

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А., Махова М.А., Колесникова Е.А.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕЗИСТОМА И ВИРУЛОМА КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора,
603950, Нижний Новгород, Россия

Представлена характеристика структуры резистома и вирулома четырёх клинических карбапенем-устойчивых штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Два штамма принадлежали к сиквенс-типу ST395, один штамм – ST2262, один штамм – к новому сиквенс-типу 5816. У всех штаммов клебсиелл в структуре хромосомы определены гены фимбрий, энтеробактина, β-лактамаз типа SHV, устойчивости к фосфомицину *fosA* и транспорта фторхинолонов *oqxAB*. Вирулом штаммов ST395 – NNKP315 и NNKP343 обогащён детерминантами иерсинеобактина и аэробактина, гены последнего расположены в структуре плазмид *IncHI1B* (*IncHI1B/F1B*), высокогомологичных плазмидам вирулентности *pLVPK* и *pK2044*. В составе плазмидной ДНК этих штаммов, несущей репликоны *IncR*, *IncL*, *IncQ*, выявлен набор генов резистентности: *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1*, *catA1*, *catB3*, *tetA*, *sul1*, *dfrA1* и др. В результате анализа *in silico* сделано предположение о локализации гена *bla*_{OXA-48} у штамма NNKP315 в структуре плазмиды *IncHI1B*, которая содержит также гены аминогликозидаз в составе интегрона первого класса *In822*. В генах пориновых белков *OmpK35*, *OmpK36*, *OmpK37* обнаружены мутации, вносящие дополнительный вклад в проявление устойчивости к карбапенемам. В вирулом штамма NNKP16 (ST2262) входят хромосомные гены системы утилизации железа *kfuABC*, в вирулом штамма NNKP15 (ST5816) – гены капсульного полисахарида *kvgAS* и микроцина E492. В структуре резистома *K. pneumoniae* NNKP16 не выявлено дополнительных детерминант устойчивости, у штамма NNKP15 обнаружен только ген *bla*_{CTX-M-15}. Отсутствие приобретённых генов резистентности, по-видимому, обусловлено наличием системы CRISPR-Cas типа I-E. Множественная лекарственная устойчивость исследуемых штаммов связана с мутациями, выявленными в структуре маркерных генов, в частности, пориновых белков *OmpK36* и *OmpK37*, активностью эффлюксных систем. У обоих штаммов выявлено наличие стоп-кодона в последовательности регуляторного гена *ramR*, что потенциально может обеспечивать гиперэкспрессию эффлюкс-белков *AcrAB*.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; полногеномное секвенирование; факторы резистентности и патогенности; CTX-M-15; OXA-48; плазмиды; CRISPR-Cas.

Для цитирования: Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А., Махова М.А., Колесникова Е.А. Молекулярно-генетическая характеристика резистома и вирулома карбапенем-устойчивых клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (3): 186-192. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-186-192>

Для корреспонденции: Алексеева Анна Евгеньевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. метагеномики и мол. индикации патогенов; e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института Пастера (Париж) за курирование и поддержку базы данных BIGSdb-Pasteur (<http://bigsdb.pasteur.fr/>).

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 04.10.2021

Принята к печати 28.10.2021

Опубликовано 25.03.2022

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A., Makhova M.A., Kolesnikova E.A.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF RESISTOME AND VIRULOME OF CARBAPENEM-RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CLINICAL STRAINS

Nizhny Novgorod scientific and research institute of epidemiology and microbiology name acad. I.N. Blokhina of the Rosпотребнадзор, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The characteristics of resistome and virulome structure of four carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains are present in the work. Two strains belonged to the sequence-type ST395, one strain – ST2262, one strain – to the new sequence-type 5816. The genes of fimbriae, enterobactin, beta-lactamase SHV type, resistance to fosfomycin *fosA* and transport of fluoroquinolones *oqxAB* in all *Klebsiella* strains chromosome structure were identified. The determinants of yersineobactin and aerobactin are enriched the virulome of ST395 NNKP315 and NNKP343 strains. The aerobactin genes are located on *IncHI1B* plasmids (*IncHI1B/F1B*) which highly homologous to the virulence *pLVPK* and *pK2044* plasmids. *IncR*, *IncL*, *IncQ* plasmids carrying *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1}, *qnrS1*, *tetA*, *sul1*, *dfrA1*, *aac(6')-Ib-cr*, *catA1*, *catB3* etc. were identified in these strains. As a result of *in silico* analysis, an assumption about the localization of the *bla*_{OXA-48} in the structure of the *IncHI1B* plasmid of NNKP315 strain was made. This plasmid also contains the aminoglycosidases genes inserted into a class I integron *In822*. The mutations were found in the porin proteins *OmpK35*, *OmpK36* and *OmpK37* genes, which increases the carbapenem resistance. The virulome of NNKP16 (ST2262) strain additionally includes of the iron utilization system *kfuABC* chromosomal genes, and the virulome of NNKP15 (ST5816) strain contains of the capsular polysaccharide *kvgAS* and microcin E492 genes. Additional determinants of resistance were not identified in the resistome structure of *K. pneumoniae* NNKP16 and only the *bla*_{CTX-M-15} gene was found in the NNKP15 strain. The absence of acquired resistance genes seems to be due to the presence of the type I-E CRISPR-Cas system. Multiple drug resistance of the studied strains is associated with mutations identified in the gene structure of porin proteins *OmpK36* and *OmpK37*, as well as the activity of efflux systems. It was showed the stop codon formation in the nucleotide sequence of the regulatory gene *ramR* to both strains, which can potentially provide overexpression of *AcrAB* efflux proteins.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; whole genome sequencing; resistome; virulome; CTX-M-15; OXA-48; plasmids; CRISPR-Cas.

For citation: Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A., Makhova M.A., Kolesnikova E.A. Molecular genetic characteristics of resistome and virulome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67(3): 186-192 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-3-186-192>

For correspondence: Alekseeva A.E., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens; e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Information about authors:

Alekseeva A.E., <https://orcid.org/0000-0001-6482-0268>;
Brusnigina N.F., <https://orcid.org/0000-0003-4582-5623>;
Gordinskaya N.A., <https://orcid.org/0000-0002-4146-0332>;
Makhova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9443-0030>;
Kolesnikova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-0859-4339>.

Acknowledgments. The authors thank the Institut Pasteur teams for the curation and maintenance of BIGSdb-Pasteur databases at <http://bigsdbs.pasteur.fr/>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study had no sponsorship.

Received 04.10.2021
Accepted 28.10.2021
Published 25.03.2022

Введение. *Klebsiella pneumoniae* относится к группе условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), широко распространена, встречается в различных объектах окружающей среды, входит в состав микробиома человека и животных [1]. За последние два десятилетия интерес к изучению свойств полирезистентных штаммов *K. pneumoniae* возрос в связи с увеличением их доли как этиологического агента в структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [2, 3]. *K. pneumoniae* включены в группу ESKAPEE, объединяющую наиболее проблемных для мирового здравоохранения возбудителей (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter species*, *Escherichia coli*) [3, 4]. Реализация патогенного потенциала данных видов бактерий в условиях лечебного учреждения связана, в первую очередь, с их способностью быстро эволюционировать и адаптироваться к воздействию антимикробных препаратов (АМП) и дезинфицирующих средств, главным образом, за счёт приобретения дополнительных генов, локализованных на мобильных элементах [3, 4]. Некоторые исследователи рассматривают штаммы *K. pneumoniae* как ключевое звено в распространении генов антибиотикорезистентности среди других клинически значимых видов грамотрицательных бактерий [3].

Использование современных высокопроизводительных технологий глубокого секвенирования позволяет расшифровать молекулярно-генетические механизмы резистентности, лежащие в основе формирования устойчивых клонов, и разработать подходы, направленные на сдерживание темпов распространения полирезистентных клинических штаммов УПМ, включая *Klebsiella pneumoniae*.

Цель работы – молекулярно-генетическая характеристика факторов патогенности и антибиотикорезистентности клинических штаммов *K. pneumoniae*, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), включая карбапенемы.

Материал и методы. В исследование включены четыре карбапенем-устойчивые штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от больных, находящихся на стационарном лечении. Штаммы NNKP315, NNKP343 выделены от взрослых больных с ожоговой болезнью, другие

два штамма – от пациентов детского возраста – изолят NNKP15 из мочи ребёнка с циститом; изолят NNKP16 – из фекалий ребёнка с подозрением на внутриутробную инфекцию. Колумбийский агар, содержащий 5% бараньей крови (Sredoff, СПб), использован для культивирования чистых культур бактерий. Исследование на чувствительность штаммов к различным классам АМП осуществляли на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). С помощью SENSILA-test (Erba Mannheim, United Kingdom) проводили оценку антибиотикорезистентности на основании критериев EUCAST 2021, результаты представлены в табл. 1.

На секвенаторе MiSeq (Illumina, США) проведено полногеномное секвенирование исследуемых штаммов *K. pneumoniae* с использованием набора MiSeq reagent kit v3 (150 циклов) (Illumina, США). С помощью набора АмплиПрайм ДНК-сорб-В (ЦНИИЭ, Россия) выделена ДНК из чистых культур бактерий. Подготовка библиотеки ДНК для секвенирования осуществлена с помощью набора NebNext Ultra II FS DNA Library Preparation kit. Сборка полученных чтений *de novo* проведена с использованием web-сервиса Assembly: алгоритмы SPAdes и plasmid SPAdes, расположенные на сервере PATRIC (<https://patricbrc.org/app/Assembly2>). Собранные последовательности аннотированы с помощью сервиса PGAP (NCBI) [5] и сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/>).

Для типирования штаммов, определения детерминант антибиотикорезистентности и патогенности, использованы базы данных *Klebsiella* PasteurMLST database (<https://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), CARD (<https://card.mcmaster.ca/home>), сервис ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). С помощью алгоритма eBURST определены клональные группы [6]. Для выявления высокомолекулярных последовательностей использован web-сервис BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). С целью типирования по группам несовместимости плазмидной ДНК *in silico* использована программа PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>). С помощью web-сервисов Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>), IS-finder (<https://www-is.biotoul.fr/>), CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/>) установлено наличие интегронов, IS-элементов, последовательностей CRISPR Cas.

Результаты. На основании результатов аннотирования контигов, собранных из коротких чтений, получена общая молекулярно-генетическая характеристика исследуемых штаммов *K. pneumoniae* (табл. 2).

При типировании исследуемых штаммов с помощью схемы Multilocus Sequence Typing (MLST) [7] у штамма *NNKP15* выявлен новый аллельный вариант гена *phoE*, который депонирован в базу данных *Klebsiella Pasteur-MLST* под номером 571 и присвоен новый сиквенс-

тип (ST) – 5816. Полученные с помощью программы eBURST результаты определения клональных комплексов, в которые входят сиквенс-типы исследуемых штаммов представлены на рисунке.

Вирулом штаммов *K.pneumoniae NNKP15* и *NNKP16* содержит детерминанты патогенности только хромосомной локализации. У исследуемых штаммов *NNKP315* и *NNKP343*, принадлежащих ST395, обнаружены гены белка-сидерофора аэробактина, которые расположены в структуре последовательности, принадлежащей плазмидной ДНК и несущей репликон IncH11B (штамм *NNKP315*) и IncH11B/F1B (штамм *NNKP343*). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей плазмидной ДНК, выявленных у исследуемых штаммов, и последовательностей плазмид *pLVPK* (AY378100.1) и *pK2044* (AP006726.1), определяющих гипервирулентные свойства штаммов *K.pneumoniae CG43* [8] и *NTUH-K2044* [9], показал их высокое структурное сходство. Отличием является отсутствие у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* участков, ответственных за устойчивость к серебру и меди, синтез белка-сидерофора сальмохелина.

Для резистома исследуемых штаммов характерно наличие хромосомных генов β-лактамаз типа SHV, детерминант устойчивости к фторхинолонам *oqxAB* и фосфомицину *fosA*. Штамм *K. pneumoniae NNKP16* не обладает дополнительными детерминантами устойчивости ни в структуре хромосомы, ни в структуре плазмиды.

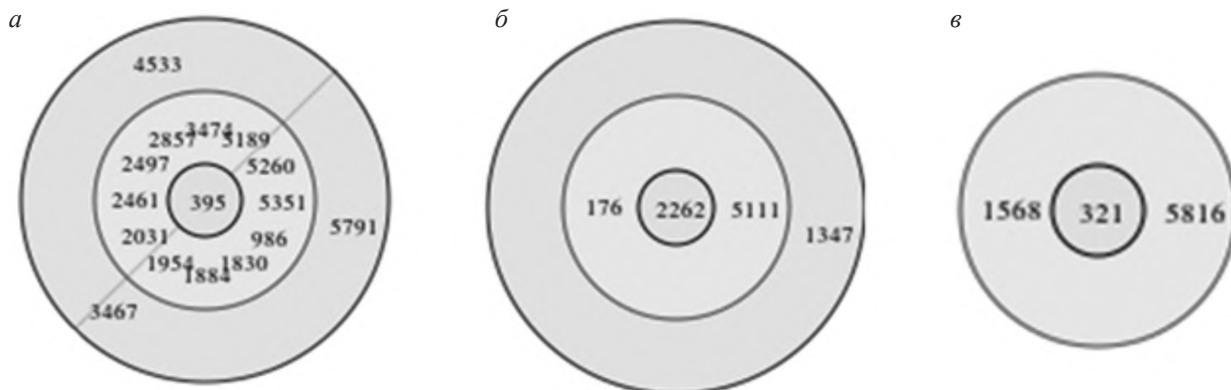
Детерминанта глобально распространенной цефалоспоринызы CTX-M-15 группы β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) определена у трёх штаммов клебсиелл. Анализ *in silico* показал, что у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* ген *bla_{CTX-M-15}* локализован в структуре плазмиды резистентности IncR. Отбор контигов проводился относительно референсной последовательности плазмиды *unnamed1* (CP063020.1) штамма *K.pneumoniae CriePir75*, выделенного в Москве в 2017 г. [10]. В последовательность плазмиды объединены контиги, несущие гены *bla_{OXA-1}*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{CTX-M-15}*, *qnrS1*, *tetA*, *sul1*, *dfrA1*, *aac(6')-Ib-cr*, *catA1*, *catB3*. При сравнительном анализе с использованием BLASTN установлено, что нуклеотидные последовательности плазмиды IncR штаммов *NNKP315* и *NNKP343* являются высокоомологичными последовательностям IncR плазмид штаммов *K. pneumoniae*, выделенным на территории России: в Москве, Московской области [10], в Нижнем Новгороде

Таблица 1

Антибиотикограмма штаммов *K. pneumoniae*

Препарат	Штамм <i>K.pneumoniae</i>			
	<i>NNKP15</i>	<i>NNKP16</i>	<i>NNKP315</i>	<i>NNKP343</i>
Ампициллин	R	R	R	R
Ампициллин/ сульбактам	R	S	R	R
Пиперациллин	R	R	R	R
Пиперациллин/ тазобактам	R	S	R	R
Амикацин	R	R	S	R
Гентамицин	R	S	R	R
Тетрациклин	R	R	-	-
Тигециклин	S	S	S	R
Ципрофлоксацин	R	R	R	R
Цефазолин	R	R	R	R
Цефотаксим	R	R	R	R
Цефуроксим	R	R	R	R
Цефтазидим	R	R	R	R
Цефтазидим/ клавуланат	R	R	R	R
Цефепим	R	R	R	R
Имипенем	R	R	R	R
Меропенем	R	R	S	R
Эртапенем	R	R	R	R
Триметоприм/ сульфаметоксазол	S	S	R	R
Азтреонам	R	R	R	R
Фурадонин	R	-	-	-
Полимиксин Е (колистин)	-	-	S	S

Примечание. S – чувствителен, R – устойчив, «-» – для тестирования штамма не использован.



Клональные группы, включающие: а – ST395, б – ST2262, в – ST5816, полученные с помощью алгоритма eBURST.

[11]. У штамма *NNKP15* определить расположение гена *bla_{CTX-M-15}* не удалось, поскольку нуклеотидная последовательность контига, включающего *bla_{CTX-M-15}*, высокомологична как последовательностям, входящим в состав плазмид IncFII, так и плазмид IncN.

У штаммов *K. pneumoniae NNKP315* и *NNKP343* выявлен ген эпидемически-значимой OXA-48 карбапенемазы, расположенный в составе транспозона Tn1999 [12]. У штамма *NNKP343* ген *bla_{OXA-48}* ассоциирован с плазмидной ДНК, несущей репликон IncL. У штамма *NNKP315* репликон IncL отсутствует, однако из набора контигов, принадлежащих плазмидной ДНК данного штамма, отобраны последовательности высокомологичные участку плазмиды *pOXA-48* штамма *K. pneumoniae Kp11978* (JN626286.1) общей длиной

22706 п.н. По-видимому, участок ДНК, содержащий ген *bla_{OXA-48}*, входит в состав плазмиды другой группы несовместимости. Поиск с помощью сервиса BLASTN позволил выявить последовательность плазмиды *unnamed2* (CP062994.1) группы несовместимости H11B, содержащей ген *bla_{OXA-48}*. Плаزمида обнаружена у штамма *K. pneumoniae CriePir200 ST336*, выделенного в Москве 2018 году [10]. В результате выравнивания плазмидных контигов штамма *NNKP315* относительно плазмиды *unnamed2* получена последовательность общей длиной 288 тыс. п. н. с уровнем покрытия 99% и идентичностью почти 100%. На основании полученных результатов сделано предположение, что участок, содержащий ген *bla_{OXA-48}* штамма *NNKP315*, входит в состав плазмиды IncH11B. В структуру данной плазмиды, по-видимому,

Таблица 2

Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *K. pneumoniae*

Метрические показатели	Штамм <i>K. pneumoniae</i>			
	NNKP315	NNKP343	<i>NNKP15</i>	<i>NNKP16</i>
Размер генома	5690644	5752029	5614635	5406160
Количество тРНК	49	47	58	57
Количество рРНК	4	3	4	4
Количество белок-кодирующих последовательностей	5514	5565	5325	5145
Количество CRISPR-Cas (тип)	1 (тип IV-A)	Только CRISPR без Cas белков	1 (тип I-E)	1 (тип I-E)
Репликоны плазмид	IncH11B(pNDM-MAR), IncR	IncH11B(pNDM-Mar), FIB (pNDM-Mar), IncL, IncR, IncQ1, ColpVC	IncFIB(K), IncFII, IncFII(K), IncN	IncFII(pKP91)-подобный
Сиквенс-тип/К-тип	395/K39	395/K39	5816 (новый)/K3	2262/K64
Детерминанты патогенности	Фимбрии (<i>mrkABCDFLJ</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFSG, fepABCDG, fes</i>) иерсиниобактин (<i>fyuA, irp1, irp2, ybtAEPOSTUX</i>), аэробактин (<i>iutAiuABC</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCDFHJL</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFSG, fepABCDG, fes</i>), иерсиниобактин (<i>fyuA, irp1, irp2, ybtAEPOSTUX</i>), аэробактин (<i>iutAiuABC</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCD-FHJL</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFSG, fepABCDG, fes</i>), капсульный полисахарид (<i>kvgAS</i>), микроцин E492 (<i>mceABCDEFGHIJ</i>)	Фимбрии (<i>mrkABCD-FHJL</i>), энтеробактин (<i>entABCDEFSG, fepABCDG, fes</i>), ABC-система утилизации железа (<i>kfuABC</i>)
Детерминанты антибиотикорезистентности	Бета-лактамазы			
	<i>blaSHV-11, blaOXA-48, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	<i>blaSHV-11, blaOXA-48, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaTEM-1B</i>	<i>blaSHV-1, blaCTX-M-15</i>	<i>blaSHV-108</i>
	Аминогликозидазы			
	<i>ant(2'')-Ia, ant(3'')-Ia, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, aph(3')-VIa, Δaph(6)-Id</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	Устойчивость к фторхинолонам			
	<i>oqxAB, qnrS1, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>oqxAB, qnrS1, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>oqxAB, qnrS1</i>	<i>oqxAB</i>
	Устойчивость к фосфомицину			
	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA</i>
	Устойчивость к хлорамфениколу			
	<i>ΔcatB3, catA1</i>	<i>ΔcatB3, catA1</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	Устойчивость к тетрациклинам			
	<i>tet(A)</i>	<i>tet(A)</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	Устойчивость к триметоприму			
	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA1</i>	<i>нет</i>	<i>нет</i>
	Устойчивость к макролидам			
	<i>macAB, mdfA</i>	<i>macAB, mdfA</i>	<i>macAB</i>	<i>macAB</i>
	Устойчивость к сульфаниламидам			
	<i>sulI</i>			

входит также участок, включающий интегрон первого класса с кассетными генами амингликозидаз *ant(2'')-Ia* и *ant(3'')-Ia*, который присутствует в нуклеотидной последовательности референсной плазмиды *unnamed 2*.

Резистом штамма *NNKP343* включает детерминанты *aph(3')-VIa* и *Δaph(6)-Id*, располагающиеся в плазмидной нуклеотидной последовательности, несущей репликон IncQ, высокомолекулярной последовательности целых IncQ плазмид *p3* (CP048948.1) штамма *K. pneumoniae 20467* (ST377) и *unnamed4* (CP062990.1) штамма *K. pneumoniae CriePir26* (ST377) [10], выделенных в Москве в 2018 и 2017 гг. соответственно.

В структуре генома всех исследуемых штаммов клебсиелл присутствуют гены, кодирующие эффлюксные белки, принадлежащие различным семействам, в частности, белки семейства RND – AcrABCDZR, MdtABC, EefABC, OqxAB [13], у штаммов *NNKP315* и *NNKP343* обнаружен ген, кодирующий белок KexD [14]. Гены эффлюксных белков семейства MATE – KdeA, KmrA, MdtK, EmmDR [15]; семейства SMR – KpnEF, SugE [15]; семейства MFS – EmrABD [16] присутствуют в геноме всех исследуемых штаммов. У *K. pneumoniae NNKP15* и *NNKP16* обнаружена мутация в структуре регуляторного гена *ramR*, приводящая к формированию раннего стоп-кодона. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* выявлены изменения в регуляторном гене *acrR*, сопровождающиеся аминокислотными заменами (P161R, G164A, F172S, R173G, L195V, F197I, K201M).

Структуры CRISPR-Cas определены у трёх исследуемых штаммов *K. pneumoniae*. У штаммов *NNKP15* и *NNKP16* эти последовательности находятся в составе хромосомной ДНК и относятся к типу I-E согласно классификации [17]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* CRISPR структуры обнаружены в последовательностях, входящих в состав плазмиды IncHI1B (HI1B/FIB). У штамма *NNKP315* обнаружена структура CRISPR вместе с Cas белками и относится к типу IV-A3 [18]. У штамма *NNKP343* выявлен только участок CRISPR, в генетическом окружении которого белки Cas отсутствуют, однако обнаружен хромосомный ген, кодирующий Cas6/Cse3/CasE типа I-E.

Последовательности генома штаммов *K. pneumoniae* депонированы в базу данных DDBJ/ENA/GenBank под номерами: JAHCSK000000000.1 (*NNKP15*), JAHCSJ000000000.1 (*NNKP16*), JACCIF000000000.1 (*NNKP343*), JACCIG000000000.1 (*NNKP315*).

Обсуждение. Установлено, что исследуемые карбапенем-устойчивые штаммы принадлежат разным сиквенс-типам. Представители сиквенс-типа ST395 являются одними из наиболее эпидемически распространённых как на территории России [10, 19], так и европейских стран [20, 21]. В Европе происходит постепенная смена доминирования глобальной клональной линии CG258 и формирование сложной поликлональной структуры карбапенем-устойчивых штаммов, включающей различные сиквенс-типы (ST101, ST307, ST348, ST395, ST392, ST405 и др.) [20, 21]. Сиквенс-тип 2262, к которому принадлежит штамм *NNKP16*, является редко встречаемым. В базе данных *Klebsiella PasteurMLST database* имеется информация только об одном штамме – *LWC04*, выделенном в 2016 г. в Китае. Упомянутая изолят *K. pneumoniae ST2262/K54*, обладающий свойствами гипервирулентных штаммов [22]. Что касается клональной группы, в которую входит новый ST5816, она объединяет редко встречаемые сиквенс-типы, выяв-

ляемые из различных биологических материалов человека, из образцов окружающей среды, согласно данным *Klebsiella PasteurMLST database*.

Общим признаком всех исследуемых штаммов является наличие хромосомных генов *blaSHV*, *oqxAB*, *fosA*. У штаммов присутствуют различные аллельные варианты генов β-лактамаз SHV. Геном штамма *NNKP16* содержит ген *blaSHV-108* – β-лактамазы широкого спектра действия, который впервые выявлен у штаммов клебсиелл в 1999 г. в Португалии [23]. На 1 июня 2021 г. в базу данных GenBank депонировано 44 штамма клебсиелл, несущих данный ген, что свидетельствует о его низком уровне распространенности. Аллельные варианты *blaSHV-1* и *blaSHV-11* не относятся к БЛРС, но являются одними из наиболее распространённых среди *K. pneumoniae* [19].

Структура вирулома штаммов, принадлежащих различным сиквенс-типам, имеет значительные отличия по набору и локализации детерминант патогенности. Штамм *NNKP15* обладает детерминантами *kvgAS* и микроцина E492, которые ранее выявлялись только в структуре генома гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*, ассоциированных с абсцессом печени [24]. В 2019 г. зарегистрированы случаи выявления этих генов у представителей классических *K. pneumoniae* ST405 в Италии [25]. Геном штамма *NNKP16* содержит маркеры ABC-системы утилизации железа *kfuABC*, часто обнаруживаемой у штаммов *K. pneumoniae* с высокоинвазивными свойствами [26]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343*, являющихся представителями эволюционной линии классических штаммов клебсиелл, обнаружено наличие плазмиды вирулентности IncHI1B (IncHI1B/FIB), данный факт не является исключительным случаем и отмечался ранее [10, 11, 19].

Сравнительный анализ структуры резистома исследуемых штаммов показал, что *K. pneumoniae NNKP315* и *NNKP343* сиквенс-типа 395 обладают значительно большим разнообразием детерминант устойчивости по сравнению со штаммами *NNKP15* и *NNKP16*, что объясняет высокую эпидемическую значимость представителей ST395 в развитии ИСМП. Только у *K. pneumoniae NNKP16* в отличие от других исследуемых штаммов не выявлено дополнительных детерминант устойчивости, что связано с отсутствием плазмид, несущих соответствующие гены. Ген цефалоспорины STX-M-15, который выявлен у трёх штаммов *K. pneumoniae*, является наиболее распространённым среди β-лактамаз группы STX-M. У двух штаммов сиквенс-типа 395 этот ген располагается в структуре последовательностей плазмиды IncR, высокомолекулярной последовательности соответствующих плазмид штаммов клебсиелл, выделенных на географически близкой территории. У штамма *K. pneumoniae NNKP15* не удалось определить локализацию гена *bla_{CTX-M-15}*, который может быть ассоциирован и с плазмидами IncFII и IncN, репликоны которых обнаружены в структуре плазмидной ДНК. Обе плазмиды обладают широким кругом хозяев, способствуя распространению генов, кодирующих ферменты CTX-M среди других представителей семейства *Enterobacteriaceae* [27, 28].

Ген карбапенемазы OXA-48 выявлен только у представителей сиквенс-типа 395. На территории России случаи обнаружения представителей данного сиквенс-типа среди OXA-48 позитивных штаммов *K. pneumoniae* все чаще находят отражение в научных статьях [10, 11, 19]. У штаммов *NNKP315* и *NNKP343* имеются разли-

чия в локализации гена *bla*_{OXA-48}. У штамма *NNKP343* ген *bla*_{OXA-48} ассоциирован с плазмидой IncL, что согласуется с результатами исследований [29], свидетельствующими, что плазмиды IncL являются основными носителями гена OXA-48 карбапенемазы. У штамма *NNKP315* согласно результатам *in silico* участок, несущий гены карбапенемазы OXA-48 и интегрона In822 с набором кассетных генов аминогликозидаз входит в структуру плазмиды IncHI1B. Сведения об аналогичных случаях обнаружения гена *bla*_{OXA-48} в структуре плазмид IncHI1B отсутствуют. В литературе описаны примеры комбинации в составе одной плазмиды участков ДНК высокоомологичных последовательностям других плазмид. У штамма *K. pneumoniae* Kp_Goe-39795 обнаружена плазида *pKp_Goe_795-1* (CP018460) длиной 232 тыс. п. н., в структуре которой установлены высокоомологичные участки нуклеотидным последовательностям пяти плазмид [30].

Возникновение мутаций в структуре генов, кодирующих белки пориновых каналов OmpK35, OmpK36, OmpK37, сопровождается изменениями проницаемости, формируя устойчивость к карбапенемам и цефалоспорином штаммов клебсиелл [31, 32]. Такие мутации обнаружены у всех исследуемых штаммов, однако наибольшее значение они имеют для формирования карбапенем-резистентности штаммами *NNKP15* и *NNKP16*, не обладающими карбапенемазной активностью.

Синергетический эффект на развитие полирезистентных свойств штаммов бактерий, включая *K. pneumoniae*, оказывает активность транспортных эффлюкс-систем [15]. В структуре геномов всех исследованных штаммов выявлены гены белков систем эффлюкса, принадлежащих различным семействам. Наиболее важную роль в формировании резистентности играют белки семейства RND, обладающие широкой субстратной специфичностью [13]. Отличительной чертой штаммов *NNKP315* и *NNKP343* является присутствие гена, кодирующего белок KexD и ответственного за транспорт макролидов и тетрациклина [14]. Наличие у этих штаммов аминокислотных замен в структуре регуляторного белка AcrR приводит к сверхпродукции белка AcrA, входящего в состав трёхкомпонентной эффлюксной помпы AcrAB-TolC, и снижению чувствительности к фторхинолонам [33]. У штаммов *NNKP15* и *NNKP16* обнаружена мутация в структуре гена *ramR*, кодирующего белок RamR – негативный регулятор экспрессии белков AcrAB, что может способствовать сверхпродукции этих белков [34] и формированию полирезистентных свойств штаммами *NNKP15* и *NNKP16*.

Последовательности CRISPR-Cas, присутствующие в геноме штаммов *K. pneumoniae*, являются адаптивной иммунной системой бактерий, позволяющей ограничивать приобретение внешних генетических элементов, соблюдая баланс между потребностью в получении полезных характеристик за счёт горизонтального переноса генов и необходимостью защиты от заражения бактериофагом [17, 35]. По-видимому, вследствие наличия CRISPR-Cas структуры штамм *NNKP16* не обладает генами патогенности и резистентности, локализованными на мобильных элементах. У штамма *NNKP315* участок CRISPR-Cas обнаружен в последовательностях, входящих в состав плазмиды IncHI1B, что согласуется с данными о наличии строгой ассоциации структур CRISPR-Cas данного типа с плазидами группы несовместимости HI1B (HI1B/FIB) [36]. В составе спейсеров

обнаружены последовательности, высокоомологичные участкам плазмидной ДНК, что, по-видимому, обеспечивает преимущество во внутриклеточной межплазмидной конкуренции [37]. У штамма *NNKP343* выявлен только участок CRISPR без белков Cas. У CRISPR-Cas IV типа модуль генов, кодирующих Cas-белки рядом с CRISPR, может отсутствовать [37]. Для функционирования системы IV типа могут быть использованы хромосомные Cas-белки типа I-E. Нами у штамма *NNKP343* обнаружен ген, кодирующий Cas6/Cse3/CasE типа I-E.

Заключение. Результаты исследований свидетельствуют о разнообразии популяционной структуры карбапенем-устойчивых госпитальных штаммов *K. pneumoniae*. Все исследуемые штаммы *K. pneumoniae*, обладая схожим фенотипом устойчивости, имеют существенные отличия по генотиповой принадлежности, набору детерминант резистентности и патогенности. Получены новые данные о продолжающейся эволюции штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к эпидемически значимому сиквенс-типу 395. Показано, что карбапенем-устойчивостью могут обладать штаммы *K. pneumoniae*, принадлежащие к редко встречающимся сиквенс-типам и характеризующиеся низким разнообразием маркёров резистентности, что связано с присутствием системы CRISPR-Cas. В формирование полирезистентности данных штаммов оказались вовлечены альтернативные механизмы, ассоциированные с мутационной изменчивостью соответствующих маркёрных генов и активностью эффлюкс-систем.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–10, 12–37 см. REFERENCES)

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А. Мобильном клинических карбапенем-устойчивых изолятов *Klebsiella pneumoniae*. *Генетика*. 2020; 56(3): 272-81. DOI: 10.31857/S0016675820030030.

REFERENCES

1. Yang Y., Higgins C.H., Rehman I., Galvao K.N., Brito I.L., Bicalho M.L. et al. Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans. *Appl. Environ. Microbiol.* 2019; 85(6). DOI: 10.1128/AEM.02654-18.
2. Pendleton J.N., Gorman S.P., Gilmore B.F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2013; 11(3): 297-30. DOI: 10.1586/eri.13.12.
3. Wyres K.L., Holt K.E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 2018; 45: 131-9. DOI: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
4. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4): e00088-17. DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
5. Tatusova T., DiCuccio M., Badretdin A., Chetvernin V., Nawrocki E.P., Zaslavsky L. et al. NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(14): 6614-24. DOI: 10.1093/nar/gkw569.
6. Francisco A.P., Bugalho M., Ramirez M., Carriço J.A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Biol.* 2009; 10: 152. DOI: 10.1186/1471-2105-10-152.
7. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 4178-82. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005.
8. Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.F., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK

- of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*. 2004; 337: 189-98. DOI: 10.1016/j.gene.2004.05.008.
9. Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* 2009; 191(14): 4492-01. DOI: 10.1186/s13756-019-0596-1.
 10. Shelenkov A., Mikhaylova Y., Yanushevich Y., Samoilov A., Petrova L., Fomina V. et al. Molecular typing, characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antibiotics (Basel)*. 2020; 9(5): 1-15. DOI: 10.3390/antibiotics9050261.
 11. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A. The mobilome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Genetika*. 2020; 56(3): 280-8. DOI:10.1134/S1022795420030035. (in Russian)
 12. Poirrel L., Bonnin R.A., Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56 (1): 559-62. DOI: 10.1128/AAC.05289-11.
 13. Colclough A.L., Alav I., Whittle E.E., Pugh H.L., Darby E.M., Le-good S.W. et al. RND efflux pumps in Gram-negative bacteria; regulation, structure and role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2020; 15: 143-57. DOI: 10.2217/fmb-2019-0235.
 14. Ogawa W., Onishi M., Ni R., Tsuchiya T., Kuroda T. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene*. 2012; 498(2): 177-82. DOI: 10.1016/j.gene.2012.02.008.
 15. Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., van Veen H.W., Pos K.M., Pid-dock L.J.V. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2018; 16(9): 523-39. DOI:10.1038/s41579-018-0048-6.
 16. Kumar S., Mukherjee M.M., Varela M.F. Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. *Int. J. Bacteriol.* 2013; 2013: 204141. DOI:10.1155/2013/204141.
 17. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J. et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18(2): 67-3. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x.
 18. Newire E., Aydin A., Juma S., Enne V.I., Roberts A.P. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System located exclusively on IncHI1B/IncFIB plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1937. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01937.
 19. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., Novikova T.S., Fedyukina G.N., Kubanova et al. Emergence of five genetic lines ST395 NDM-1, ST13 OXA-48, ST3346 OXA-48, ST39 CTX-M-14, and novel ST3551 OXA-48 of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Microb. Drug Resist.* 2020; 26(8): 924-33. DOI: 10.1089/mdr.2019.0289.
 20. Maida C., Bonura C., Geraci D., Graziano G., Carattoli A., Rizzo A. et al. Outbreak of ST395 KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Palermo, Italy. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2018; 39(4): 496-8. DOI:10.1017/ice.2017.267.
 21. Muggeo A., Guillard T., Klein F., Reffuveille F., François C., Babosan A. et al. Spread of *Klebsiella pneumoniae* ST395 non-susceptible to carbapenems and resistant to fluoroquinolones in North-Eastern France. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 2018; 13: 98-103. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.10.023.
 22. Li L., Yuan Z., Chen D., Xie X., Zhang B. Clinical and microbiological characteristics of invasive and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infections in a teaching hospital in China. *Infect. Drug Resist.* 2020; 13: 4395-403. DOI: 10.2147/IDR.S282982.
 23. Mendonça N., Ferreira E., Louro D. Antibiotic Resistance Surveillance Program in Portugal (ARSIP) Participants, Caniça M. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009; 34(1): 29-37. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.11.014.
 24. Marcoleta A.E., Berrios-Pastén C., Nuñez G., Monasterio O., Lagos R. *Klebsiella pneumoniae* asparagine tDNAs are integration hotspots for different genomic islands encoding Microcin E492 production determinants and other putative virulence factors present in hypervirulent strains. *Front. Microbiol.* 2016; 7(849). DOI: 10.3389/fmicb.2016.00849.
 25. Fasciana T., Gentile B., Aquilina M., Ciammaruconi A., Mascarella C., Anselmo A. et al. Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19: 2019. DOI: 10.1186/s12879-019-4565-3.
 26. Ma L.C., Fang C.T., Lee C.Z., Shun C.T., Wang J.T. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(1): 117-28. DOI: 10.1086/430619.
 27. Novais A., Cantón R., Moreira R., Peixe L., Baquero F., Coque T.M. Emergence and dissemination of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(2): 796-9. DOI: 10.1128/AAC.01070-06.
 28. Dolejska M., Villa L., Hasman H., Hansen L., Carattoli A. Characterization of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* from animals, the environment and humans. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013; 68(2): 333-9. DOI: 10.1093/jac/dks387.
 29. Carattoli A., Seiffert S.N., Schwendener S., Perreten V., Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE*. 2015; 10(5): e0123063. DOI: 10.1371/journal.pone.0123063.
 30. Schwanbeck J., Bohne W., Hasdemir U., Groß U., Pfeifer Y., Bunk B. et al. Detection of a new resistance-mediating plasmid chimera in a blaOXA-48-positive *Klebsiella pneumoniae* strain at a German University Hospital. *Microorganisms*. 2021; 9(4): 720. DOI: 10.3390/microorganisms9040720.
 31. Uz Zaman T., Aldrees M., Al Johani S.M., Alrodayyan M., Al-dughashem F.A., Balkhy H.H. Multi-drug carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection carrying the OXA-48 gene and showing variations in outer membrane protein 36 causing an outbreak in a tertiary care hospital in Riyadh, Saudi Arabia. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 28: 186-92. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.05.021.
 32. Ruiz E., Ocampo-Sosa A.A., Rezusta A., Revillo M.J., Román E., Torres C. et al. Acquisition of carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strains harbouring blaCTX-M-15, qnrS1 and aac(6)-Ib-cr genes. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(5): 672-7. DOI: 10.1099/jmm.0.038083-0.
 33. Schneiders T., Amyes S.G., Levy S.B. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(9): 2831-7. DOI: 10.1128/AAC.47.9.2831-2837.2003.
 34. Hentschke M., Wolters M., Sobottka I., Rohde H., Aepfelbacher M. ramR mutations in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to tigecycline. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54: 2720-3. DOI: 10.1128/AAC.00085-10.
 35. Barrangou R. Diversity of CRISPR-Cas immune systems and molecular machines. *Genome Biol.* 2015; 16: 247. DOI: 10.1186/s13059-015-0816-9.
 36. Newire E., Aydin A., Juma S., Enne V.I., Roberts A.P. Identification of a Type IV-A CRISPR-Cas System located exclusively on IncHI1B/IncFIB plasmids in *Enterobacteriaceae*. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1937. Doi: 10.3389/fmicb.2020.01937.
 37. Pinilla-Redondo R., Mayo-Muñoz D., Russel J., Garrett R.A., Randau L., Sørensen S.J. et al. Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(4): 2000-12. DOI: 10.1093/nar/gkz1197. 21.