

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ
ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ В 2021-
2023 ГГ.**

Рыкова В. А. ¹,

Подладчикова О. Н. ¹,

Анисимова А. С. ¹,

Аронова Н. В. ¹,

Водопьянов А. С. ¹,

Темякова С. Ю. ¹,

Гудуева Е. Н. ¹

¹ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г.
Ростов-на-Дону, Россия.

PHENOTYPIC AND GENETIC ANALYSIS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA PATIENTS IN ROSTOV-ON-DON IN 2021-2023.

Rykova V. A. ^a,

Podladchikova O. N. ^a,

Anisimova A. S. ^a,

Aronova N. V. ^a,

Vodopyanov A. S. ^a,

Timyakova S. U. ^a,

Gudueva E. N. ^a

^a Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rosпотребнадзор,
Rostov-on-Don, Russia.

Резюме

Введение. В статье представлено исследование 33 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в Ростове-на-Дону в 2021-2023 гг. от пациентов с внебольничной пневмонией. Штаммы были проанализированы в соответствии с признаками, которые, как известно, связаны с гипервирулентностью. **Цель.** Проведено сравнение штаммов по фенотипическим (сидерофорная активность, гипермукоидность, чувствительность к бактериофагу) и генотипическим (плазмидный профиль, наличие генов сидерофоров и *rtxA* и *rtxA2*) свойствам. **Были использованы следующие методы:** определение чувствительности к бактериофагу, гипермукоидности с помощью “стринг-теста”, сидерофорной активности на среде, содержащей хромазуrol S, содержания плазмид и полногеномное секвенирование. **Результаты.** Секвенирование 11 штаммов, различающихся по мукоидности, показало, что все гипермукоидные штаммы содержали *rtxA*, в то время как *rtxA2* либо отсутствовал, либо содержал одиночные инсерции или делеции нуклеотидов, что приводило к сдвигу рамки считывания. Те же мутации в гене *rtxA2* наблюдались у немучоидных штаммов, у всех из которых отсутствовал *rtxA*. Штаммы отличались по набору из четырех сидерофорных кластеров, количество которых не коррелировало с сидерофорной активностью. Отсутствие у штаммов, не обладающих гипермукоидностью, *rtxA* и генов биосинтеза салмохелина при сохранении гена его рецептора указывает на наличие делеций, приводящих к потере гипермукоидности. Исследование 33 штаммов показало, что они способны диссоциировать, образуя колонии двух типов: темные и светлые, которые наблюдались как у гипермукоидных, так и у немучоидных штаммов. Темные клоны гипермукоидных штаммов это свойство сохраняли, в то время как светлые клоны его утрачивали. Оба варианта немучоидных штаммов сохраняли свойство немучоидности. Анализ разных 17 штаммов показал, что их темные клоны обладали сниженной сидерофорной активностью и чувствительностью к бактериофагу по

сравнению со светлыми. Геномы разных клонов не отличались по сидерофорным кластерам, но *rmpA* был обнаружен только в темных клонах гипермукоидных штаммов. У немучоидных штаммов этот ген отсутствовал в обоих клонах, в то время как различия в сидерофорной активности и чувствительности к бактериофагу сохранялись. **Заключение.** Гипермукоидность *K. pneumoniae* связана с наличием *rmpA*, в то время как *rmpA2* не является обязательным. Различия клонов по морфологии колоний, сидерофорной активности и чувствительности к бактериофагу не связаны с *rmpA/rmpA2*, а скорее обусловлены пока неизвестным механизмом.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, сидерофорная активность, плазмиды, гипермукоидный фенотип, фагочувствительность, полногеномное секвенирование.

Abstract

Introduction. Here, we paper present a study of 33 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Rostov-on-Don in 2021-2023 from patients with community-acquired pneumonia. The bacterial strains were analyzed according to the traits known to be linked to hypervirulence. **Aim.** The comparison of the strains by analyzing phenotypic (siderophore activity, hypermucoviscosity, bacteriophage sensitivity) and genotypic (presence of plasmids, siderophore genes, and *rmpA* and *rmpA2* genes) properties. **Methods** were used as follows: assessed bacteriophage sensitivity, hypermucoviscosity using a “string test”, siderophore activity on chrome azurol S-containing plates, high-molecular plasmid detection, and a whole-genome sequencing. **Results.** Sequencing of 11 strains differing in mucoviscosity allowed to establish that all hypermucoviscous strains contained the *rmpA* gene, whereas the *rmpA2* gene was either absent or contained single nucleotide insertions or deletions, leading to a reading frame shift. The same mutations in *rmpA2* were observed in non-mucoviscous strains, all of which lacked the *rmpA* gene. The strains differed by the presence of four siderophore clusters, the number of which did not correlate with the siderophore activity. The lack of *rmpA* and salmochelin biosynthesis but preserved its receptor gene in the non-mucoviscous strains suggest that they have deletions, leading to the loss of the hypermucoviscous phenotype. A study of 33 strains showed that they were able to dissociate, forming dark and light colonies, which were observed in both hypermucoviscous and non-hypermucoviscous strains. In dark but not light clones obtained from hypermucoviscous strains, this property was preserved. In contrast, both clone variants of non-hypermucoviscous strains retained this property. An analysis of different clones of 17 strains showed that dark vs. light clones had reduced siderophore activity and bacteriophage sensitivity. The clone genomes did not differ in the siderophore clusters, but *rmpA* was revealed only in the dark clones of hypermucoviscous strains. In non-mucoviscous strains, this gene was not found in both clones, whereas differences in siderophore activity and bacteriophage sensitivity were preserved. **Conclusion.** *K. pneumoniae*

hypermucoviscosity phenotype is associated with the presence of at least the *rmpA*, while intact *rmpA2* is not required. The differences in the colony morphology, clone siderophore activity, and bacteriophage sensitivity are not related to *rmpA* and *rmpA2*, but rather result from an unknown yet mechanism.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, siderophore activity, plasmids, hypermucoviscosity, phage sensitivity, whole-genome sequencing.

1 **1 Введение**

2 Бактерии *Klebsiella pneumoniae* широко распространены в окружающей
3 среде, а также являются компонентом нормофлоры человека. При этом *K.*
4 *pneumoniae* способна вызывать заболевания различной тяжести как у
5 иммунокомпрометированных, так и компетентных лиц. Штаммы *K.*
6 *pneumoniae* обладают широким спектром факторов патогенности и
7 множественной лекарственной устойчивостью и представляют значительную
8 опасность для здравоохранения. Поэтому вид *K. pneumoniae* включен в группу
9 ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*
10 *pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*
11 *sp.*) и является предметом детального изучения для разработки новых методов
12 диагностики и лечения больных [7].

13 Представители вида *K. pneumoniae* неоднородны по свойствам и в
14 настоящее время разделены на два патотипа штаммов: классические (*sKp*) и
15 гипервирулентные (*hvKp*) [8]. Глобально распространенные штаммы *sKp*
16 являются возбудителями нозокомиальных инфекций и часто демонстрируют
17 резистентность к антибиотикам. Штаммы *hvKp*, которые в мире появились
18 относительно недавно (в 1980-х годах), способны вызвать внебольничные
19 инфекции и изначально сохраняли чувствительность к большинству
20 антибиотиков. Однако в последнее время распространились штаммы, у
21 которых гипервирулентность и антибиотикорезистентность сосуществуют [1].
22 Это явление может формироваться за счет приобретения *hvKp* штаммами
23 плазмид с генами резистентности к антибиотикам, а также за счет
24 приобретения антибиотикорезистентными *sKp* штаммами плазмид, несущих
25 гены факторов вирулентности.

26 Факторы вирулентности *K. pneumoniae* можно разделить на две большие
27 группы. Одни факторы кодируются хромосомными генами и присутствуют у
28 всех представителей вида (К-и О-антигены, фимбрии, система секреции б
29 типа, сидерофор энтеробактин). К этой же группе относится и сидерофор

30 иерсиниабактин, гены биосинтеза и транспорта которого находятся в составе
31 конъюгативного интегративного элемента ICEKp, встраивающегося в
32 хромосому в сайтах аспарагиновой тРНК [28]. Установлено, что способность
33 продуцировать этот сидерофор, который встречается у отдельных штаммов
34 клебсиелл, важна для проявления ими патогенных свойств [19].

35 Другая группа факторов (повышенная продукция капсулы, синтез
36 дополнительных сидерофоров, таких как сальмохелин и аэробактин)
37 выявляется преимущественно у штаммов *hνKp*. Известно, что повышенная
38 продукция капсулы, как правило, приводит к гипермукоидности штаммов,
39 которая является одним из признаков, коррелирующих с
40 гипервирулентностью *K. pneumoniae*. Капсула кодируется хромосомными
41 генами (*cps*), которые активируются продуктами плазмидных генов *trpA* и
42 *trpA2*. Эти гены расположены на характерных для *hνKp*
43 высокомолекулярных плаزمидах [15], таких как PLVPK (224 т.п.н.) и pK2044
44 (219 т.п.н.). На этих же плазмидах находятся гены, кодирующие аэробактин и
45 сальмохелин [9, 18, 32]. Наличие у исследуемых штаммов вышеупомянутых
46 генов, которое указывает на присутствие в штаммах плазмид вирулентности,
47 предложено использовать в качестве генетических маркеров *hνKp* [25].

48 Из четырех продуцируемых клебсиеллами сидерофоров (энтеробактин,
49 иерсиниабактин, сальмохелин и аэробактин) наиболее важными для
50 проявления патогенных свойств являются аэробактин и сальмохелин.
51 Энтеробактин синтезируется всеми штаммами, однако его эффективность в
52 организме хозяина невысока, так как он инактивируется белком иммунной
53 системы липокалином-2. Устойчивый к липокалину иерсиниабактин
54 встречается как у *sKp*, так и у *hνKp*. Для последних особенно характерны два
55 других сидерофора – сальмохелин и аэробактин, которые также не
56 инактивируются липокалином-2. Наличие у штаммов *hνKp* дополнительных
57 генов, кодирующих биосинтез сидерофоров, предполагает наличие у них
58 способности продуцировать эти хелаторы железа в больших количествах. И

59 действительно, исследования разных штаммов клебсиелл показали, что *hνKp*
60 продуцируют в 8-10 раз больше сидерофоров, чем *сKp* штаммы [24, 25]. На
61 основе этих наблюдений авторы предложили количественный метод для
62 определения сидерофорной активности штаммов по росту на индикаторной
63 среде (CAS-агаре), который предлагали использовать для быстрой
64 дифференциации *hνKp* от *сKp*.

65 Гиперпродукция капсулы и сидерофоров способствует проявлению
66 *hνKp* высоко инвазивных свойств. Капсула способствует ускользанию
67 бактерий от действия иммунной системы хозяина, а продукция нескольких
68 типов сидерофоров обеспечивает доступ к разным источникам железа.
69 Помимо участия в ассимиляции железа, сидерофоры *K. pneumoniae*
70 повреждают ткани хозяина, индуцируют выработку цитокинов,
71 стабилизируют транскрипционный фактор HIF-1α и способствуют
72 диссеминации бактерий [13, 23].

73 Исходя из общепринятых представлений о взаимосвязи продукции
74 сидерофоров с другими свойствами, определяющими гипервирулентный
75 фенотип клебсиелл, мы попытались выявить эту связь у клинических штаммов
76 *K. pneumoniae*. **Цель работы:** Сравнительный анализ штаммов *K. pneumoniae*
77 по фенотипическим (сидерофорная активность, гипермукоидный фенотип и
78 чувствительность к клебсиеллезному бактериофагу) и генотипическим
79 (наличие автономных плазмидных репликаонов, генов сидерофорных
80 кластеров и регуляторов мукоидного фенотипа) свойствам.

81 2 Материалы и методы

82 **Штаммы, использованные в работе,** были выделены из мокроты
83 больных внебольничными пневмониями в лечебных учреждениях г. Ростова-
84 на-Дону в 2021-2023. В работе проанализированы 33 штамма *K. pneumoniae*.
85 Штаммы выращивали на мясо-пептонном агаре (МПА) при 37°C в течение 18-
86 24 часов. Видовую принадлежность выделенных культур подтверждали с
87 помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной

88 лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS). Масс-спектры,
89 полученные при использовании масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker
90 Daltonics (Германия), анализировали с помощью программного обеспечения
91 MALDI Biotyper и сравнивали с базой данных компании Bruker версии 3.1.66
92 (Bruker Daltonics, Германия). Образцы для масс-спектрометрии готовили в
93 соответствии с методическими указаниями [5, 6].

94 **Изучение спектра чувствительности** исследуемых штаммов к
95 коммерческому клебсиеллёзному поливалентному бактериофагу,
96 представляющему собой очищенный фильтрат фаголизатов бактерий
97 *K.pneumoniae* (сер. У05, НПО «Микроген», Россия), проводили методом
98 нанесения капли различных разведений (до 10^{-3}) бактериофага на посев
99 исследуемой культуры (10^8 КОЕ/мл), согласно Федеральным клиническим
100 рекомендациям «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и
101 противэпидемической практике» (Москва, 2022 г.).

102 **Гипермукоидный фенотип штаммов** определяли с помощью «стринг-
103 теста» [11] при использовании суточной культуры бактерий, выращенных на
104 коммерческом кровяном агаре с 5% бараньих эритроцитов (агар
105 колумбийский с содержанием бараньей крови, номер партии 1477, ООО
106 «Средофф», Россия). Тест считали положительным, если за петлей тянулся
107 слизистый тяж более 5 мм от поверхности агара.

108 **Выявление автономных плазмидных репликонов** проводили с
109 помощью анализа тотальной клеточной ДНК штаммов методом,
110 предложенным С.И. Kado and S.T. Liu [16]. Для этого культуры выращивали на
111 МПА при 37°C в течение 18-24 часов. Клетки суспендировали в лизис-буфере,
112 содержащем 50 мМ Трис-ОН (рН 12,45), 10 мМ ЭДТА и 3% SDS, и
113 выдерживали 30 мин при 65°C. После добавления смеси фенол:хлороформ
114 (1:1) водную фазу отделяли центрифугированием и подвергали электрофорезу
115 в 0,7%-ном агарозном геле при 50 мА в течение 2,5 часов. Гели окрашивали
116 бромидом этидия (Serva).

117 **Сидерофорную активность** использованных в работе штаммов *K.*
118 *pneumoniae* определяли на индикаторной среде [27], содержащей
119 хромогенный хелатор железа хромазуrol S (CAS). Этот реактив при 30%-ном
120 насыщении железом имеет сине-зеленую окраску, а после удаления из него
121 железа сидерофорами, выделяемыми в среду бактериями, CAS-реактив
122 окрашивается в желтый цвет. Перед посевом на индикаторную среду штаммы
123 клебсиелл выращивали при 37°C на МПА в течение 24 часов, культуры
124 суспендировали в стерильной дистиллированной воде до плотности
125 10⁹ м.к./мл. По 10 мкл суспензий бактерий наносили на CAS-агар в виде капли,
126 и посеы инкубировали при 37°C в течение 24 часов.

127 **Секвенирование** штаммов клебсиелл было проведено методом
128 высокопроизводительного секвенирования при использовании
129 технологической платформы MiSeq (Illumina, www.illumina.com).
130 Хромосомная ДНК для секвенирования была выделена с помощью набора для
131 выделения ДНК - «НК» (ДНК-технология, Москва, Россия) согласно
132 инструкции по применению набора. В реакции использовали 20 нг ДНК
133 каждого из исследованных штаммов. Библиотеки готовили с помощью
134 коммерческого набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) согласно
135 прилагаемой инструкции. Для секвенирования полученных библиотек
136 использовали набор картриджей MiSeq v.2 Reagents Kit 300 Cycles PE
137 (Illumina). Результаты секвенирования были представлены в виде набора
138 контигов, содержащих текстовые файлы двух типов (fasta и fastaQ). Геномы
139 анализировали с помощью авторской программы ContigSearcher [3],
140 позволяющей проводить поиск конкретных последовательностей ДНК в
141 контигах. Для поиска генов регуляторов мукоидного фенотипа использовали
142 последовательности *rtxA* и *rtxA2* из базы данных NCBI. Анализ генов,
143 отвечающих за продукцию клебсиеллами сидерофоров, проводили при
144 использовании компьютерной программы SiderophoreAnalyzer [4]. Эта
145 программа позволяет выявлять гены биосинтеза и рецепторов четырех

146 сидерофоров: энтеробактина – Ent (*entB* и *ferA*), иерсиниабактина Ybt (*irp2* и
147 *fyuA*), сальмохелина – Sch (*iroB* и *iroN*) и аэробактина – Abt (*iucA* и *iutA*).

148 3 Результаты исследований

149 **Характеристика использованных в работе штаммов *K. pneumoniae***

150 Сравнительный анализ 33 штаммов *K. pneumoniae* (табл.1), выделенных
151 от больных внебольничными пневмониями в лечебных учреждениях г.
152 Ростова-на-Дону в 2021-2023 гг., был проведен по следующим признакам:
153 наличие сидерофорной активности, гипермукоидного фенотипа, автономных
154 плазмидных репликонов и чувствительности к клебсиеллезному
155 бактериофагу.

156 **Определение фагочувствительности** клебсиелл показало, что из 33
157 исследованных штаммов семь (21%) давали нечеткую зону лизиса с
158 вторичным ростом внутри зоны (обозначены «+/-»), девять штаммов (27%)
159 оказались резистентными к бактериофагу: три (33%) относились к *hνKp*
160 патотипу, а шесть (67%) – к *сKp*. Из 17 чувствительных к фагу штаммов,
161 демонстрирующих четкую зону лизиса, 14 (82%) были представлены
162 штаммами *сKp* и только три (18%) – *hνKp*. Полученные данные указывают на
163 преобладание чувствительных к фагу штаммов среди изолятов классического
164 типа. Вероятно, это связано с экранированием рецепторов бактериофага на
165 поверхности бактерий, активно продуцирующих капсульный полисахарид.

166 **Анализ сидерофорной активности** исследованных штаммов на
167 индикаторной среде для выявления сидерофоров (CAS-агаре) показал, что
168 штаммы значительно различались по этому свойству (рис.1, табл. 1).

169 Одни штаммы в условиях эксперимента не проявляли активности (№ 1,
170 4, 10, 12, 19, 21, 22) или давали небольшую зону просветления CAS-реагента
171 вокруг посева, а другие штаммы (№ 2, 5, 17, 20, 23) выделяли в среду большое
172 количество сидерофоров, что свидетельствовало об их высокой сидерофорной
173 активности. Известно, что высокая продукция сидерофоров характерна для
174 *hνKp*, обладающих высокой мукоидностью за счет стимуляции синтеза

175 полисахарида белками RmpA и RmpA2, которые кодируются
176 высокомолекулярными плазмидами, содержащими также гены биосинтеза и
177 транспорта двух сидерофоров (аэробактина и сальмохелина) [9, 18, 32].

178 **Определение мукоидного фенотипа** штаммов в стринг-тесте показало,
179 что из 33 штаммов гипермукоидными свойствами обладали 11 (33%) штаммов
180 (табл.1). При определении сидерофорной активности этих штаммов (рис.1)
181 выяснилось, что высокую активность проявили только три штамма (27%), пять
182 штаммов (46%) обладали слабой активностью, а остальные три (27%) не
183 демонстрировали сидерофорной активности. Среди 22 штаммов
184 классического патотипа только два (10%) проявляли высокую активность, 16
185 (72%) были слабо активны и четыре (18%) не обладали сидерофорной
186 активностью. Анализ полученных данных не позволил выявить четкую связь
187 мукоидных свойств штаммов *K. pneumoniae* с их высокой сидерофорной
188 активностью. Для выяснения вопроса, связаны ли различия сидерофорной
189 активности штаммов с разным набором генетических кластеров, кодирующих
190 сидерофоры, мы использовали два методических подхода: определение
191 плазмидного состава всех исследованных штаммов и полногеномное
192 секвенирование отдельных штаммов.

193 **Определение плазмидного состава** исследованных штаммов *K.*
194 *pneumoniae* методом электрофореза тотальной клеточной ДНК в агарозном
195 геле (рис. 2) показало, что штаммы имели от 1 до 7 плазмид различной
196 молекулярной массы. Известно, что высокомолекулярные плазмидные
197 репликоны клебсиелл несут гены биосинтеза двух дополнительных
198 сидерофоров: сальмохелина и аэробактина. Поэтому наличие у штамма таких
199 репликонов могло бы объяснить их повышенную сидерофорную активность.

200 Анализ плазмидного состава исследованных нами штаммов показал, что
201 большинство из них содержали высокомолекулярные плазмиды,
202 различающиеся по подвижности в геле (рис. 2). Штаммы, которые обладали
203 максимальной сидерофорной активностью (№ 2, 5, 17, 20, 23), имели в своем

204 составе высокомолекулярные плазмиды, при этом другие штаммы (№ 3, 18,
205 19, 22, 24, 25, 26), содержащие сходные репликоны, не проявляли высокой
206 активности. Единственный штамм, у которого не обнаружены плазмиды, не
207 обладал сидерофорной активностью (штамм № 4 на рис. 1, 2). Интересно, что
208 этот штамм характеризовался сильно выраженной гипермукоидностью. По
209 литературным данным, этот признак *K. pneumoniae* обусловлен действием
210 транскрипционных активаторов RmpA и RmpA2, гены которых находятся на
211 высокомолекулярных плаزمидах. Возможно, гиперпродукция капсулы
212 штаммом №4 может быть связана с другими, пока неизвестными,
213 молекулярными механизмами регуляции экспрессии *cps* генов. Полученные
214 данные дают основание для предположения, что сидерофорная активность
215 штаммов, а также свойство гипермукоидности, могут быть связаны не только
216 с генами, локализованными на автономных плазмидных репликонах, но и с
217 хромосомными генами, а также с интегрированными с хромосомой
218 плазмидами.

219 **Результаты полногеномного секвенирования** штаммов позволяли
220 оценить присутствие в них как хромосомных, так и плазмидных генов,
221 кодирующих биосинтез и транспорт сидерофоров, а также генов регуляторов
222 гипермукоидного фенотипа. Для секвенирования были отобраны 11 штаммов,
223 различающихся по фенотипическим свойствам: сидерофорной активности,
224 гипермукоидности и чувствительности в клебсиеллезному бактериофагу
225 (табл. 2).

226 Поиск генетических детерминантов биосинтеза и транспорта четырех
227 сидерофоров в геномах 11 штаммов клебсиелл показал, что они обладали
228 разным набором генов, отвечающих за синтез и транспорт сидерофоров. Все
229 штаммы содержали гены, кодирующие синтез и транспорт энтеробактина,
230 который, как известно, кодируется хромосомными генами. Разные штаммы
231 содержали дополнительно от одного до трех сидерофорных кластеров. Все
232 пять штаммов, которые не обладали гипермукоидным фенотипом, содержали

233 ген рецептора сальмохелина при отсутствии генов биосинтеза этого
234 сидерофора, что может указывать на частичную делецию сальмохелинового
235 кластера. Три из 11 секвенированных штаммов (№ 24-26) содержали гены всех
236 четырех сидерофорных кластеров, тем не менее, не проявляли высокой
237 сидерофорной активности, но обладали гипермукоидным фенотипом.

238 Поиск в геномах секвенированных штаммов с помощью компьютерной
239 программы ContigSearcher [3] генов регуляторов, которые активируют
240 экспрессию гипермукоидного фенотипа (*rmpA* и *rmpA2*) показал, что все 6
241 мукоидных штаммов имели полноценный ген *rmpA*, в то время как
242 полноценный ген *rmpA2* присутствовал только у двух штаммов (№ 24, 26). Два
243 штамма в этом гене содержали единичные инсерции или делеции нуклеотидов
244 (№ 22, 23), приводящие к сдвигу рамки считывания гена, и у двух штаммов (№
245 4, 25) *rmpA2* отсутствовал. Полученные данные позволяют объяснить
246 гипермукоидные свойства бесплазмидного штамма № 4, у которого выявлены
247 плазмидные гены сальмохелина и *rmpA* при отсутствии автономного
248 плазмидного репликона, что подтверждает предположение об интеграции
249 плазмиды (или ее части) с хромосомой.

250 Мутации в гене *rmpA2* отмечены и у трех (№ 27, 30, 31) из пяти
251 немучоидных штаммов, а у двух штаммов (№ 29, 33) этот ген и вовсе
252 отсутствовал. У всех пяти немучоидных штаммов ген *rmpA* не выявлялся.
253 Необходимость и достаточность присутствия в геномах штаммов *K.*
254 *pneumoniae* только *rmpA* для проявления мукоидных свойств подтверждается
255 данными анализа геномов штаммов, в которых *rmpA2* отсутствует (№ 4 и 25)
256 или имеет мутацию со сдвигом рамки считывания (№ 22, 23).

257 Проведенные исследования позволили заключить: сидерофорная
258 активность *K. pneumoniae* не коррелирует с гипермукоидным фенотипом
259 штаммов; для проявления мукоидного фенотипа штаммов *K. pneumoniae*
260 наличие гена *rmpA2* не обязательно, в то время как утрата гена *rmpA* ведет к
261 потере этого фенотипа; высокомолекулярные плазмиды, несущие гены

262 дополнительных сидерофоров и генов регуляторов *rmpA/rmpA2*, могут
263 интегрировать с хромосомой. Такая интеграция плазмид с хромосомой
264 свидетельствует о рекомбинационных процессах, приводящих к изменению
265 фенотипических свойств штаммов. И действительно, в процессе
266 характеристики штаммов *K. pneumoniae* было обнаружено, что некоторые из
267 них образуют разные по окраске колонии. Выяснение причин этой
268 гетерогенности явилось предметом следующего этапа исследования.

269 **Характеристика клонов разных штаммов *K. pneumoniae***

270 Анализ характера роста 33 штаммов на плотных питательных средах
271 показал, что у 17 из них наблюдалась диссоциация: на фоне светлых колоний
272 визуализировались темные непрозрачные колонии (рис. 3). При этом у разных
273 штаммов количество таких колоний было различно: от единичных до 30%.
274 Подобный феномен образования колоний двух морфотипов наблюдался как у
275 гипермукоидных, так и у классических штаммов.

276 Были отобраны морфологически различающиеся клоны 17 штаммов, и их
277 принадлежность к виду *K. pneumoniae* была подтверждена методом MALDI-
278 TOF MS (значение Score 2,0–2,5). В жидкой питательной среде рост штаммов
279 обоих морфотипов на первые-вторые сутки сопровождался равномерным
280 помутнением среды, а в более поздние сроки – образованием слизистого
281 осадка и пленки на поверхности. Различия субкультур не были связаны со
282 способностью сорбировать пигменты из среды роста: при посеве на среду с
283 Конго-рот колонии имели одинаковое окрашивание. С целью выяснения
284 причин различий клонов они были исследованы по следующим признакам:
285 сидерофорная активность, плазмидный состав, гипермукоидность и
286 чувствительность к клебсиеллезному бактериофагу (табл. 3). Клоны 14
287 штаммов были просеквенированы и проанализированы по наличию генов
288 биосинтеза и транспорта четырех сидерофоров и генов регуляторов
289 гипермукоидного фенотипа.

290 Сравнение сидерофорной активности культур (рис. 4), полученных из
291 колоний двух морфотипов, показало, что бактерии, образующие темные
292 колонии, обладают меньшей сидерофорной активностью, чем бактерии из
293 светлых колоний, независимо от их мукоидных свойств.

294 Для того, чтобы проверить, связаны ли отличия сидерофорной
295 активности между клонами с утратой плазмид, был проведен анализ клонов по
296 плазмидному составу (рис. 5). При этом выяснилось, что из 17 пар
297 исследованных клонов 10 пар различались по молекулярной массе отдельных
298 плазмид, а 7 пар клонов имели идентичный плазмидный состав. Нельзя
299 исключить, что у этих клонов имеются незначительные мутации в плазмидных
300 генах, которые невозможно зарегистрировать при использовании данного
301 метода.

302 Анализ мукоидных свойств бактерий из темных и светлых колоний,
303 полученных из гипермукоидных штаммов, показал, что у темных клонов это
304 свойство сохранялось, а у светлых – утрачивалось. Клоны классических
305 штаммов, образующие как темные, так и светлые колонии, признаком
306 мукоидности не обладали.

307 Все исследованные пары клонов различались по уровню
308 чувствительности к клебсиеллезному бактериофагу: темные клоны имели
309 более низкую чувствительность к фагу, независимо от наличия мукоидного
310 фенотипа (табл. 3). Так, у некоторых штаммов (№ 2, 4, 8, 10, 11, 28, 30) темные
311 колонии были резистентны к фагу, в отличие от светлых вариантов. При этом
312 результат определения фагочувствительности смешанной культуры (табл. 1)
313 мог быть различным: отрицательным (№ 10, 30), положительным (№ 2, 8, 11)
314 или сомнительным (№ 4, 28), что, вероятно, зависело от соотношения в
315 исходной культуре бактерий различных морфотипов.

316 Секвенирование бактерий, полученных из темных и светлых колоний,
317 выявило между ними ряд различий. В то время как клоны не различались
318 между собой по набору в их геномах сидерофорных кластеров, они имели

319 различия по присутствию генов регуляторов мукоидного фенотипа, *rmpA* и
320 *rmpA2* (табл. 3). Так, оба варианта 11 немучоидных штаммов не содержали
321 *rmpA* и *rmpA2*, за исключением двух штаммов (№ 14 и 30), которые имели
322 дефектный ген *rmpA2*. Бактерии двух морфотипов мукоидных штаммов (№ 4,
323 26, 28) различались по наличию генов регуляторов (табл. 3): темные клоны
324 сохраняли свойство мукоидности и содержали ген *rmpA*, за исключением
325 штамма № 28, темный клон которого обладал гипермукоидным фенотипом,
326 несмотря на отсутствие *rmpA*. У светлых, немучоидных, клонов этот ген либо
327 отсутствовал (№ 26, 28), либо имел мутацию (№ 4). Наличие интактного или
328 мутантного гена *rmpA2* у бактерий двух типов не оказывало влияния на
329 исследованные нами свойства штаммов.

330 Полученные данные позволили заключить, что различия двух
331 морфотипов по сидерофорной активности и фагочувствительности не связаны
332 с их мукоидными свойствами, количеством сидерофорных кластеров и
333 присутствием в их геноме генов регуляторов мукоидного фенотипа
334 *rmpA/rmpA2*.

335 4 Обсуждение результатов

336 Проведенное исследование разных штаммов *K. pneumoniae*, выделенных
337 от больных внебольничными пневмониями в Ростове-на-Дону в 2021-2023 гг.,
338 выявило различия между ними по ряду фенотипических и генотипических
339 признаков: сидерофорной активности, плазмидному составу,
340 гипермукоидному фенотипу, чувствительности к клебсиеллезному
341 бактериофагу, наличию генов сидерофорных кластеров и регуляторов
342 мукоидного фенотипа.

343 Способность продуцировать низкомолекулярные хелаторы железа –
344 сидерофоры – известна как один из важных факторов вирулентности разных
345 видов бактерий, в том числе и *K. pneumoniae*. Клебсиеллы способны
346 продуцировать четыре сидерофора: энтеробактин, иерсиниабактин,
347 сальмохелин и аэробактин. Гены двух из этих сидерофоров – сальмохелина и

348 аэробактина, которые характерны для *hνKp*, содержатся на крупных
349 плазидах в непосредственной близости от генов регуляторов мукоидного
350 фенотипа *rmpA* и *rmpA2* [15]. Эти данные позволяют объяснить исторически
351 сложившееся представление о корреляции повышенной сидерофорной
352 активности и гипермукоидности штаммов клебсиелл.

353 Проведенное нами исследование геномов 11 секвенированных штаммов
354 *K. pneumoniae* показало, что они различались по набору генов, кодирующих
355 синтез и транспорт четырех сидерофоров. При этом штаммы, содержащие
356 гены всех четырех сидерофоров, не проявляли максимальной сидерофорной
357 активности на индикаторной среде. Полученные результаты также не выявили
358 связи повышенной сидерофорной активности с гипермукоидностью штаммов.
359 Эти данные не согласуются с данными авторов, предлагавших использовать
360 повышенную сидерофорную активность в качестве маркера
361 гипервирулентных и гипермукоидных штаммов их [24, 25, 26].

362 Анализ геномов исследованных в настоящей работе штаммов выявил
363 связь признака гипермукоидности с наличием интактного гена *rmpA*, но не
364 *rmpA2*. Так, у шести гипермукоидных штаммов присутствовал ген *rmpA*, а ген
365 *rmpA2* либо отсутствовал, либо содержал единичные инсерции или делеции
366 нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания гена. Аналогичные
367 изменения гена *rmpA2* были отмечены и у пяти немучоидных штаммов, у
368 которых ген *rmpA* не обнаруживался. Интересно, что у всех пяти штаммов
369 имеется ген рецептора сальмохелина, но отсутствуют гены биосинтеза этого
370 сидерофора, что позволяет судить о частичной делеции плазмиды,
371 содержащей гены сальмохелинового кластера и регуляторов мукоидного
372 фенотипа.

373 Хотя полученные данные свидетельствуют о корреляции
374 гипермукоидности с присутствием гена *rmpA*, нами обнаружен штамм,
375 который обладал гипермукоидным фенотипом, несмотря на отсутствие генов
376 *rmpA* и *rmpA2*. Проведенное ранее исследование вирулентности этого штамма

377 [2] показало, что в дозе 10^5 м.кл. он не вызывал гибели мышей, в отличие от
378 других гипермукоидных штаммов, имеющих $DCL \leq 10^3$ м.кл. По-видимому,
379 аттенуация этого штамма связана именно с отсутствием *rtmA* при сохранении
380 гипермукоидности. О существовании у клебсиелл других механизмов
381 регуляции продукции капсулы свидетельствуют многочисленные
382 исследования последних лет [10, 12, 14, 17, 20, 29, 30, 31]. Так, к
383 гиперпродукции капсулы и формированию гипермукоидного фенотипа
384 приводят миссенс-мутации в гене *wzc* [10, 17], который кодирует тирозин-
385 киназу, отвечающую за секрецию и длину цепи и капсульного полисахарида.
386 В регуляции экспрессии капсулы участвуют множественные молекулярные
387 механизмы: глобальные регуляторы RcsAB, рецептор cAMP, регулятор
388 метаболизма железа Fur, регуляторы KvrAB, двухкомпонентные регуляторные
389 системы KvgAS и KvhAS [29]. Такое разнообразие регуляторов
390 капсулообразования, очевидно, является индикатором важности капсулы для
391 выживания *K.pneumoniae*. Накапливаются данные о том, что гиперпродукция
392 капсулы не обязательно коррелирует с гипермукоидным фенотипом и
393 присутствием генов *rtmA* и *rtmA2* [20, 29, 30]. Обнаружено, что мутации в
394 генах-регуляторах, входящих в один оперон с *rtmA*, имеют различный
395 эффект: мутация в *rtmC* приводит к снижению капсулообразования, но
396 сохранению гипермукоидности, а в *rtmD* – не изменяет синтез капсулы, но
397 приводит к отсутствию мукоидности [30, 31].

398 Изучение фенотипических и генотипических свойств клонов
399 (образующих темные и светлые колонии) разных штаммов *K. pneumoniae*
400 показало, что, хотя эти клоны имели идентичный состав сидерофорных
401 кластеров, клоны из темных колоний проявляли сниженную сидерофорную
402 активность и чувствительность к действию клебсиеллезного бактериофага по
403 сравнению со светлыми клонами, независимо от их мукоидных свойств. При
404 этом анализ генов бактерий из темных и светлых колоний подтвердил, что
405 темные клоны гипермукоидных штаммов имели ген *rtmA*, в то время как

406 светлые варианты либо не содержали этот ген, либо он имел мутацию. У
407 немуроидных штаммов этот ген не выявлялся у обоих вариантов, что
408 указывает на отсутствие связи морфологии колоний с регуляторами
409 мукоидного фенотипа. Причину различий фенотипических свойств двух
410 обнаруженных нами морфотипов *K. pneumoniae* на данном этапе работы
411 выяснить не удалось. Вероятно, их различия в сидерофорной активности и
412 чувствительности к бактериофагу связаны с изменениями клеточной стенки,
413 которые могут быть вызваны самыми разными причинами. О способности
414 клебсиелл образовывать различающиеся по морфологии колонии
415 свидетельствуют данные Nucci A. et al. [22], которые обнаружили в популяции
416 *K. varicola* колонии rdar-подобного (шероховатые и сухие) морфотипа,
417 образование которого было обусловлено мутациями в генах регуляторов
418 ассимиляции азота (*nac*) и фимбрий III типа (*mrkH*). Свойства описанных
419 авторами rdar-подобных колоний отличаются от свойств обнаруженных нами
420 колоний темного морфотипа, для выяснения механизмов образования
421 которого требуются дальнейшие исследования.

422 Таким образом, проведенное исследование штаммов *K. pneumoniae*,
423 выделенных за последние три года от больных внебольничными пневмониями
424 в г. Ростове-на-Дону, выявило их широкое разнообразие по сидерофорной
425 активности, мукоидности, чувствительности к клебсиеллезному
426 бактериофагу, а также по плазмидному составу, наличию генов четырех
427 сидерофорных кластеров и регуляторов мукоидного фенотипа. Полученные
428 данные свидетельствуют о широкой вариабельности свойств клебсиелл,
429 лежащих в основе их эволюционной пластичности.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Характеристика использованных в работе штаммов *K. Pneumoniae*.

Table 1. Characteristics of the *K. pneumoniae* strains used in the study.

Номер штамма Strain number	Название штамма Strain name	Сидерофорная активность Siderophore activity	Мукоидность Mucoviscosity	Чувствительность к бактериофагу Bacteriophage sensitivity
1.	70966	-	-	+
2.	72138	+++	-	+
3.	72375	++	-	+
4.	A3288	-	+	+/-
5.	A3975	+++	+	+
6.	44712	++	-	+
7.	44716 (R)	+	+	+/-
8.	45473	+	-	+
9.	71704	+	-	-
10.	A5237	-	-	-
11.	71514	+	-	+
12.	43592	-	-	+
13.	70622	+	-	+/-
14.	71320	+	-	+
15.	71505	+	-	+
16.	72244	++	-	+
17.	A89 (Л-)	++++	+	+/-
18.	A 106	+	-	-
19.	A 708	-	-	-
20.	A 3292 (Л-)	+++	-	-
21.	КТА	-	+	-
22.	Е 4024	-	+	+/-
23.	И 9932	+++	+	+
24.	И 9939	++	+	-
25.	И 6865	++	+	+
26.	И 9537	+	+	-
27.	И 7762p	+	-	+
28.	44716	+	+	+/-
29.	И 7766	+	-	+/-
30.	К 203	++	-	-
31.	И 7498	+	-	+
32.	И 7762кр	+	-	+
33.	И 9941	+	-	+

Таблица 2. Фенотипические и генотипические свойства секвенированных штаммов *K. Pneumoniae*.

Table 2. Phenotypic and genotypic properties of sequenced *K. pneumoniae* strains.

Номер штамма Strain number	Название штамма Strain name	Сидер. активность Siderophore activity	Сидерофоры* Siderophores*	Мукоидность Muco-viscosity	Гены регуляторов мукоидности Mucoviscosity regulation genes		Чувств. к бактериофагу Bacteriophage sensitivity
					<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	
4.	A3288	-	Ent, Ybt, Sch	+	+	-	+/-
22.	E 4024	-	Ent, Abt, Sch	+	+	+**	+/-
23.	И 9932	+++	Ent, Abt, Sch	+	+	+**	+
24.	И9939	++	Ent, Ybt, Abt, Sch	+	+	+	-
25.	И 6865	++	Ent, Ybt, Abt, Sch	+	+	-	+
26.	И 9537	+	Ent, Ybt, Abt, Sch	+	+	+	-
27.	И 7762 p	+	Ent, Abt, Sch ^R	-	-	+**	+
29.	И 7766	+	Ent, Abt, Sch ^R	-	-	-	+/-
30.	К 203	++	Ent, Ybt, Abt, Sch ^R	-	-	+**	-
31.	И 7498	+	Ent, Ybt, Abt, Sch ^R	-	-	+**	+
33.	И 9941	+	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-	+

* – Ent, Ybt, Abt, Sch – в геномах содержатся гены биосинтеза и транспорта сидерофоров, Sch^R – в геномах содержатся только гены рецептора сальмохелина;

* – Ent, Ybt, Abt, Sch – the genomes contain both siderophore biosynthesis and transport genes, Sch^R – the genomes contain salmochelin receptor gene only;

** – в гене имеется мутация со сдвигом рамки считывания;

** – the gene contains frame shift mutation.

Таблица 3. Фенотипические и генотипические свойства клонов *K.*

pneumoniae, различающихся по морфологии колоний.

Table 3. Phenotypic and genotypic properties of *K. pneumoniae* clones differing in colony morphology.

Номер штамма Strain number	Название штамма Strain name	Клоны Clones	Чувств. к бактериофагу Bacteriophage sensitivity	Сидер. активность Siderophore activity	Сидерофоры Siderophores	Мукоидность Mucoviscosity	Гены регуляторов мукоидности Mucoviscosity regulation genes	
							<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>
1.	70966 (S)	+ темн.	10 ⁻²	-	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻³	+		-	-	-
2.	72138 (S)	+ темн.	-	-	H.O.**	-	H.O.**	H.O.**
		- светл.	10 ⁻³	+++		-		
3.	72375 (S)	+ темн.	10 ⁻¹	+	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻²	++		-	-	-
4.	A 3288 (S)	+ темн.	-	-	Ent, Ybt, Sch	+	+	+*
		- светл.	10 ⁻¹	+		-	+*	+*
8.	45473 (R)	+ темн.	-	+	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻³	+++		-	-	-
10.	A5237(R)	+ темн.	-	+	Ent, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻²	++		-	-	-
11.	71514 (R)	+ темн.	-	-	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻³	++		-	-	-
14.	71320	+ темн.	10 ⁻¹	-	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	+*
		- светл.	10 ⁻²	+++		-	-	+*
15.	71505	+ темн.	ц	-	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻³	+		-	-	-
18.	A 106	+ темн.	-	-	H.O.**	-	H.O.**	H.O.**
		- светл.	-	+		-		
19.	A 708	+ темн.	-	+	H.O.**	-	H.O.**	H.O.**
		- светл.	-	++		-		
20.	A 3292 (Л-)	+ темн.	-	-	Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	ц	+		-	-	-
26.	И 9537	+ темн.	-	++	Ent, Ybt, Abt, Sch	+	+	+
		- светл.	-	+++		-	-	+
27.	И 7762p	+ темн.	10 ⁻¹	+++	Ent, Abt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻²	++++		-	-	-
28.	44716	+ темн.	-	+	Ent, Ybt, Sch ^R	+	-	-
		- светл.	10 ⁻²	++		-	-	-
30.	К 203	+ темн.	-	+	Ent, Ybt, Abt, Sch ^R	-	-	+*
		- светл.	10 ⁻²	+++		-	-	+*
33.	И 9941	+ темн.	10 ⁻¹	-	Ent, Ybt, Sch ^R	-	-	-
		- светл.	10 ⁻²	+		-	-	-

* – в гене имеется мутация со сдвигом рамки считывания;

- * – the gene contains frame shift mutation;
- ** – секвенирование штамма не проводили;
- ** – the strain was not sequenced.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Сидерофорная активность 33-х исследованных штаммов *K. pneumoniae* на индикаторной среде для выявления сидерофоров (CAS-агаре).

Figure 1. Siderophore activity of 33 studied *K. pneumoniae* strains on an indicator medium for siderophore detection (CAS-agar).

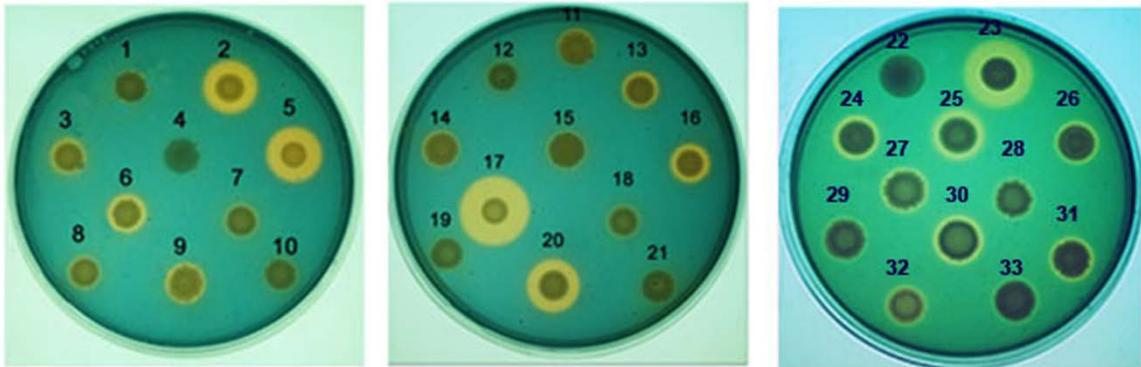


Рисунок 2. Электрофореграмма в 0,7% агарозном геле тотальной клеточной ДНК штаммов *K. pneumoniae*. Контроли: К1 – плазмиды 96,2-70,3-9,6 т.п.н.; К2 – плазмиды 153,1-70,2 т.п.н; К3 - плазмиды 70,2-6,4 т.п.н.

Figure 2. Electrophoregram in 0.7% agarose gel of total cellular DNA of *K. pneumoniae* strains. Controls: K1 – plasmids 96.2-70.3-9.6 kbp; K2 – plasmids 153.1-70.2 kbp.; K3 - plasmids 70.2-6.4 kbp.

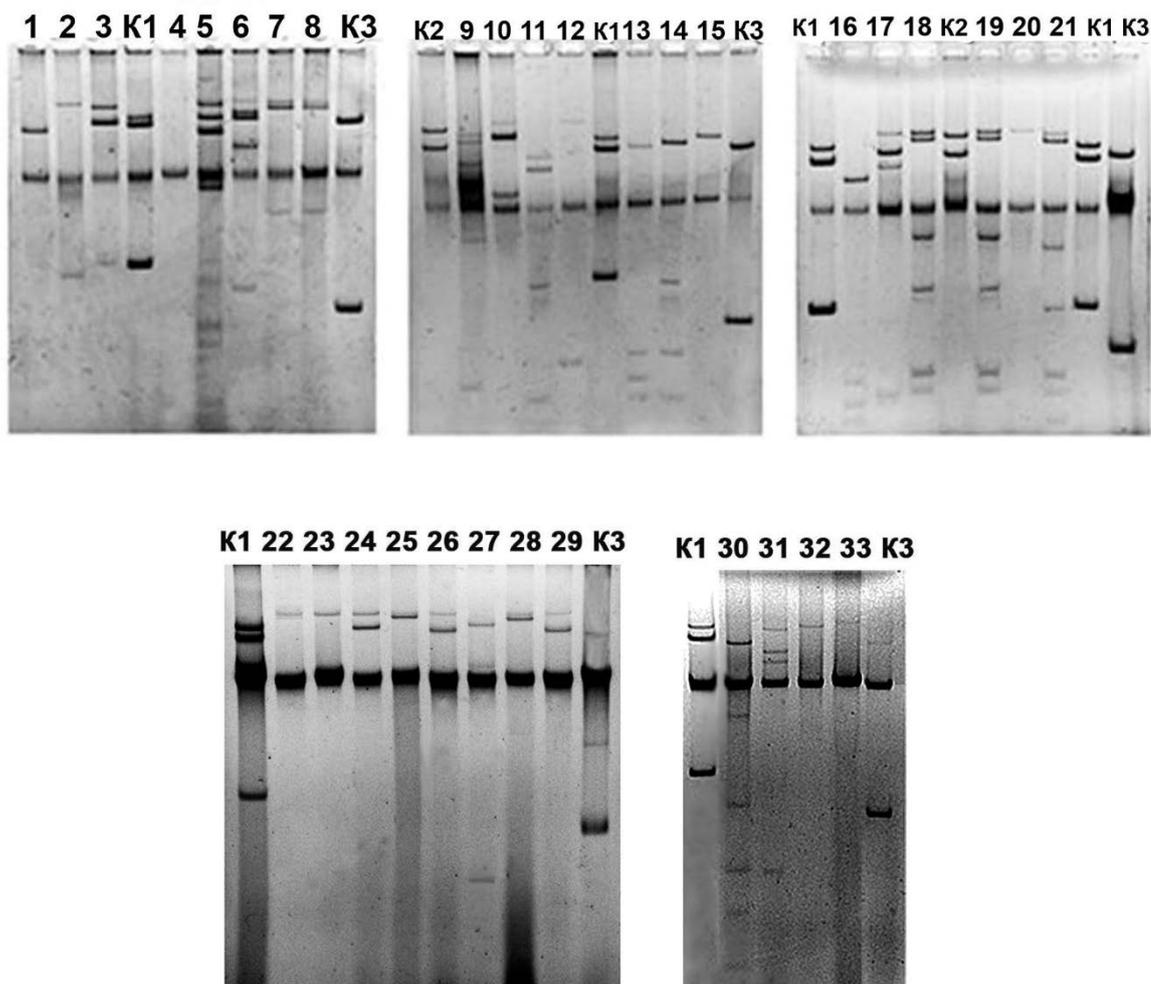


Рисунок 3. Микрофотографии колоний двух штаммов *K. pneumoniae*: гипермукоидного И-9537 (№ 26) и классического И-9941 (№ 33). Увеличение x28.

Figure 3. Micrographs of colonies of two *K. pneumoniae* strains: hypermucoid I-9537 (№ 26) and classic I-9941 (№ 33). Magnification x28.

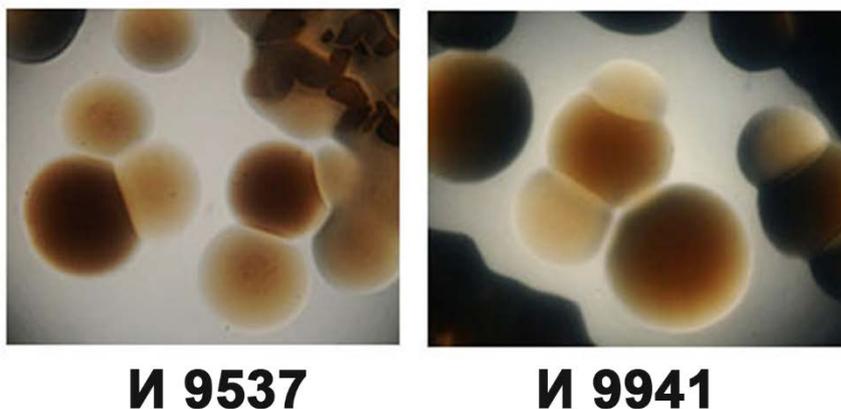


Рисунок 4. Сидерофорная активность клонов, различающихся по морфологии колоний (номер штамма соответствует номеру в таблицах 1-3).

Figure 4. Siderophore activity of clones differing in colony morphology (strain number corresponds to the number in Tables 1-3).

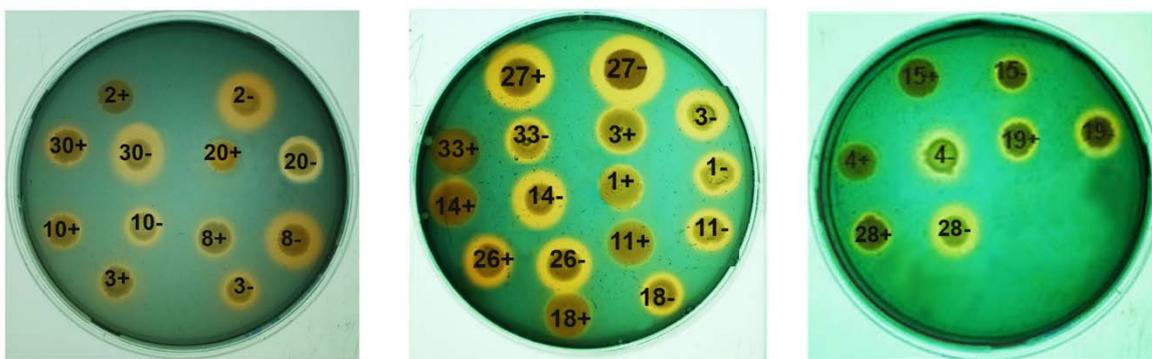
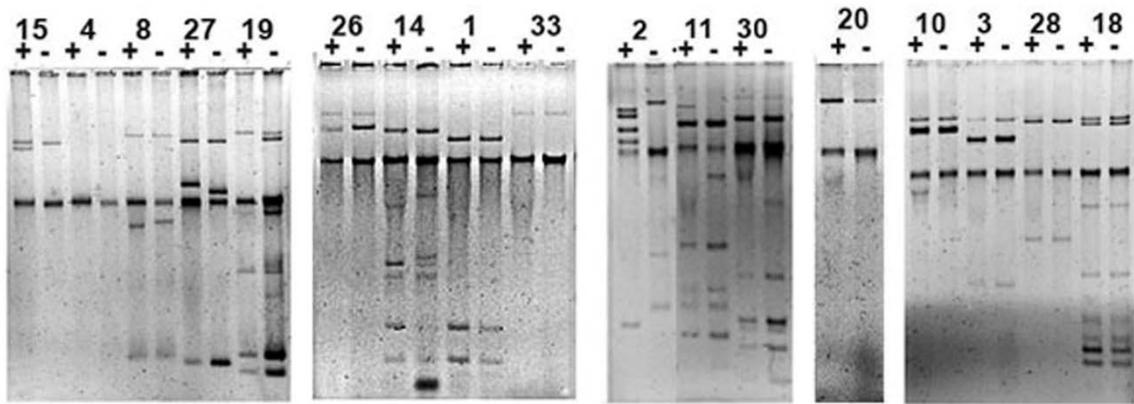


Рисунок 5. Электрофореграмма тотальной клеточной ДНК темных («+») и светлых («-») клонов штаммов *K. pneumoniae* в 0,7% агарозном геле.

Figure 5. Electrophoregram of total cellular DNA of dark ("+") and light ("-") *K. pneumoniae* clones strains in 0.7% agarose gel.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Рыкова Виолетта Александровна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

адрес: ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40;

факс: 8 (863) 267-02-23;

телефон: 8 (863) 240-91-22;

e-mail: violletryk@gmail.com

Rykova Violetta Aleksandrovna – PhD (Biology), Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;

address: Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia, 344002, 117/40, M. Gorkogo st.;

fax: 8 (863) 267-02-23;

telephone: 8 (863) 240-91-22;

e-mail: violletryk@gmail.com

Блок 2. Информация об авторах

Подладчикова О. Н., кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Podladchikova O.N., PhD (Chemistry), Senior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Анисимова А. С., младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Anisimova A. S., Junior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Аронова Н. В., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Aronova N. V., PhD, Senior Researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Водопьянов А. С., кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Vodopyanov A.S., PhD (Medicine), Chief Researcher at the Molecular Biology Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Тимякова С. Ю., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Timyakova S.U., Junior Researcher at the Molecular Biology Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia;

Гудуева Е. Н., младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия;

Gudueva E. N., Junior Researcher at the laboratory «Collection of Pathogenic Microorganisms» of the Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia.

Блок 3. Метаданные статьи

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ В 2021-2023 ГГ.

PHENOTYPIC AND GENETIC ANALYSIS OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM COMMUNITY-ACQUIRED PNEUMONIA PATIENTS IN ROSTOV-ON-DON IN 2021-2023.

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

АНАЛИЗ ШТАММОВ *K. PNEUMONIAE*
ANALYSIS OF *K. PNEUMONIAE* STRAINS

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, сидерофорная активность, плазмиды, гипермукоидный фенотип, фагочувствительность, полногеномное секвенирование.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, siderophore activity, plasmids, hypermucoviscosity, phage sensitivity, whole-genome sequencing.

Оригинальные статьи.

Количество страниц текста – 15, количество таблиц – 3, количество рисунков – 5.

26.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Поряд- ковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1.	Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипervирулентности у <i>Klebsiella pneumoniae</i> // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460.	Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> // Russian Journal of infection and immunity= Infektsia i immunitet, 2022, vol.12, no. 3, pp. 450-460.	DOI: 10.15789/2220- 7619-COM-1825.
2.	Анисимова А.С., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Гудуева Е.Н., Пасюкова Н.И., Теплякова Е.Д., Носков А. К. Биологические свойства и антибиотикорезистентность <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> и её роль в этиологической	Anisimova A.S., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Tsimbalistova M.V., Gudueva E.N., Pasyukova N.I., Teplyakova E.D., Noskov A.K. Biological properties and antibiotic resistance of <i>Klebsiella pneumoniae</i> and its	DOI: 10.37489/0235- 2990-2023-68-5-6-11-18.

	структуре возбудителей внебольничных пневмоний. Антибиотики и химиотерапия. 2023. Т. 68, № 5–6. С. 11–18.	role in the etiological structure of community-acquired pneumonia pathogens // Antibiotics and Chemotherapy, 2023, vol. 68 (5-6), pp. 11-18.	
3.	Водопьянов А.С., Трухачев А.Л., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В. ContigSearcher - программа для анализа результатов полногеномного секвенирования, определение наличия последовательностей различных генов в контигах, полученных при секвенировании, выявления INDEL-мутаций. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2018611348 от 01.02.2018.	Vodopyanov A.S., Trukhachev A.L., Podladchikova O.N., Pisanov R.V. ContigSearcher – a program for analyzing the results of whole-genome sequencing, determining the presence of sequences of various genes in the contigues obtained during sequencing, and detecting INDEL mutations. Certificate of state registration of the computer program No.2018611348 dated 02/01/2018	
4.	Кузнецова Д.А., Водопьянов А.С., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Трухачев	Kuznetsova D.A., Vodopyanov A.S., Podladchikova O.N., Rykova V.A.,	

	А.Л. «SiderophoreAnalyzer» - программа для выявления генов, отвечающих за синтез сидерофоров, в полногеномных нуклеотидных последовательностях. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2022680676 от 03.08.2022 г.	Trukhachev A.L. "SiderophoreAnalyzer" – a program for identifying genes responsible for the synthesis of siderophores in whole-genome nucleotide sequences. Certificate of state registration of the computer program No.2022680676 dated 08/03/2022	
5.	МУ для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics «Прямое белковое профилирование», 2010 г.	MU for operation on Bruker Daltonics flex series devices "Direct protein profiling", 2010	
6.	МУК 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToFMS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности».	MUC 4.2.0089-14 "The use of time-of-flight mass spectrometry with matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI-TOF MS) for the indication and identification of pathogens of pathogenicity groups I–II".	

7.	Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему <i>Klebsiella pneumoniae</i> становится лидирующим оппортунистическим пато-геном // Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2020. Т. 22, № 1. С.4-19.	Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. The reasons why <i>Klebsiella pneumoniae</i> becomes a leading opportunistic pathogen // Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 4-19.	DOI: 10.36488/cmac.2020.1.4-19.
8.	Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> clonal groups. Emerg. Infect. Dis., 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1812–1820.	-	DOI: 10.3201/eid2011.140206.
9.	Dai P., Hu D. The making of hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> . J. Clin. Lab. Anal., 2022, vol. 36, no. 12:e24743.	-	DOI: 10.1002/jcla.24743.
10.	Ernst C.M., Braxton J.R., Rodriguez-Osorio C.A., Zagieboylo A.P., Li L., Pironti A. et al. Adaptive	-	DOI: 10.1038/s41591-020-0825-4.

	evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Nat. Med., 2020, vol. 26, pp. 705–711.		
11.	Guo Y., Wang S., Zhan L., Jin Y., Duan J., Hao Z. et al. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates associated with invasive infections in China. Front. Cell. Infect. Microbiol., 2017; vol. 7: 24.	-	DOI: 10.3389/fcimb.2017.00024. 19.
12.	Harada S., Aoki K., Yamamoto S., Ishii Y., Sekiya N., Kurai H., Furukawa K., Doi A., Tochitani K., Kubo K., Yamaguchi Y., Narita M., Kamiyama S., Suzuki J., Fukuchi T., Gu Y., Okinaka K., Shiiki S., Hayakawa K., Tachikawa N., Kasahara K., Nakamura T., Yokota K., Komatsu M., Takamiya M., Tateda K., Doi Y. Clinical and molecular characteristics of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates	-	DOI: 10.1128/JCM.01206-19.

	causing bloodstream infections in Japan: occurrence of hypervirulent infections in health care. J. Clin. Microbiol., 2019, vol. 57, no. 11:e01206-19.		
13.	Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. <i>Klebsiella pneumoniae</i> siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1a stabilization during pneumonia. mBio, 2016, 7(5):e01397-16.	-	DOI: 10.1128/mBio.01397-16.
14.	Imai K., Ishibashi N., Kodana M., Tarumoto N., Sakai J., Kawamura T., Takeuchi S., Taji Y., Ebihara Y., Ikebuchi K., Murakami T., Maeda T., Mitsutake K., Maesaki S. Clinical characteristics in blood stream infections caused by <i>Klebsiellapneumoniae</i> , <i>Klebsiella variicola</i> , and <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> : a comparative study, Japan, 2014-2017. BMC Infect. Dis., 2019, vol.	-	DOI: 10.1186/s12879-019-4498-x.

	19, no. 1, pp. 946. Erratum in: BMC Infect. Dis. 2022, vol. 22, no 1, pp. 425.		
15.	Jia X., Zhu Y., Jia P., Liu X., Yu W., Li X., Xu Y., Yang Q. Emergence of a superplasmid coharboring hypervirulence and multidrug resistance genes in <i>Klebsiella pneumoniae</i> poses new challenges to public health. Microbiol. Spectr. 2022, vol. 10, no. 6:e0263422.	-	DOI: 10.1128/spectrum.02634-22.
16.	Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol., 1981, vol.145, no. 3, pp. 1365-1373.	-	DOI: 10.1128/jb.145.3.1365-1373.1981
17.	Khadka S., Ring B.E., Walker R.S., Krzeminski L.R., Pariseau D.A., Hathaway M., Mobley H.L.T., Mike L.A. Urine-mediated suppression of <i>Klebsiella pneumoniae</i> mucoidy is counteracted by spontaneous Wzc variants	-	DOI: 10.1128/msphere.00288-23.

	altering capsule chain length. mSphere., 2023, vol. 8, no. 5:e0028823.		
18.	Lam M.M.C., Wyres K.L., Judd L.M. et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Genome Med., 2018, vol.10, no. 1, pp. 77.	-	DOI: 10.1186/s13073-018-0587-5.
19.	Lawlor M.S., O'connor C., Miller V.L. Yersiniabactin is a virulence factor for <i>Klebsiella pneumoniae</i> during pulmonary infection. Infect Immun., 2007, vol. 75, no. 3, pp. 1463-1472.	-	DOI: 10.1128/IAI.00372-06.
20.	Mike L.A., Stark A.J., Forsyth V.S., Vornhagen J., Smith S.N., Bachman M.A., Mobley H.L.T. A systematic analysis of hypermucoviscosity and capsule reveals distinct and overlapping genes that impact <i>Klebsiella pneumoniae</i> fitness. PLOS Pathog. 2021, vol. 17, no. 3:e1009376.	-	DOI: 10.1371/journal.ppat.1009376

21.	Namikawa H., Niki M., Niki M., Oinuma K.I., Yamada K., Nakaie K., Tsubouchi T., Tochino Y., Takemoto Y., Kaneko Y., Kakeya H., Shuto T. Siderophore production as a biomarker for <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains that cause sepsis: a pilot study. J. Formos Med. Assoc. 2022, vol. 121, no. 4, pp. 848-855.	-	DOI: 10.1016/j.jfma.2021.06.027.
22.	Nucci A., Janaszekiewicz J., Rocha E.P.C., Rendueles O. Emergence of novel non-aggregative variants under negative frequency-dependent selection in <i>Klebsiella variicola</i> . Microlife. 2023, 4:uqad038.	-	DOI: 10.1093/femsm1/uqad038
23.	Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Clin. Microbiol. Rev., 2019, vol. 32, pp. 1-42.	-	DOI: 10.1128/CMR.00001-19.
24.	Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J. et al. Aerobactin	-	DOI: 10.1128/IAI.01667-13.

	mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Infect. Immun.</i> , 2014, vol. 82, no. 6, pp. 2356–2367.		
25.	Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> from classical <i>K. pneumoniae</i> . <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2018, 56:e00776-18.	-	DOI: 10.1128/JCM.00776-18
26.	Russo T.A., Shon A.S., Beanan J.M., Olson R., MacDonald U., Pomakov A.O. et al. Hypervirulent <i>K. pneumoniae</i> secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” <i>K. pneumoniae</i> thereby enhancing its virulence. <i>PloS One</i> , 2011, 6:e26734.	-	DOI: 10.1371/journal.pone.0026734

27.	Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. <i>Anal. Biochem.</i> , 1987, vol. 160, no. 1, pp. 47-56.	-	DOI: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
28.	Shukla S., Joshi P., Trivedi P., Akinwotu O., Gajjar D. Genomic islands in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . In: Mani I., Singh V., Alzahrani K.J., Chu D.T. (eds) <i>Microbial genomic islands in adaptation and pathogenicity</i> . Springer, Singapore, 2023, pp. 255-278.	-	DOI:10.1007/978-981-19-9342-8_13 .
29.	Walker K.A., Miller V.L. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Curr. Opin. Microbiol.</i> , 2020, vol. 54, pp. 95-102.	-	DOI: 10.1016/j.mib.2020.01.006.
30.	Walker K.A., Miner T.A., Palacios M., Trzilova D., Frederick D.R., Broberg C.A., Sepúlveda V.E., Quinn J.D., Miller V.L., Goldberg J.B. A	-	DOI: 10.1128/mBio.00089-19 .

	<i>Klebsiella pneumoniae</i> regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity. mBio 2019, 10:e00089-19.		
31.	Walker K.A., Treat L.P., Sepúlveda V.E., Miller V.L., Heran Darwin K. The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . mBio 2020, 11:e01750-20.	-	DOI: 10.1128/mBio.01750-20.
32.	Zhu J., Wang T, Chen L., Du H. Virulence factors in hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Front. Microbiol., 2021, vol.12, pp.1-14.	-	DOI: 10.3389/fmicb.2021.642484.