpoB* (*rpoB-b*) [8] и определять профиль их фенотипических признаков (продукцию индола, утилизацию гистамина, D-мелицитозы, дульцита, путресцина, трикарбаллиловой кислоты).

Благодарности

Авторы благодарят врачей-бактериологов Домакову Т.В. (ЗАО «Ситилаб»), Горелову Г.В., Бого-

словскую С.П. (Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова) и д.м.н. Краеву Л.А. (НИИЭМ им. Пастера) за клинические штаммы *K. oxytoca*, предоставленные для исследования.

Список литературы/References

1. Сиволодский Е.П. Специфическое свойство бактерий рода *Klebsiella* — цветная реакция с 5-аминосалициловой кислотой в питательной среде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1988. № 12. С. 26–29. [Sivolodskii E.P. A specific property of bacteria in the genus *Klebsiella* — a color reaction with 5-aminosalicylic acid in the nutrient medium. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 1988, no. 12, pp. 26–29. (In Russ.)]
2. Сиволодский Е.П. Хромогенная синтетическая питательная среда «Клебсиелла 5-АСК ХРОМ С» для выделения и идентификации клебсиелл // Клиническая лабораторная диагностика. 2015. Т. 60, № 5. С. 48–51. [Sivolodskii E.P. The chromogenic synthetic medium «*Klebsiella* 5-ASA CHROM C» for isolation and identification of *Klebsiellae*. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, vol. 60, no. 12, pp. 48–51. (In Russ.)]
3. Brisse S., Verhoef J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and ribotyping. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2001, vol. 51, pp. 915–924. doi: 10.1099/00207713-51-3-915
4. Granier S., Plaisance L., Leflon-Guibout V., Lagier E., Morand S., Goldstein F., Nicolas-Chanoine M. Recognition of two genetic groups in the *Klebsiella oxytoca* taxon on the basis of chromosomal β -lactamase and housekeeping gene sequences as well as ERIC-1R PCR typing. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2003, vol. 53 (pt. 3), pp. 661–668. doi: 10.1099/ij.s.0.02408-0
5. Kovtunovych G., Lytvynenko T., Negrutka V., Lar O., Brisse S., Kozyrovska N. Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene. *Res. Microbiol.*, 2003, vol. 154, pp. 587–592. doi: 10.1016/S0923-2508(03)00148-7
6. Liao T.L., Lin A.C., Chen E., Huang T.W., Liu Y.M., Chang Y.H., Lei J.F., Lauderdale T.L., Wang J.T., Chang S.L., Tsai S.F., Chen Y.T. Complete genome sequence of *Klebsiella oxytoca* E718, a New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing nosocomial strain. *J. Bacteriol.*, 2012, vol. 194, no. 19, pp. 5454. doi: 10.1128/JB.01216-12
7. Passet V., Brisse S. Description of *Klebsiella grimontii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2018, vol. 68, pp. 377–381. doi: 10.1099/ijsem.0.002517
8. Saha R., Farrance Ch.E., Verghese B., Hong S., Donofrio R. *Klebsiella michiganensis* sp. nov. a new bacterium isolated from a tooth brush holder. *Curr. Microbiol.*, 2013, vol. 66, pp. 72–78. doi: 10.1007/s00284-012-0245-x
9. Zheng B., Xu H., Ya X., Lv T., Jiang X., Cheng H., Zhang J., Chen Y., Huang C., Xiao Y. Identification and genomic characterization of a RPC-2-, NDM-1- and NDM-5-producing *Klebsiella michiganensis* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2018, vol. 73, no. 2, pp. 536–538. doi: 10.1093/jac/dkx415

Авторы:

Сиволодский Е.П., д.м.н., профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия; старший научный сотрудник лаборатории молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия; **Фрейлихман О.А.**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярно-биологических технологий ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Sivolodskii E.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology S.M. Kirov Military Medical Academy, St.Petersburg, Russian Federation; Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biological Techniques, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; **Freylikhman O.A.**, PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biological Techniques, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.10.2018
Отправлена на доработку 17.04.2019
Принята к печати 28.06.2019

Received 24.10.2018
Revision received 17.04.2019
Accepted 28.06.2019