

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРБАПЕНЕМ- УСТОЙЧИВОГО ШТАММА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ВЕТКИ ВЫСОКОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ

А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, Н.А. Гординская

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

Резюме. На основании результатов полногеномного секвенирования дана молекулярно-генетическая характеристика клинического штамма *Klebsiella pneumoniae* KP254, принадлежащего к клональной группе 23. Известно, что представители данной клональной группы могут обладать высокой вирулентностью и являться возбудителями внебольничных инфекций. Фенотипически штамм *K. pneumoniae* KP254 характеризуется множественной лекарственной устойчивостью, включая карбапенемы. В структуре хромосомы обнаружены детерминанты антибиотикорезистентности (*bla*_{SHV-1}, *oqxAB*, *fosA*) и патогенности, кодирующие фимбрии 1 и 3 типов и синтез белка-сидерофора иерсинеобактина. Установлено отсутствие конъюгативного элемента ICEKp1, острова патогенности KPNPI208, а также генов аллантаинового регулона, которыми часто обладают высоковирулентные штаммы. Анализ нуклеотидных последовательностей *in silico* позволил выявить репликоны плазмид групп несовместимости FII, FIA_{НИИ}/FII_К, Col₄₄₀₁, Col_{pVC}, FIB_К, FII_{pCRY}. В результате объединения контигов относительно референсных последовательностей с использованием сервиса BLASTN определено наличие предположительно двух плазмид антибиотикорезистентности IncFII и IncFII_{pCRY} и одной плазмиды вирулентности IncFIB_К. В структуру плазмиды вирулентности входят детерминанты белка-сидерофора аэробактина, регулятора мукоидного фенотипа RmpA₂, а также гены устойчивости к тяжелым металлам. Покрытие нуклеотидной последовательности плазмиды вирулентности составило 93% относительно плазмиды вирулентности pK2044 с уровнем идентичности 99,38%, делетированными оказались области, ответственные за синтез сальмохелина и белка RmpA. Набор детерминант антибиотикорезистентности, выявленных в структуре мобилома, включает гены бета-лактамазы LAP-2 (плазмида IncFII_{pCRY}) — аналога TEM-1, — а также бета-лактамазы расширенного спектра CTX-X-55 (плазмида IncFII). Обе детерминанты являются редко регистрируемыми на территории Российской Федерации. Дополнительно в составе плазмидной ДНК обнаружены широко распространенные гены *bla*_{OXA-1}, *aac(3')-IIa*, *ΔcatB4*, *aac(6)-Ib-cr*, *tet(A)*, *qnrS1*, *sul2*, *catA2*. В структуре резистоста отсутствуют гены карбапенемаз, в то время как исследуемый штамм обладает устойчивостью

Адрес для переписки:

Алексеева Анна Евгеньевна
603950, Россия, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 432-87-91. Факс: 8 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Contacts:

Anna E. Alekseeva
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Blokhina I.N. Scientific Research Institute
of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod.
Phone: +7 (831) 432-87-91. Fax: +7 (831) 469-79-20.
E-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Для цитирования:

Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Гординская Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика карбапенем-устойчивого штамма *Klebsiella pneumoniae* KP254 как представителя эволюционной ветки высоковирулентных штаммов // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-1480

Citation:

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A. Molecular genetic characteristics of the carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* KP254 strain as a representative of the highly virulent strain evolutionary branch // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 506–516. doi: 10.15789/2220-7619-MGC-1480

к карбапенемам. В результате анализа транслированных последовательностей генов пориновых белков OmpK35 и OmpK36 обнаружены мутационные изменения, которые привели к формированию стоп-кодона в гене *ompK35*. Также установлено, что аминокислотная последовательность OmpK36 содержит большое количество замен, вставок и делеций. Наличие подобных изменений является одним из факторов, определяющих устойчивость к карбапенемам. Синергетический эффект может оказывать активность эффлюксных насосов, присутствующих в структуре генома *K. pneumoniae* KP254, в частности AcrAB-TolC и KpnEF. Таким образом, у исследуемого штамма наблюдается сохранение наиболее значимых признаков, характерных для представителей эволюционной ветки высоковирулентных штаммов клебсиелл, и в тоже время приобретение генетических детерминант множественной лекарственной устойчивости.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, сиквенс-тип 23, CTX-M-55, LAP-2, детерминанты резистентности и патогенности, плазмиды, вирулентность, порины.

MOLECULAR GENETIC CHARACTERISTICS OF THE CARBAPENEM RESISTANT *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* KP254 STRAIN AS A REPRESENTATIVE OF THE HIGHLY VIRULENT STRAIN EVOLUTIONARY BRANCH

Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A.

I.N. Blokhina Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Here we provide molecular and genetic characteristics of the *Klebsiella pneumoniae* KP254 clinical strain belonging to clonal group 23 based on the genome-wide sequencing data. It is known that representatives of such clonal group exert highly virulent properties and cause community-acquired infections. Phenotypically, *K. pneumoniae* KP254 strain is characterized by multidrug resistance, including carbapenems. The determinants of antibiotic resistance (*bla*_{SHV-1}, *oqxAB*, *fosA*) and pathogenicity encoding fimbriae 1, 3 types and the siderophore yersineobactin synthesis were found in the chromosome structure. However, there was uncovered the lack of conjugative element ICEKp1, the pathogenicity island KPHP1208, and the allantoin regulon genes which are often found in highly virulent strains. Analyzing nucleotide sequences *in silico* allowed to reveal the replicons of incompatibility group plasmids for FII, FIA_{HII}/FII_K, Col₄₄₀₁, Col_{PVC}, FIB_K, FII_{PCRY}. Combining contigs relative to reference sequences by using the BLASTN service allowed to identify two putative antibiotic resistance plasmids IncFII and IncFII_{PCRY} as well as one virulence plasmid IncFIB_K. The determinants of the aerobactin siderophore, the RmpA₂ mucoid phenotype regulator as well as heavy metal resistance genes constitute the virulence plasmid structure. The virulence plasmid nucleotide sequence coverage comprised 93% relative to the virulence plasmid pK2044 with 99.38% identity level; the genomic regions responsible for the salmochelin and RmpA protein synthesis were deleted. The set of antibiotic resistance determinants identified in the mobilome structure includes the genes for beta-lactamase LAP-2 (IncFII_{PCRY} plasmid) — a TEM-1 analogue, as well as extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-55 (IncFII plasmid), both of which are rarely recorded in the Russian Federation. Additionally, widespread genes *bla*_{OXA-1}, *aac*(3')-IIa, *ΔcatB4*, *aac*(6')-Ib-cr, *tet*(A), *qnrS1*, *sul2*, *catA2* were also found in the plasmid DNA. The carbapenemase genes are absent in the resistome structure, whereas the examined strain exerts carbapenem resistance. The analysis of the *ompK35* and *ompK36* porin gene translated sequences revealed mutational changes which resulted in emerged stop codon within the *ompK35* gene, whereas OmpK36 amino acid sequence contains a large number of substitutions, insertions, and deletions. The changes identified serve as one of the factors determining the carbapenem resistance. A synergistic effect may be accounted for by activity of the efflux pumps found in the structure of the *K. pneumoniae* KP254 genome, particularly AcrAB-TolC and KpnEF. Thus, the strain examined by us preserves the most significant signs specific to the highly virulent evolutionary branch *Klebsiella* strains, and at the same time, acquires the multidrug resistance genetic determinants.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, sequence type 23, CTX-M-55, LAP-2, determinants of resistance and pathogenicity, plasmids, virulence, porins.

Введение

Известно, что бактерии вида *Klebsiella pneumoniae* относятся к группе условно-патогенных микроорганизмов и являются представителями нормофлоры организма человека. Однако в настоящее время штаммы *Klebsiella pneumoniae*, обладающие множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), занимают

одно из лидирующих мест в этиологической структуре инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и включены в группу ESCAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* sp.) как представляющие наибольшую опасность для здравоохранения [2, 5, 10, 11, 24, 28, 35]. Нужно отметить, что *Klebsiella pneumoniae*

являются возбудителями не только нозокомиальных, но и внебольничных инфекционных заболеваний, таких как пневмония, гнойный абсцесс печени, воспаления урогенитального тракта, менингиты [5, 6, 10, 12, 28, 34, 35]. На основании филогенетического анализа корового генома (core genome) Bialek-Davenet S. и соавт. [5] выявили наличие у штаммов клебсиелл двух эволюционных линий, к одной из которых принадлежат штаммы классических *K. pneumoniae* (*cK. pneumoniae*) с МЛУ и низкой вирулентностью, являющиеся нозокомиальными возбудителями. Вторая линия объединила штаммы клебсиелл, обладающие высоковирулентными или гипервирулентными свойствами (*hvK. pneumoniae*) с низким уровнем антибиотикорезистентности и обуславливающие развитие внебольничных инфекций, в том числе у здоровых людей [2, 9, 15, 24, 28, 35, 38, 45]. Высокий уровень вирулентности *hvK. pneumoniae* обеспечивается наличием дополнительных факторов патогенности, к которым относятся белки-сидерофоры (сальмохелин, аэробактин, энтеробактин) [33, 34, 35, 38], ABC-система утилизации железа (*kfuABC*), регуляторы формирования гипермукоидного фенотипа (*rmpA/A2*), гены капсулообразования (*magA*, *k2A*, *wcaG*) [35, 38, 45] и синтеза липополисахаридов (*wabG*, *uge*, *ycfM*) [20, 33, 35, 45], аллантаин-утилизирующая система (*allA*, *gcl*, *allD*, *allR*, *allS*) [12, 33, 34, 38]. Наличие таких генов способствует проявлению штаммами *hvK. pneumoniae* высоко инвазивных свойств и быстрому размножению в тканях человека, поскольку продукция нескольких типов сидерофоров обеспечивает доступ к ионам железа, капсулообразование способствует ускользанию от иммунной защиты организма человека, а система утилизации аллантаина служит источником азота. Дополнительные факторы патогенности имеют хромосомную локализацию, а также находятся в структуре мобильных элементов, таких как плазмиды вирулентности рK2044-подобные и рLVPK-подобные (номера депонирования GenBank CP026012.1 и AY378100.1 соответственно) [10, 45], конъюгативный интегративный элемент ICEKp, встраивающийся в хромосому в сайтах аспарагиновой тРНК [27], остров патогенности KPNP1208 [23]. Все эти мобильные структуры имеют схожие участки, кодирующие йерсиниобактин и сальмохелин. Остров патогенности KPNP1208 несет дополнительные модули: кластер генов колибактина (*clb*) и микроцина [23].

Штаммы *hvK. pneumoniae* начали регистрироваться с середины 80-х гг. прошлого века исключительно на территории Азиатско-Тихоокеанского региона, но в связи с усилением миграционного потока и туристической актив-

ности с начала 2000-х гг. высоковирулентные штаммы стали также обнаруживаться на территории Европы, Африки, Америки и России. Особую тревогу вызывают сообщения о случаях приобретения такими штаммами детерминант множественной лекарственной устойчивости [11, 16, 40, 46], что свидетельствует о формировании суперпатогена двойного риска. Однако следует отметить, что имеется существенный дефицит информации о детальной молекулярно-генетической характеристике представителей эволюционной ветки, включающей *hvK. pneumoniae*, которые обладают множественной лекарственной устойчивостью.

Материалы и методы

Объектом исследования был клинический изолят *K. pneumoniae* KP254, выделенный из раневого отделяемого пациента ожогового отделения клиники Приволжского исследовательского медицинского университета, характеризующийся множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ), в том числе к карбапенемам. Антибиотикограмма для данного штамма представлена в нашей статье, опубликованной ранее [1]. Для выделения ДНК использовали набор «АмплиПрайм ДНКсорб-В» (ЦНИИЭ, Москва). Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Австрия). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT (Illumina, США). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent kit v2 (500 циклов). Выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей *de novo* осуществляли с помощью программы SPAdes (версия 3.9.1). Аннотирование проводили с использованием Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok) и сервера Rapid Annotation using Subsystem Technology (<https://rast.nmpdr.org>). С помощью сервиса BLASTN осуществляли поиск гомологичных последовательностей, принадлежащих мобильным элементам, в первую очередь — плазмидам, и подбор наиболее близких референс-последовательностей целых плазмид, депонированных в базе данных GenBank. Типирование по группам несовместимости плазмид *in silico* проводили с использованием web-сервиса PlasmidFinder [8], а также базы данных plasmid MLST database (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_plasmid_seqdef). Детекцию детерминант антибиотикорезистентности и патогенности осуществляли с помощью базы данных Klebsiella Sequence Typing (<http://bigdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) и сервера Center for Genomic Epidemiology

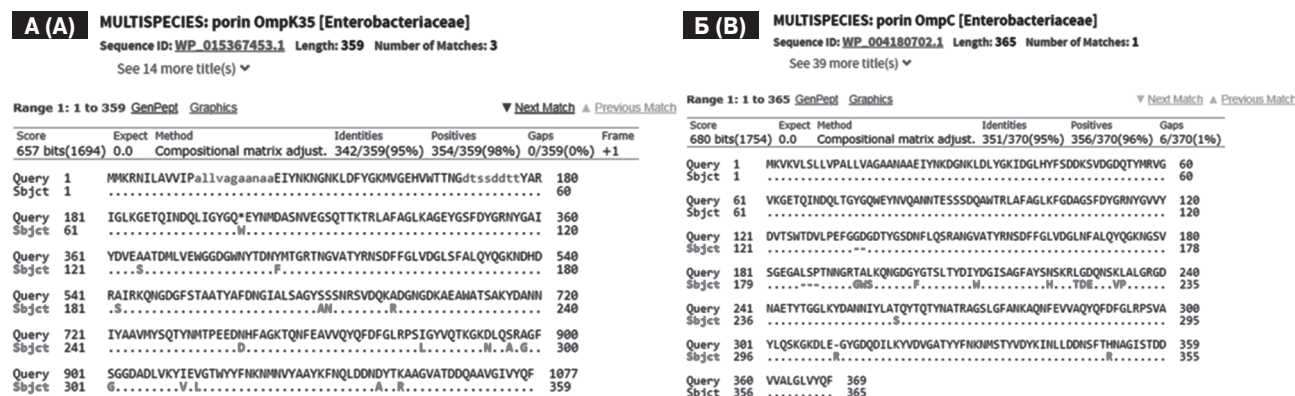


Рисунок 1. Сравнительный анализ транслированных последовательностей генов *ompK35* (A) и *ompK36* (B) штамма *K. pneumoniae* KP254 и референсных аминокислотных последовательностей белков OmpK35 и OmpK36 (OmpC)

Figure 1. Comparative analysis of the *ompK35* (A) and *ompK36* (B) gene translated sequences from *K. pneumoniae* KP254 strain and the OmpK35 and OmpK36 (OmpC) reference amino acid sequences

(<https://cge.cbs.dtu.dk/services>). Web-сервисы ISfinder [36] и INTEGRALL [29] использовали для поиска и характеристики мобильных элементов, связанных с детерминантами антибиотикорезистентности.

Филогенетический анализ проводили с помощью web-сервиса REALPHY [3], построение дендрограмм осуществляли в программе MEGA (версия 7.0.21), используя алгоритм ближайшего соседа (Neighbor-Joining) с бутстреп-поддержкой (1000 повторов).

Результаты

В результате сборки коротких чтений получено 103 контига (номера депонирования GenBank MRYL02000001–MRYL02000103). Характеристика общей структуры генома *K. pneumoniae* KP254 дана в ранее опубликованном материале [1]. Согласно результатам типирования, штамм *K. pneumoniae* KP254 относится к сиквенс-типу 23 и капсульному типу 57. В соответствии с полученными данными, штамм KP254 был отнесен к клональной группе (CG) 23, принадлежащей эволюционной ветке *hvK. pneumoniae*. Согласно результатам аннотирования, в структуре хромосомы исследуемого штамма из детерминант патогенности выявлены гены, кодирующие фимбрии 1-го и 3-го типов и йерсиниобактин. Гены системы утилизации аллантаина, сальмохелина, интегративного и конъюгативного элемента ICEKp, островка патогенности KPNP1208 выявлены не были. В хромосомной нуклеотидной последовательности обнаружены гены *bla*_{SHV-1} и *fosA*, кодирующие устойчивость к β-лактамам и фосфомицину соответственно, а также детерминанты эффлюксных помп *OqxAB*, *AcrAB-TolC*, *AcrZ*, *CusA/CzcA* (семейство Resistance-Nodulation-Division — RND) [25,

66, 35, 44], MdtM, Bcr/CflA (семейство Major Facilitator Superfamily — MFS) [18, 30], QacE, KpnEF (семейство Small Multidrug Resistance — SMR) [22, 37], MacAB-TolC (семейство ATP-Binding Cassette — ABC) [26]. Изучение транслированных последовательностей генов мажорных пориновых белков OmpK35 и OmpK36 позволило выявить наличие стоп-кодона в последовательности белка OmpK35 и замен, вставок и делеций в структуре OmpK36 относительно референсных последовательностей WP_004141771.1 и WP_004180702.1 [41] (рис. 1A и 1B соответственно).

Филогенетический анализ генома показал наибольшее родство *K. pneumoniae* KP254 со штаммом *Kp-Goe-154414* (номер GenBank CP018337.1), выделенным из инфицированной раны мужчины в Германии в 2014 году и принадлежащим также сиквенс-типу 23 и капсульному типу K57 (рис. 2).

По данным типирования *in silico*, в структуре мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254 обнаружены репликоны плазмид IncFII, IncFIA_{III}/FII_K, Col₄₄₀₁, Col_{pvc}, IncFIB_K и IncFII_{pCRY}. С использованием сервиса BLASTN отобраны контиги, потенциально принадлежащие мобильным элементам, которые в дальнейшем были объединены в предполагаемые плазмиды относительно референсных последовательностей. В таблице приведены результаты анализа структуры мобилома штамма KP254 *in silico*, который представлен, предположительно, шестью плазмидами, из которых одна является плазмидой вирулентности (IncFIB_K) и две — плазмидами резистентности (IncFII_{pCRY}, IncFII).

Плазмида вирулентности IncFIB_K имеет длину около 188 тыс. п.н., покрытие ее нуклеотидной последовательности относительно последовательностей плазмид pK2044 и pLVPK

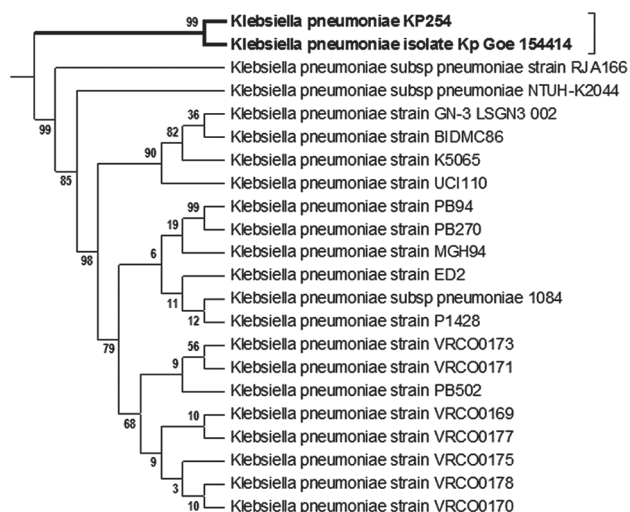


Рисунок 2. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности хромосомы штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделен жирным)

Figure 2. Phylogenetic analysis of the strain *K. pneumoniae* KP254 chromosome nucleotide sequence (highlighted in bold)

составляет 93 и 91% соответственно, с уровнем идентичности более 99%. При аннотировании последовательностей контигов обнаружен кластер генов аэробактина (*iucABCD iutA*) и гены устойчивости к ионам тяжелых металлов (*pbrABCR, pcoBCDERS, silCE, terDX*). Также в структуре одного контига (номер GenBank MRYL02000014.1) выявлен ген регулятора мукоидного фенотипа клебсиелл *rmpA2*, алельный вариант 17 (согласно базе данных *Klebsiella* Sequence Typing). При этом у плазмиды исследуемого штамма дилетированными оказались области, содержащие гены регулятора гипермукоидного фенотипа *rmpA* и сальмохелина.

Филогенетический анализ показал, что нуклеотидная последовательность плазмиды IncFIB_K исследуемого штамма является наиболее близкородственной плазмиде pL22-1 (CP031258.1) гипервирулентного штамма *K. quasipneumoniae* L22, выделенного от больного пневмонией в 2014 г. в Китае (рис. 3).

В структуре мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлен контиг, содержащий реплика-

Таблица. Характеристика мобилома штамма *K. pneumoniae* KP254

Table. Characterization of the strain *K. pneumoniae* KP254 mobilome

Репликоны плазмид (% идентичности относительно референса) Plasmid replicons (% identity relative to reference)	Номера референс-геномов плазмид в GenBank GenBank accession number of reference plasmid genome	Номера контигов в GenBank GenBank accession number of contigs	Гены антибиотико-резистентности Antibiotic resistance determinants	Гены патогенности Pathogenicity determinants
IncFII (100)	CP018343.1	MRYL02000035.1, MRYL02000046.1, MRYL02000053.1, MRYL02000055.1, MRYL02000058.1, MRYL02000061.1, MRYL02000072.1, MRYL02000075.1, MRYL02000076.1, MRYL02000090.1, MRYL02000096.1	<i>bla</i> _{OXA-11} , <i>bla</i> _{CTX-M-55} , <i>aac</i> (3')-IIa, <i>ΔcatB4</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr	Не выявлено Not found
IncFIA _{III} (97,16)/ FIIK (98,65)	CP018340.1	MRYL02000026.1, MRYL02000045.1, MRYL02000056.1, MRYL02000082.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found
IncFII _{pCRY} (81,32)	CP018341.1	MRYL02000023.1, MRYL02000047.1, MRYL02000066.1	<i>bla</i> _{LAP-2} , <i>tet</i> (A), <i>qnrS1</i> , <i>sul2</i> , <i>catA2</i>	Не выявлено Not found
IncFIB _K (91,25)	CP018338.1	MRYL02000014.1, MRYL02000036.1, MRYL02000038.1, MRYL02000048.1, MRYL02000052.1, MRYL02000054.1, MRYL02000068.1, MRYL02000071.1, MRYL02000088.1, MRYL02000089.1	Не выявлено Not found	<i>rmpA2</i> , <i>iucABCD, iutA</i> , <i>pbrABCR</i> , <i>pcoBCDERS</i> , <i>silCE, terDX</i>
Col ₄₄₀₁ (92,11)	CP003995.1	MRYL02000051.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found
Col _{pVC} (88,95)	-	MRYL02000063.1	Не выявлено Not found	Не выявлено Not found

ны IncFIA_{HTI}/FIIK. Согласно результатам отбора контигов относительно референса (номер GenBank CP018340.1), длина предполагаемой плазмиды составила около 80 тыс. п.н. В структуре контигов определены гены, ответственные за конъюгативный транспорт. Известных детерминант резистентности и патогенности выявлено не было.

Мобилом штамма *KP254* представлен, вероятно, двумя плазмидами резистентности: IncFII и IncFII_{PCRY}-подобной. В предполагаемой плазмиде размером 59 160 п.н., содержащей репликон IncFII, находится ген CTX-M-55-цефалоспорины (контиг MRYL02000053.1). Согласно схеме типирования, предложенной Villa L. и соавт. [42], FАВ-формула данной плазмиды — F2:A:B-. В генетическое окружение гена *bla*_{CTX-M-55} входит укороченная последовательность транспозона Tn3 длиной 2246 п.н., ген металлопротеина семейства WbuC, перед геном *bla*_{CTX-M-55} на расстоянии 48 п.н. расположен остаток инсерционного элемента Δ ISEcp1 (длина 267 п.н.), вся структура фланкирована укороченными инсерционными последовательностями Δ IS26. Предположительно, в структуру плазмиды IncFII входят также сцепленные гены Δ catB4, *bla*_{OXA-1}, *aac*(6')-Ib-cr (контиг MRYL02000061.1), окруженные остатками генов транспозаз семейства IS6, и ген *aac*(3')-IIa (контиг MRYL02000058.1), связанный с неполными последовательностями транспозаз семейств IS3 и IS6. В структуре контигов, объединенных в предполагаемую плазмиду, присутствуют гены, ответственные за конъюгативный перенос. Согласно базе данных GenBank, ген *bla*_{CTX-M-55} присутствует у 641 депонированного штамма энтеробактерий, однако полногеномные последовательности плазмид IncFII генотипа F2:A:B-, содержащих данный ген, представлены очень ограниченным числом, большинство последовательностей находится в виде коротких контигов. В связи с этим, на данный момент проведение филогенетического анализа оказалось невозможным.

Вторая предполагаемая плазмиды резистентности длиной около 80 тыс. п.н. несет IncFII_{PCRY}-подобный репликон. В ее структуре обнаружена детерминанта β -лактамазы LAP-2 (контиг MRYL02000023.1), на одной последовательности с геном *bla*_{LAP-2} расположены гены детерминант, ответственных за устойчивость к хинолонам (*qnrS1*) и тетрациклину (*tetA*). Анализ генетического окружения *bla*_{LAP-2} показал, что перед генами *qnrS1* и *bla*_{LAP-2} находится инсерционная последовательность ISKpn19, расстояние между генами составляет 1597 п.н., и здесь располагается инсерционная последовательность Δ ISEcl2 семейства IS3 длиной 1154 п.н. (является псевдогеном за счет наличия стоп-кодона),

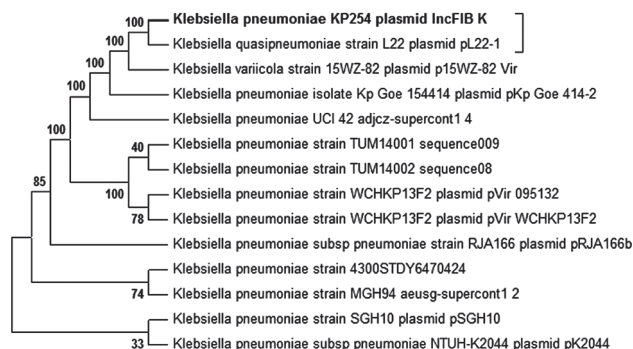


Рисунок 3. Дендрограмма нуклеотидной последовательности плазмиды вирулентности IncFIB_K штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделено жирным) относительно последовательностей плазмид вирулентности, депонированных в GenBank

Figure 3. Dendrogram of the IncFIB_K virulence plasmid nucleotide sequence of *K. pneumoniae* KP254 strain (highlighted in bold) relative to the virulence plasmid sequences deposited in GenBank

а после — неполная последовательность транспозазы семейства TnAs1. В структуру данной плазмиды были объединены также контиги, несущие гены устойчивости к хлорамфениколу (*catA2*) и сульфаниламидам (*sul2*), которые также окружены мобильными элементами. В частности, ген *sul2* расположен между инсерционными элементами ISVsa3 (семейство IS91) и IS5075 (семейство IS110) (контиг MRYL02000047.1), а концы короткого контига, содержащего ген *catA2*, представляют собой остатки транспозаз семейства IS6 (контиг MRYL02000066.1). В структуре плазмиды также присутствуют контиги, содержащие гены конъюгативного транспорта. Поиск гомологичных последовательностей с помощью сервиса BLASTN позволил установить ши-



Рисунок 4. Филогенетический анализ нуклеотидной последовательности плазмиды IncFII_{PCRY} штамма *K. pneumoniae* KP254 (выделено жирным) относительно последовательностей плазмид, депонированных в GenBank

Figure 4. Dendrogram of the IncFII_{PCRY} plasmid nucleotide sequence of *K. pneumoniae* KP254 strain (highlighted in bold) relative to the sequences of plasmids deposited in GenBank

рокое распространение IncFII_{PCRY}-подобных плазмид, несущих ген *bla*_{LAP}, среди штаммов клебсиелл. Филогенетический анализ выявил высокий уровень родства последовательностей предполагаемой IncFII_{PCRY}-подобной плазмиды исследуемого штамма с последовательностями плазмиды *pKp-Goe-414-4* (номер GenBank CP018337.1) (рис. 4).

Репликон *Col*₄₄₀₁ выявлен в структуре контига MRYL02000051.1, в котором, согласно результатам аннотирования, имеется ряд гипотетических белков, детерминанты патогенности или резистентности не обнаружены. В результате поиска относительно базы данных RefSeq высокоомологичные последовательности (идентичность выше 94%) выявлены у более 100 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в различных регионах мира.

Контиг MRYL02000063.1, содержащий *Col*_{psc}-подобный репликон, имеет уровень идентичности более 99% с полногеномными последовательностями коротких плазмид, обнаруженных в штаммах *Escherichia coli* и *K. pneumoniae*, а также с последовательностями штаммов клебсиелл, депонированных в виде контигов.

Обсуждение

Полученная молекулярно-генетическая характеристика исследуемого штамма показывает, что исследуемый штамм хотя и относится к эволюционной ветке высоковирулентных *K. pneumoniae*, однако не обладает полным набором соответствующих детерминант. Наличие генов, кодирующих фимбрии и йерсиниобактин, является общим для обеих эволюционных линий *K. pneumoniae* [34, 35, 38], а отсутствие дополнительных факторов патогенности (сальмохелина, системы утилизации аллантаина, гена *rpmA* и др.) может, на первый взгляд, свидетельствовать о невысоком патогенетическом потенциале исследуемого штамма. Этот вывод согласуется, например, с данными исследований, проведенных Lev A.I. и соавт. [24] на мышинных моделях, в которых было показано, что 2 штамма клебсиелл ST23^{K57} являлись авирулентными. Однако результаты других исследований свидетельствуют о том, что потеря сальмохелина и гена регулятора мукоидного фенотипа *rpmA* не приводит к значительному снижению вирулентности [16], а исследования Russo T.A. и соавт. [33] выявили наибольшую значимость продукции аэробактина для проявления вирулентных свойств. На основании всех этих данных был сделан вывод, что наличие только генов аэробактина и белка *RpmA2* является достаточным для формирования гипервирулентного фенотипа [33, 35]. Можно также сделать предположение, что отсутствие дополнительных фак-

торов связано с местом выделения штамма. Так, по данным литературы, наличие ICEKp было выявлено у всех штаммов, ассоциированных с первичным гнойным абсцессом печени [27]. Штаммы, колонизирующие кишечный тракт и слизистую оболочку, обладали генами утилизации аллантаина (кластер генов *all*), продукции капсульного полисахарида (*kvgAS*) и системы поглощения железа (*kfuABC*) [20, 28, 35]; для штаммов, ассоциированных с пневмонией, важным фактором является наличие гена *peg-344* [6, 35]. Интересным представляется результат филогенетического анализа, в котором последовательность генома исследуемого штамма кластеризуется с последовательностью штамма *K. pneumoniae*, также выделенного с поверхности инфицированной раны и обладающего тем же набором хромосомных детерминант патогенности и антибиотикорезистентности.

Наличие МЛУ у штаммов клебсиелл, относящихся к эволюционной линии *hvK. pneumoniae*, теперь уже не вызывает удивления. Первые сообщения об обнаружении таких штаммов в Китае датируются 2014 годом, затем аналогичные штаммы стали регистрироваться в различных странах мира. Изучение структуры резистома показало, что антибиотикоустойчивость исследуемого штамма реализуется, в первую очередь, за счет приобретения генетических детерминант, находящихся предположительно на двух конъюгативных плаزمиде IncFII и IncFII_{PCRY}. В структуре предполагаемой плазмиды IncFII выявлены четыре детерминанты резистентности — по две к аминогликозидам/фторхинолонам и бета-лактамам (ОХА-1, СТХ-М-55) (табл.). Известно, что плазмиды IncFII в наибольшей степени участвуют в распространении генов *bla*_{СТХ-М} [42, 47]: в частности, плазмиды генотипа F2:A-:B- являются одними из основных носителей генов СТХ-М-9 и СТХ-М-15 цефалоспоринов [9, 13]. Что касается детерминанты СТХ-М-55-цефалоспоринолазы, то, согласно литературным данным, она чаще регистрируется в структуре плазмид IncFII генотипа F33:A-:B-[13], IncI, IncN, IncX [31, 43]. Детерминанта бета-лактамазы расширенного спектра СТХ-М-55-цефалоспоринолазы в настоящее время не является эпидемически распространенной на территории РФ [14], однако на территории Китая находится в лидерах по распространенности [19]. Впервые ген был выявлен на территории Таиланда в 2005 г., аминокислотная последовательность СТХ-М-55 имеет единственную замену Ala-80-Val относительно эпидемически распространенной СТХ-М-15, которая обуславливает повышенную устойчивость к цефтазидиму [21]. Структурная организация генетического окружения гена *bla*_{СТХ-М-55} штамма *K. pneumoniae* KP254 является наибо-

лее распространенной и относится к типу I, согласно классификации Ну X. и соавт. [19]. Одновременное присутствие в структуре одной плазмиды генов *bla*_{ОХА-1}, *bla*_{СТХ-М}, *aac*(3')-IIa, *ΔcatB4*, *aac*(6')-Ib-cr широко распространено среди представителей энтеробактерий.

Интересным представляется наличие в структуре предполагаемой IncFII_{PCRY}-подобной плазмиды детерминанты бета-лактамазы LAP-2, относящейся к классу А бета-лактамаз и являющейся аналогом TEM-1 [32] — ранее об обнаружении данной детерминанты среди российских изолятов клебсиелл не сообщалось. В соответствии с данными на апрель 2020 г. в GenBank депонировано всего 634 штамма бактерий, несущих ген *bla*_{LAP-2}. Первые описания генетического окружения были сделаны для аллельного варианта *bla*_{LAP-1}, выявленного в штамме *Enterobacter cloacae* [32]. При сравнительном анализе структуры генетического окружения гена *bla*_{LAP-2} штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлено значительное его сходство с описанным ранее Poigel L и соавт. [32] для штамма *E. cloacae*, где ген также ассоциирован с детерминантой белка *QrnS1*, находящейся на расстоянии в 1597 п.н. В исследовании Poigel L и соавт. показано, что между генами находится последовательность *ISEc12* длиной 1282 п.н. В случае с *K. pneumoniae* KP254 эта последовательность короче и имеет большое количество мутаций, которые привели к формированию стоп-кодонов. Отметим, что участок нуклеотидной последовательности всей мобильной единицы, включающей *bla*_{LAP-2} и *QrnS1*, штамма KP254 имеет 100%-ное сходство с соответствующими участками, присутствующими в 12 полногеномных последовательностях плазмид штаммов *K. pneumoniae* и одной — *Salmonella enterica*, а также 81 последовательности *K. pneumoniae*, депонированных в виде контигов. Филогенетический анализ, который включал исследование полногеномных последовательностей плазмид IncFII_{PCRY} и последовательностей контигов, показал, что предполагаемая IncFII_{PCRY}-подобная плаزمида штамма *K. pneumoniae* KP254 имеет наибольшее родство с последовательностью плазмиды *pKp-Goe-414-4*.

Установлено, что исследуемый штамм обладает устойчивостью к бета-лактамам антибиотикам, включая карбапенемы (Дорипенем, Имипенем, Меропенем, Эртапенем) [1], однако в структуре резистома гены карбапенемаз отсутствуют. Известно, что проявление устойчивости к карбапенемам коррелирует с функционированием мажорных пориновых белков OmpK35 и OmpK36 [39, 41], в частности, по данным Tsai Y.-K. и соавт. [41], наличие мутаций в последовательностях обоих белков в несколько раз увеличивает значения минимальных

ингибирующих концентраций меропенема и цефепима. У штамма *K. pneumoniae* KP254 выявлено наличие стоп-кодона в последовательности гена *ompK35*, что приводит к отсутствию его экспрессии, аминокислотная структура OmpK36 также имеет значительные отличия от референсной. Таким образом, можно сделать предположение, что измененная структура обоих пориновых белков является одним из факторов, обуславливающих устойчивость к карбапенемам.

Другим механизмом, участвующим в проявлении МЛУ, является активация эффлюксных транспортных систем в ответ на воздействие лекарственного вещества [26]. В структуре генома *K. pneumoniae* KP254 обнаружено несколько типов транспортных систем, активность которых может оказывать синергетический эффект, формируя устойчивость в том числе и к карбапенемам. Наибольшую значимость имеют белки семейства RND — AcrA и AcrB, — которые формируют трехкомпонентный комплекс AcrAB-TolC, обладающий широкой субстратной специфичностью [26, 44]. В структуре генома был выявлен ген, кодирующий короткий белок AcrZ, который образует комплекс с AcrAB-TolC через AcrB, способствуя распознаванию и экспорту дополнительных субстратов, в частности тетрациклина, пурамицина и хлорамфеникола [17]. Геном штамма содержит и другие помпы семейства RND: OqxAB (транспорт хинолонов, фторхинолонов и хлорамфеникола) [25], CusA/CzcA (эффлюкс ионов кобальта, цинка, кадмия) [7]. Согласно литературным данным, в удалении карбапенемов может участвовать система KpnEF семейства SMR, осуществляющая транспорт широкого спектра антибактериальных препаратов и участвующая в капсулообразовании [37]. К семейству SMR относится также белок QacE, обеспечивающий выведение четвертичных аммонийных соединений [22]. Представители семейства MFS не являются доминирующими в формировании МЛУ, наибольшее клиническое значение имеет синглетная транспортная система TetA, определяющая устойчивость к тетрациклинам [26]. К другим представителями этого семейства, присутствующим в структуре генома *K. pneumoniae* KP254, относится транспортный белок MdtM, участвующий в выведении четвертичных аммонийных соединений [18], система Vcr/CflA, функция которой у клебсиелл не определена, но на примере *Proteus mirabilis* показано, что она ответственна за устойчивость к фосфомицину и необходима для формирования биопленки [30]. Семейство ABC-транспортёров у штамма *K. pneumoniae* KP254 представлено только генами белков MacAB, которые при образовании комплекса MacAB-TolC обеспечивают эффлюкс макролидов [26].

Таким образом, на основании проведенного исследования можно сделать заключение, что у штаммов, относящихся к эволюционной линии, включающей *hvK. pneumoniae*, при приобретении фенотипа МЛУ могут отсутствовать гены, определяющие формирование дополнительных вирулентных свойств. Аналогичный вывод был сделан Russo T.A. и соавт. [33]. Однако, с другой стороны, отсутствие некоторых факторов патогенности может быть связано с местом локализации исследуемого штамма. Формирование МЛУ штаммом *K. pneumoniae* KP254 определяется в первую очередь приобретением соответ-

ствующих детерминант резистентности, находящихся на конъюгативных плазидах. В то же время устойчивость к карбапенемам, при отсутствии генов карбапенемаз, связана с наличием альтернативных механизмов, в частности с изменением структуры пориновых белков и функционированием систем эффлюксных насосов, обладающих широкой субстратной специфичностью. Полученные нами сведения в целом способствуют расширению знаний о штаммах *K. pneumoniae*, относящихся к эволюционной ветке, объединяющей штаммы с высоковирулентными свойствами.

Список литературы/References

1. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А., Гординская Н.А. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 11. С. 699–704. [Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Solntsev L.A., Gordinskaya N.A. The molecular typing of clinical isolates *Klebsiella pneumoniae* producing beta-lactamases of extended specter of action. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 11, pp. 699–704. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704
2. Комисарова Е.В., Воложанцев Н.В. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* — новая инфекционная угроза // Инфекционные болезни. 2019. Т. 17, № 3. С. 81–89. [Komisarova E.V., Volozhantsev N.V. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new infectious threat. *Infeksionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2017, vol. 17, no. 3, pp. 81–89. (In Russ.)] doi: 10.20953/1729-9225-2019-3-81-89
3. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.*, 2014, vol. 31, no. 5, pp. 1077–1088. doi: 10.1093/molbev/msu088
4. Bhagirath A.Y., Li Y., Patidar R., Yerex K., Ma X., Kumar A., Duan K. Two component regulatory systems and antibiotic resistance in gram-negative pathogens. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 7: 1781. doi: 10.3390/ijms20071781
5. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A., Garin B., Le Hello S., Arlet G., Nicolas-Chanoine M.-H., Decré D., Brisse S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1812–1820. doi: 10.3201/eid2011.140206
6. Bulger J., MacDonald U., Olson R., Beanan J., Russo T.A. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge. *Infect. Immun.*, 2017, vol. 85, no. 10: e00093-17. doi: 10.1128/IAI.00093-17
7. Cabral L., Júnior G.V.L., Pereira de Sousa S.T., Dias A.C.F., Lira Cadete L., Andreote F.D., Hess M., de Oliveira V.M. Anthropogenic impact on mangrove sediments triggers differential responses in the heavy metals and antibiotic resistomes of microbial communities. *Environ. Pollut.*, 2016, vol. 216, pp. 460–469. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.078
8. Carattoli A., Hasman H. PlasmidFinder and in silico pMLST: identification and typing of plasmid replicons in whole-genome sequencing (WGS). *Methods Mol. Biol.*, 2020, vol. 2075, pp. 285–294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20
9. Chen X., He L., Li Y., Zeng Z., Deng Y., Liu Y., Liu J.-H. Complete sequence of a F2:A-B- plasmid pHN3A11 carrying *rmtB* and *qepA*, and its dissemination in China. *Vet. Microbiol.*, 2014, vol. 174, no. 1–2, pp. 267–271. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.08.023
10. 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*. *Gene*, 2004, vol. 337, pp. 189–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.008
11. Cheong H.S., Chung D.R., Park M., Kim S.H., Ko K.S., Ha Y.E., Kang C.I., Peck K.R., Song J.H. Emergence of an extended-spectrum β -lactamase-producing serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strain from Asian countries. *Epidemiol. Infect.*, 2017, vol. 145, no. 5, pp. 990–994. doi: 10.1017/S0950268816003113
12. Chou H.C., Lee C.Z., Ma L.C., Fang C.T., Chang S.C., Wang J.T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 7, pp. 3783–3792. doi: 10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004
13. Deng Y., He L., Chen S., Zheng H., Zeng Z., Liu Y., Sun Y., Ma J., Chen Z., Liu J.H. F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of *rmtB*-*bla*CTX-M-9 group genes and *rmtB*-*qepA* in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 10, pp. 4926–4929. doi: 10.1128/AAC.00133-11
14. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I., Edelstein I., Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, no. 12, pp. 3724–3732. doi: 10.1128/aac.47.12.3724-3732.2003
15. Fang C.T., Chuang Y.P., Shun C.T., Chang S.C., Wang J.T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J. Exp. Med.*, 2004, vol. 199, no. 5, pp. 697–705. doi: 10.1084/jem.20030857
16. Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L., Chan E.W., Shu L., Yu J., Zhang R., Chen S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.*, 2017, vol. 18, no. 1, pp. 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9
17. Hobbs E.C., Yin X., Paul B.J., Astarita J.L., Storz G. Conserved small protein associates with the multidrug efflux pump AcrB and differentially affects antibiotic resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 41, pp. 16696–16701. doi: 10.1073/pnas.1210093109

18. Holdsworth S.R., Law C.J. The major facilitator superfamily transporter MdtM contributes to the intrinsic resistance of *Escherichia coli* to quaternary ammonium compounds. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2013, vol. 68, no. 4, pp. 831–839. doi: 10.1093/jac/dks491
19. Hu X., Gou J., Guo X., Cao Z., Li Y., Jiao H., He X., Ren Y., Tian F. Genetic contexts related to the diffusion of plasmid-mediated CTX-M-55 extended-spectrum beta-lactamase isolated from Enterobacteriaceae in China. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 2018, vol. 17, no. 1. doi: 10.1186/s12941-018-0265-x
20. Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., Fresno S., Tomás J.M., Regué M. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.*, 2003, vol. 185, no. 24, pp. 7213–7221. doi: 10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003
21. Kiratisin P., Apisarnthanarak A., Saifon P., Laesripa C., Kitphati R., Mundy L.M. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2007, vol. 58, no. 3, pp. 349–355. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.02.005
22. Kücken D., Feucht H., Kaulfers P. Association of qacE and qacEDelta1 with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000, vol. 183, iss. 1, pp. 95–98. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08939.x
23. Lai Y.C., Lin A.C., Chiang M.K., Dai Y.H., Hsu C.C., Lu M.C., Liu C.Y., Chen Y.T. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 5: e96292. doi: 10.1371/journal.pone.0096292
24. Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V., Ershova O.N., Alexandrova I.A., Malikov V.E., Bogun A.G., Borzilov A.I., Volozhantsev N.V., Svetoch E.A., Fursova N.K. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog. Glob. Health*, 2018, vol. 112, no. 3, pp. 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949
25. Li J., Zhang H., Ning J., Sajid A., Cheng G., Yuan Z., Hao H. The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.*, 2019, vol. 8, no. 44. doi: 10.1186/s13756-019-0489-3
26. Li X.-Z., Plésiat P., Nikaido H. The challenge of efflux mediated antibiotic resistance in gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2015, vol. 28, no. 2, pp. 337–418. doi: 10.1128/CMR.00117-14
27. Lin T.L., Lee C.Z., Hsieh P.F., Tsai S.F., Wang J.T. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol.*, 2008, vol. 190, no. 2, pp. 515–526. doi: 10.1128/JB.01219-07
28. 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, vol. 192, no. 1, pp. 117–128. doi: 10.1086/430619
29. Moura A., Soares M., Pereira C., Leitão N., Henriques I., Correia A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, 2009, vol. 25, no. 8, pp. 1096–1098. doi: 10.1093/bioinformatics/btp105
30. Nzakizwanayo J., Scavone P., Jamshidi S., Hawthorne J.A., Pelling H., Dedi C., Salvage J.P., Hind C.K., Guppy F.M., Barnes L.M., Patel B.A., Rahman K.M., Sutton M.J., Jones B.V. Fluoxetine and thioridazine inhibit efflux and attenuate crystal-line biofilm formation by *Proteus mirabilis*. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7: 12222. doi: 10.1038/s41598-017-12445-w
31. Pan Y.S., Liu J.H., Hu H., Zhao J.F., Yuan L., Wu H., Wang L.F., Hu G.Z. Novel arrangement of the blaCTX-M-55 gene in an *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA methylase. *J. Basic. Microbiol.*, 2013, vol. 53, no. 11, pp. 928–933. doi: 10.1002/jobm.201200318
32. Poirel L., Cattoir V., Soares A., Soussy C.J., Nordmann P. Novel Ambler class A beta-lactamase LAP-1 and its association with the plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrS1. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, vol. 51, no. 2, pp. 631–637. doi: 10.1128/AAC.01082-06
33. Russo T.A., Olson R., Fang C.-T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U., Hutson A., Barker J.H., La Hoz R.M., Johnson J.R. for the Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Investigator Group (HVKPIG). Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56 (9): e00776-18. doi: 10.1128/JCM.00776-18
34. Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., Gulick A.M. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.*, 2014, vol. 82, no. 6, pp. 2356–2367. doi: 10.1128/IAI.01667-13
35. Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2019, vol. 32 (3): e00001-19. doi: 10.1128/CMR.00001-19
36. Siguier P., Perochon J., Lestrade L., Mahillon J., Chandler M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 34, pp. D32–D36. doi: 10.1093/nar/gkj014
37. Srinivasan V.B., Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, vol. 57, no. 9, pp. 4449–4462. doi: 10.1128/AAC.02284-12
38. Struve C., Roe C.C., Stegger M., Stahlhut S.G., Hansen D.S., Engelthaler D.M., Andersen P.S., Driebe E.M., Keim P., Krogfelt K.A. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*, 2015, vol. 6 (4): e00630-15. doi: 10.1128/mBio.00630-15
39. Sugawara E., Kojima S., Nikaido H. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β -lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC. *J. Bacteriol.*, 2016, vol. 198, no. 23, pp. 3200–3208. doi: 10.1128/JB.00590-16
40. Surgers L., Boyd A., Girard P.M., Arlet G., Decré D. ESBL-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2016, vol. 22, no. 9, pp. 1687–1688. doi: 10.3201/eid2209.160681
41. Tsai Y.-K., Fung C.-P., Lin J.-C., Chen J.-H., Chang F.-Y., Chen T.-L., Siu L.K. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2011, vol. 55, no. 4, pp. 1485–1493. doi: 10.1128/AAC.01275-10

42. Villa L., García-Fernández A., Fortini D., Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2010, vol. 65, no. 12, pp. 2518–2529. doi: 10.1093/jac/dkq347
43. Wang L., Fang H., Feng J., Yin Z., Xie X., Zhu X., Wang J., Chen W., Yang R., Du H., Zhou D. Complete sequences of KPC-2-encoding plasmid p628-KPC and CTX-M-55-encoding p628-CTXM coexisted in *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.*, 2015, 6: 838. doi: 10.3389/fmicb.2015.00838
44. Weston N., Sharma P., Ricci V., Piddock L.J.V. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. *Res. Microbiol.*, 2018, vol. 169, no. 7–8, pp. 425–431. doi: 10.1016/j.resmic.2017.10.005
45. Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C., Fung C.P., Chen H.J., Liu Y.M., Wang J.T., Fang C.T., Chang S.C., Shu H.Y., Liu T.T., Chen Y.T., Shiau Y.R., Lauderdale T.L., Su I.J., Kirby R., Tsai S.F. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.*, 2009, vol. 191, no. 14, pp. 4492–4501. doi: 10.1128/JB.00315-09
46. Yuan Y., Li Y., Wang G., Li C., Chang Y.F., Chen W., Nian S., Mao Y., Zhang J., Zhong F., Zhang L. BlaNDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 2019, vol. 8: 140. doi: 10.1186/s13756-019-0596-1
47. Zhao W.H., Hu Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.*, 2013, vol. 39, no. 1, pp. 79–101. doi: 10.3109/1040841X.2012.691460

Авторы:

Алексеева А.Е., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Бруснигина Н.Ф., к.м.н., доцент, зав. лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия;

Гординская Н.А., д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Alekseeva A.E., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Brusnigina N.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Gordinskaya N.A., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of Pathogens, Blokhina I.N. Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation.

Поступила в редакцию 06.05.2020
Принята к печати 04.07.2020

Received 06.05.2020
Accepted 04.07.2020