Инфекция и иммунитет
2024, Т. 14, № 6, с. 1104–1116

Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2024, vol. 14, no. 6, pp. 1104–1116

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

В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова, А.С. Анисимова, Н.В. Аронова, А.С. Водопьянов, С.Ю. Темякова, Е.Н. Гудуева

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

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. Проведено сравнение штаммов по фенотипическим (сидерофорная активность, гипермукоидность, чувствительность к бактериофагу) и генотипическим (плазмидный профиль, наличие генов сидерофоров и *rmp*A и *rmp*A2) свойствам. *Материалы и методы.* При проведении исследования были использованы следующие методы: определение чувствительности к бактериофагу, гипермукоидности с помощью «стринг-теста», сидерофорной активности на среде, содержащей хромазурол S, содержания плазмид и полногеномное секвенирование. *Результаты.* Секвенирование 11 штаммов, различающихся по мукоидности, показало, что все гипермукоидные штаммы содержали *rmp*A, в то время как *rmp*A2 либо отсутствовал, либо содержал одиночные инсерции или делеции нуклеотидов, что приводило к сдвигу рамки считывания. Те же мутации в гене *rmp*A2 наблюдались у немукоидных штаммов, у них отсутствовал *rmp*A. Штаммы отличались по набору из четырех сидерофорных кластеров, количество которых не коррелировало с сидерофорной активностью. Отсутствие у штаммов, не обладающих гипермукоидностью, *rmp*A 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 немукоидных штаммов. Темные клоны гипермукоидных штаммов это свойство сохраняли, в то время как светлые клоны его утрачивали. Оба варианта немукоидных штаммов сохраняли свойство немукоидности. 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 *rmp*A был обнаружен только в темных клонах гипермукоидных штаммов. У немукоидных штаммов этот ген отсутствовал в обоих клонах, в то время как различия в сидерофорной активности и чувствительности к бактериофагу сохранялись. *Заключение.* Гипермукоидность

Адрес для переписки:
Рыкова Виолетта Александровна
344002, Россия, г. Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40, ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (863) 240-91-22. Факс: 8 (863) 267-02-23.
E-mail: violletryk@gmail.com

Contacts:
Violetta A. Rykova
344002, Russian Federation, Rostov-on-Don, Maxim Gorky str., 117/40, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor.
Phone: +7 (863) 240-91-22. Fax: +7 (863) 267-02-23.
E-mail: violletryk@gmail.com

Для цитирования:
Рыкова В.А., Подладчикова О.Н., Анисимова А.С., Аронова Н.В., Водопьянов А.С., Темякова С.Ю., Гудуева Е.Н. Фенотипический и генетический анализ штаммов Klebsiella pneumoniae, выделенных от больных внебольничной пневмонией в г. Ростове-на-Дону в 2021–2023 гг. // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 6. С. 1104–1116. doi: 10.15789/2220-7619-PAG-17627

Citation:
Rykova V.A., Podladchikova O.N., Anisimova A.S., Aronova N.V., Vodopyanov A.S., Temyakova S.Yu., Gudueva E.N. Phenotypic and genetic analysis of Klebsiella pneumoniae strains isolated from community-acquired pneumonia patients in Rostov-on-Don in 2021–2023 // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 6, pp. 1104–1116. doi: 10.15789/2220-7619-PAG-17627

© Рыкова В.А. и соавт., 2024

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-PAG-17627

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

K. pneumoniae связана с наличием *rmp*A, в то время как *rmp*A2 не является обязательным. Различия клонов по морфологии колоний, сидерофорной активности и чувствительности к бактериофагу не связаны с *rmp*A/*rmp*A2, а скорее обусловлены пока неизвестным механизмом.

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

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

Rykova V.A., Podladchikova O.N., Anisimova A.S., Aronova N.V., Vodopyanov A.S., Temyakova S.Yu., Gudueva E.N.

Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. *Introduction*. Here, we 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. The aim of the study was to compare of the strains by analyzing phenotypic (siderophore activity, hypermucoviscosity, bacteriophage sensitivity) and genotypic (presence of plasmids, siderophore genes, and *rmpA* and *rmpA2* genes) properties. *Materials and methods.* Assessment of bacteriophage sensitivity, hypermucoviscosity using "string test", siderophore activity on chrome azurol S containing plates, high-molecular weight plasmids content, and whole-genome sequencing. *Results.* Sequencing of 11 strains differing in mucoviscosity allowed to establish that all hypermucoviscous strains contained the *rmp*A gene, whereas the *rmp*A2 gene was either absent or contained single nucleotide insertions or deletions, leading to a reading frame shift. The same mutations in *rmp*A2 were observed in non-mucoviscous strains, all of which lacked the *rmp*A 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 *rmp*A and salmochelin biosynthesis genes but presence of 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 *rmp*A 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 *rmp*A, while intact *rmp*A2 is not required. The differences in the colony morphology, clone siderophore activity, and bacteriophage sensitivity are not related to *rmp*A and *rmp*A2, but rather result from an unknown yet mechanism.

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

Введение

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

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

Факторы вирулентности *K. pneumoniae* можно разделить на две большие группы. Одни факторы кодируются хромосомными генами

и присутствуют у всех представителей вида (K- и O-антигены, фимбрии, система секреции 6 типа, сидерофор энтеробактин). К этой же группе относится и сидерофор иерсиниабактин, гены биосинтеза и транспорта которого находятся в составе конъюгативного интегративного элемента ICEKp, встраивающегося в хромосому в сайтах аспарагиновой тРНК [28]. Установлено, что способность продуцировать этот сидерофор, который встречается у отдельных штаммов клебсиелл, важна для проявления ими патогенных свойств [19].

Другая группа факторов (повышенная продукция капсулы, синтез дополнительных сидерофоров, таких как сальмохелин и аэробактин) выявляется преимущественно у штаммов hv*Kp*. Известно, что повышенная продукция капсулы, как правило, приводит к гипермукоидности штаммов, которая является одним из признаков, коррелирующих с гипервирулентностью *K. pneumoniae*. Капсула кодируется хромосомными генами *(cps)*, которые активируются продуктами плазмидных генов *rmp*A и *rmp*A2. Эти гены расположены на характерных для hvKp высокомолекулярных плазмидах [15], таких как PLVPK (224 т.п.н.) и pK2044 (219 т.п.н.). На этих же плазмидах находятся гены, кодирующие аэробактин и сальмохелин [9, 18, 32]. Наличие у исследуемых штаммов вышеупомянутых генов, которое указывает на присутствие в штаммах плазмид вирулентности, предложено использовать в качестве генетических маркеров hv*Kp* [25].

Из четырех продуцируемых клебсиеллами сидерофоров (энтеробактин, иерсиниабактин, сальмохелин и аэробактин) наиболее важными для проявления патогенных свойств являются аэробактин и сальмохелин. Энтеробактин синтезируется всеми штаммами, однако его эффективность в организме хозяина невысока, так как он инактивируется белком иммунной системы липокалином-2. Устойчивый к липокалину иерсиниабактин встречается как у c*Kp*, так и у hv*Kp*. Для последних особенно характерны два других сидерофора — сальмохелин и аэробактин, которые также не инактивируются липокалином-2. Наличие у штаммов hv*Kp* дополнительных генов, кодирующих биосинтез сидерофоров, предполагает наличие у них способности продуцировать эти хелаторы железа в больших количествах. И действительно, исследования разных штаммов клебсиелл показали, что hv*Kp* продуцируют в 8–10 раз больше сидерофоров, чем c*Kp* штаммы [24, 25]. На основе этих наблюдений авторы предложили количественный метод для определения сидерофорной активности штаммов по росту на индикаторной среде (CAS-агаре), который предлагали использовать для быстрой дифференциации hv*Kp* от c*Kp*.

Гиперпродукция капсулы и сидерофоров способствует проявлению hvKp высокоинвазивных свойств. Капсула способствует ускользанию бактерий от действия иммунной системы хозяина, а продукция нескольких типов сидерофоров обеспечивает доступ к разным источникам железа. Помимо участия в ассимиляции железа, сидерофоры *K. pneumonia*e повреждают ткани хозяина, индуцируют выработку цитокинов, стабилизируют транскрипционный фактор HIF-1a и способствуют диссеминации бактерий [13, 23].

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

Материалы и методы

Штаммы, использованные в работе, были выделены из мокроты больных внебольничными пневмониями в лечебных учреждениях г. Ростова-на-Дону в 2021–2023 гг. В работе проанализированы 33 штамма *K. pneumoniae*. Штаммы выращивали на мясо-пептонном агаре (МПА) при 37°C в течение 18–24 ч. Видовую принадлежность выделенных культур подтверждали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS). Масс-спектры, полученные при использовании масс-спектрометра Autoflex speedIII (Bruker Daltonics, Германия), анализировали с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper и сравнивали с базой данных компании Bruker версии 3.1.66 (Bruker Daltonics, Германия). Образцы для масс-спектрометрии готовили в соответствии с методическими указаниями [5, 6].

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

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

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

Сидерофорную активность использованных в работе штаммов *K. pneumoniae* определяли на индикаторной среде [27], содержащей хромогенный хелатор железа хромазурол S (CAS). Этот реактив при 30%-ном насыщении железом имеет сине-зеленую окраску, а после удаления из него железа сидерофорами, выделяемыми в среду бактериями, CAS-реактив окрашивается в желтый цвет. Перед посевом на индикаторную среду штаммы клебсиелл выращивали при 37°С на МПА в течение 24 ч, культуры суспендировали в стерильной дистиллированной воде до плотности 10^9 м.к./мл. По 10 мкл суспензий бактерий наносили на CAS-агар в виде капли, и посевы инкубировали при 37°С в течение 24 ч.

Секвенирование штаммов клебсиелл было проведено методом высокопроизводительного секвенирования при использовании технологической платформы MiSeq (Illumina, www.illumina.com). Хромосомная ДНК для секвенирования была выделена с помощью набора для выделения ДНК — «НК» (ДНК-технология, Москва, Россия) согласно инструкции по применению набора. В реакции использовали 20 нг ДНК каждого из исследованных штаммов. Библиотеки готовили с помощью коммерческого набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina) согласно прилагаемой инструкции. Для секвенирования полученных библиотек использовали набор картриджей MiSeq v.2 Reagents Kit 300 Cycles PE (Illumina). Результаты секвенирования были представлены в виде набора контигов, содержащих текстовые файлы двух типов (fasta и fastaQ). Геномы анализировали с помощью авторской программы ContigSearcher [3], позволяющей проводить поиск конкретных последовательностей ДНК в контигах. Для поиска генов регуляторов мукоидного фенотипа использовали последовательности *rmp*A и *rmp*A2 из базы данных NCBI. Анализ генов, отвечающих за продукцию клебсиеллами сидерофоров, проводили с использованием компьютерной программы SiderophoreAnalyzer [4]. Эта программа позволяет выявлять гены биосинтеза и рецепторов четырех сидерофоров: энтеробактина — Ent (*ent*B и *fep*A), иерсиниабактина Ybt (*irp*2 и *fyu*A), сальмохелина — Sch (*iro*B и *iro*N) и аэробактина — Abt (*iuc*A и *iut*A).

Результаты

Характеристика использованных в работе штаммов *K. pneumoniae*

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

Определение фагочувствительности клебсиелл показало, что из 33 исследованных штаммов семь (21%) давали нечеткую зону лизиса с вторичным ростом внутри зоны (обозначены «+/–»), 9 штаммов (27%) оказались резистентными к бактериофагу: 3 (33%) относились к hv*Kp* патотипу, а 6 (67%) — к cKp. Из 17 чувствительных к фагу штаммов, демонстрирующих четкую зону лизиса, 14 (82%) были представлены штаммами cKp и только 3 (18%) — hv*Kp*. Полученные данные указывают на преобладание чувствительных к фагу штаммов среди изолятов классического типа. Вероятно, это связано с экранированием рецепторов бактериофага на поверхности бактерий, активно продуцирующих капсульный полисахарид.

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

Одни штаммы в условиях эксперимента не проявляли активности (№ 1, 4, 10, 12, 19, 21, 22) или давали небольшую зону просветления CAS-реагента вокруг посева, а другие штаммы (№ 2, 5, 17, 20, 23) выделяли в среду большое количество сидерофоров, что свидетельствовало об их высокой сидерофорной активности. Известно, что высокая продукция сидерофоров характерна для hv*Kp*, обладающих высокой мукоидностью за счет стимуляции синтеза полисахарида белками RmpA и RmpA2, которые кодируются высокомолекулярными плазмидами,

содержащими также гены биосинтеза и транспорта двух сидерофоров (аэробактина и сальмохелина) [9, 18, 32].

Определение мукоидного фенотипа штаммов в стринг-тесте показало, что из 33 штаммов гипермукоидными свойствами обладали 11 (33%) штаммов (табл. 1). При определении сидерофорной активности этих штаммов (рис. 1, III обложка) выяснилось, что высокую активность проявили только 3 штамма (27%), 5 штаммов (46%) обладали слабой активностью, а остальные 3 (27%) не демонстрировали сидерофорной активности. Среди 22 штаммов классического патотипа только 2 (10%) проявляли высокую активность, 16 (72%) были слабо активны и 4 (18%) не обладали сидерофорной активностью. Анализ полученных данных не позволил выявить четкую связь мукоидных свойств штаммов *K. pneumoniae* с их высокой сидерофорной активностью. Для выяснения вопроса, связаны ли различия сидеро-

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	**KTA**	–	+	–
22	**E 4024**	–	+	+/–
23	**И 9932**	+++	+	+
24	**И 9939**	++	+	–
25	**И 6865**	++	+	+
26	**И 9537**	+	+	–
27	**И 7762р**	+	–	+
28	**44716**	+	+	+/–
29	**И 7766**	+	–	+/–
30	**K 203**	++	–	–
31	**И 7498**	+	–	+
32	**И 7762кр**	+	–	+
33	**И 9941**	+	–	+

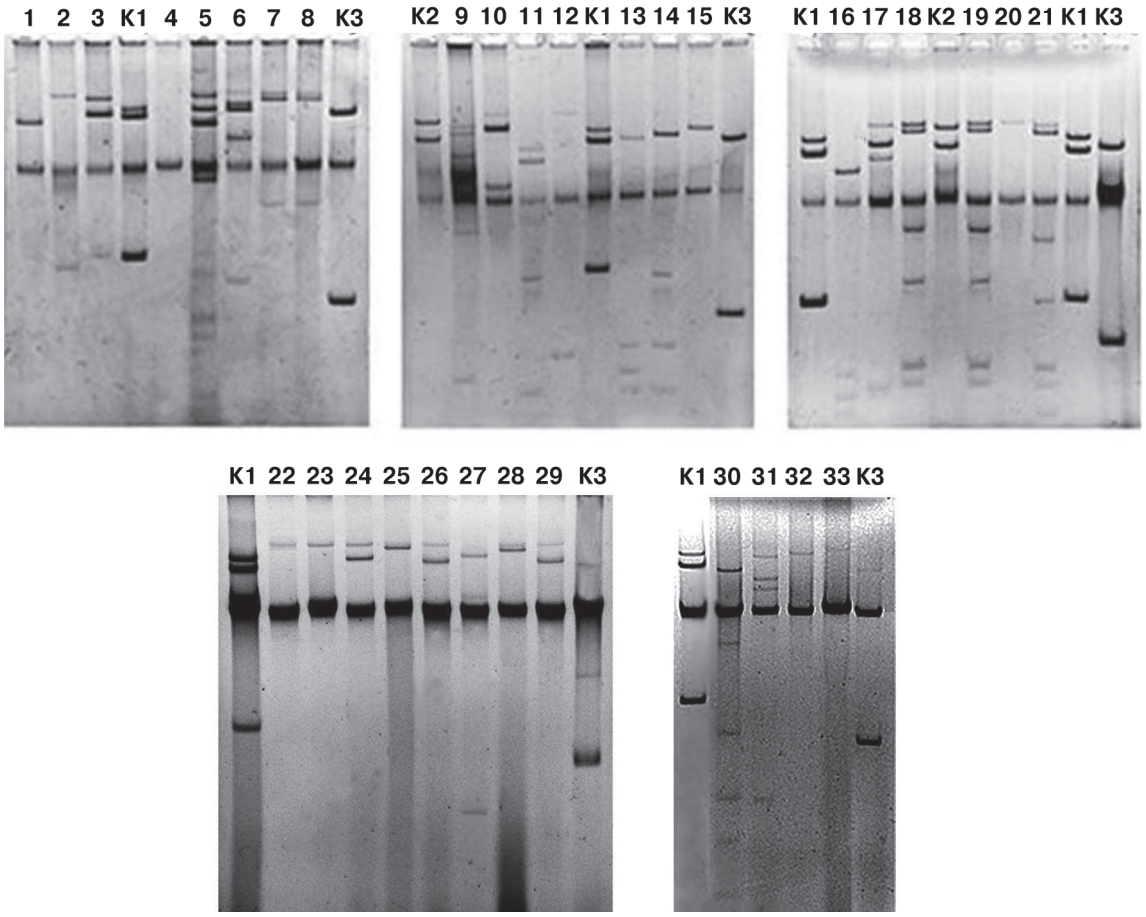


Рисунок 2. Электрофореграмма в 0,7% агарозном геле тотальной клеточной ДНК штаммов *K. pneumoniae*. Контроли: K1 — плазмиды 96,2–70,3–9,6 т.п.н.; K2 — плазмиды 153,1–70,2 т.п.н.; K3 — плазмиды 70,2–6,4 т.п.н.

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.

форной активности штаммов с разным набором генетических кластеров, кодирующих сидерофоры, мы использовали два методических подхода: определение плазмидного состава всех исследованных штаммов и полногеномное секвенирование отдельных штаммов.

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

Анализ плазмидного состава исследованных нами штаммов показал, что большинство из них содержали высокомолекулярные плазмиды, различающиеся по подвижности в геле (рис. 2). Штаммы, которые обладали максимальной сидерофорной активностью (№ 2, 5, 17, 20, 23), имели в своем составе высокомолекулярные плазмиды, при этом другие штаммы (№ 3, 18, 19, 22, 24, 25, 26), содержащие сходные репликоны, не проявляли высокой активности. Единственный штамм, у которого не обнаружены плазмиды, не обладал сидерофорной активностью (штамм № 4 на рис. 1, 2). Интересно, что этот штамм характеризовался сильно выраженной гипермукоидностью. По литературным данным, этот признак *K. pneumoniae* обусловлен действием транскрипционных активаторов RmpA и RmpA2, гены которых находятся на высокомолекулярных плазмидах. Возможно, гиперпродукция капсулы штаммом № 4 связана с другими, пока неизвестными, молекулярными механизмами регуляции экспрессии *cps* генов. Полученные данные дают основание для предположения, что сидерофорная активность штаммов, а также свойство гипермукоидности, могут быть связаны не только с генами, локализованными на автономных плазмидных репликонах, но и с хромосомными генами, а также с интегрированными с хромосомой плазмидами.

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** Mucoviscosity	**Гены регуляторов мукоидность** Mucoviscosity regulation genes		**Чувств. к бактериофагу** Bacteriophage sensitivity
					rmpA	***rmpA2***	
4	**А3288**	–	Ent, Ybt, Sch	+	+	–	+/–
22	**Е 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 р**	+	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	–	–	–	+

Примечание. *Ent, Ybt, Abt, Sch — в геномах содержатся гены биосинтеза и транспорта сидерофоров, Sch^R — в геномах содержатся только гены рецептора сальмохелина; **в гене имеется мутация со сдвигом рамки считывания.

Note. *Ent, Ybt, Abt, Sch — the genomes contain both siderophore biosynthesis and transport genes, Sch^R — the genomes contain salmochelin receptor gene only; **the gene contains frame shift mutation.

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

Поиск генетических детерминантов биосинтеза и транспорта четырех сидерофоров в геномах 11 штаммов клебсиелл показал, что они обладали разным набором генов, отвечающих за синтез и транспорт сидерофоров. Все штаммы содержали гены, кодирующие синтез и транспорт энтеробактина, который, как известно, кодируется хромосомными генами. Разные штаммы содержали дополнительно от одного до трех сидерофорных кластеров. Все пять штаммов, которые не обладали гипермукоидным фенотипом, содержали ген рецептора сальмохелина при отсутствии генов биосинтеза этого сидерофора, что может указывать на частичную делецию сальмохелинового кластера. Три из 11 секвенированных штаммов (№ 24–26) содержали гены всех четырех сидерофорных кластеров, тем не менее, не проявляли высокой сидерофорной активности, но обладали гипермукоидным фенотипом.

Поиск в геномах секвенированных штаммов с помощью компьютерной программы ContigSearcher [3] генов регуляторов, которые активируют экспрессию гипермукоидного фенотипа (*rmp*A и *rmp*A2), показал, что все 6 мукоидных штаммов имели полноценный ген *rmp*A, в то время как полноценный ген *rmp*A2 присутствовал только у двух штаммов (№ 24, 26). Два штамма в этом гене содержали единичные инсерции или делеции нуклеотидов (№ 22, 23), приводящие к сдвигу рамки считывания гена, и у двух штаммов (№ 4, 25) *rmp*A2 отсутствовал. Полученные данные позволяют объяснить гипермукоидные свойства бесплазмидного штамма № 4, у которого выявлены плазмидные гены сальмохелина и *rmp*A при отсутствии автономного плазмидного репликона, что подтверждает предположение об интеграции плазмиды (или ее части) с хромосомой.

Мутации в гене *rmp*A2 отмечены и у трех (№ 27, 30, 31) из пяти немукоидных штаммов, а у двух штаммов (№ 29, 33) этот ген и вовсе отсутствовал. У всех пяти немукоидных штаммов ген *rmp*A не выявлялся. Необходимость и достаточность присутствия в геномах штаммов *K. pneumoniae* только *rmp*A для проявления мукоидных свойств подтверждается данными анализа геномов штаммов, в которых *rmp*A2 отсутствует (№ 4 и 25) или имеет мутацию со сдвигом рамки считывания (№ 22, 23).

Проведенные исследования позволили заключить: сидерофорная активность *K. pneumoniae* не коррелирует с гипермукоидным фенотипом штаммов; для проявления мукоидного феноти-

па штаммов *K. pneumoniae* наличие гена *rmp*A2 не обязательно, в то время как утрата гена *rmp*A ведет к потере этого фенотипа; высокомолекулярные плазмиды, несущие гены дополнительных сидерофоров и генов регуляторов *rmp*A/*rmp*A2, могут интегрировать с хромосомой. Такая интеграция плазмид с хромосомой свидетельствует о рекомбинационных процессах, приводящих к изменению фенотипических свойств штаммов. И действительно, в процессе характеристики штаммов *K. pneumoniae* было обнаружено, что некоторые из них образуют разные по окраске колонии. Выяснение причин этой гетерогенности стало предметом следующего этапа исследования.

Характеристика клонов разных штаммов *K. pneumoniae*

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

Были отобраны морфологически различающиеся клоны 17 штаммов, и их принадлежность к виду *K. pneumoniae* была подтверждена методом MALDI-ToF MS (значение Score 2.0–2.5). В жидкой питательной среде рост штаммов обоих морфотипов на первые-вторые сутки сопровождался равномерным помутнением среды, а в более поздние сроки — образованием слизистого осадка и пленки на поверхности. Различия субкультур не были связаны со способностью сорбировать пигменты из среды роста: при посеве на среду с Конго-рот колонии имели одинаковое окрашивание. С целью выяснения причин различий клонов они были исследованы по следующим признакам: сидерофорная активность, плазмидный состав, гипермукоидность и чувствительность к клебсиеллезному бактериофагу (табл. 3). Клоны 14 штаммов были просеквенированы и проанализированы по наличию генов биосинтеза и транспорта четырех сидерофоров и генов регуляторов гипермукоидного фенотипа.

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

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

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

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

Секвенирование бактерий, полученных из темных и светлых колоний, выявило между ними ряд различий. В то время как клоны не различались между собой по набору в их геномах сидерофорных кластеров, они имели различия по присутствию генов регуляторов мукоидного фенотипа, *rmp*A и *rmp*A2 (табл. 3). Так, оба варианта 11 немукоидных штаммов не содержали *rmp*A и *rmp*A2, за исключением двух штаммов (№ 14 и 30), которые имели дефектный ген *rmp*A2. Бактерии двух морфотипов мукоидных штаммов (№ 4, 26, 28) различались по наличию генов регуляторов (табл. 3): темные клоны сохраняли свойство мукоидности и содержали ген *rmp*A, за исключением штамма № 28, темный клон которого обладал гипермукоидным фенотипом, несмотря на отсутствие *rmp*A. У светлых, немукоидных, клонов этот ген либо отсутствовал (№ 26, 28), либо имел мутацию (№ 4). Наличие интактного или мутантного гена *rmp*A2 у бактерий двух типов не оказывало влияния на исследованные нами свойства штаммов.

Полученные данные позволили заключить, что различия двух морфотипов по сидерофорной активности и фагочувствительности не связаны с их мукоидными свойствами, количеством сидерофорных кластеров и присутствием в их геноме генов регуляторов мукоидного фенотипа *rmp*A/*rmp*A2.

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	**Чувствительность к бактериофагу** Bacteriophage sensitivity	**Сидерофорная активность** Siderophore activity	**Сидерофоры** Siderophores	**Мукоидность** Mucoviscosity	**Гены регуляторов мукоидности** Mucoviscosity regulation genes	
							rmpA	***rmpA2***
1	**70966 (S)**	+ **темн.**/+ dark	10^{-2}	–	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-3}	+		–	–	–
2	**72138 (S)**	+ **темн.**/+ dark	–	–	н.о.**	–	н.о.**	н.о.**
		– **светл.**/– light	10^{-3}	+++		–		
3	**72375 (S)**	+ **темн.**/+ dark	10^{-1}	+	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-2}	++		–	–	–
4	**А 3288 (S)**	+ **темн.**/+ dark	–	–	Ent, Ybt, Sch	+	+	+*
		– **светл.**/– light	10^{-1}	+		–	+*	+*
8	**45473 (R)**	+ **темн.**/+ dark	–	+	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-3}	+++		–	–	–
10	**А5237(R)**	+ **темн.**/+ dark	–	+	Ent, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-2}	++		–	–	–
11	**71514 (R)**	+ **темн.**/+ dark	–	–	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-3}	++		–	–	–
14	**71320**	+ **темн.**/+ dark	10^{-1}	–	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	+*
		– **светл.**/– light	10^{-2}	+++		–	–	+*
15	**71505**	+ **темн.**/+ dark	ц	–	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-3}	+		–	–	–
18	**А 106**	+ **темн.**/+ dark	–	–	н.о.**	–	н.о.**	н.о.**
		– **светл.**/– light	–	+		–		
19	**А 708**	+ **темн.**/+ dark	–	+	н.о.**	–	н.о.**	н.о.**
		– **светл.**/– light	–	++		–		
20	**А 3292 (л–)**	+ **темн.**/+ dark	–	–	Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	ц	+		–	–	–
26	**И 9537**	+ **темн.**/+ dark	–	++	Ent, Ybt, Abt, Sch	+	+	+
		– **светл.**/– light	–	+++		–	–	+
27	**И 7762р**	+ **темн.**/+ dark	10^{-1}	+++	Ent, Abt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-2}	++++		–	–	–
28	**44716**	+ **темн.**/+ dark	–	+	Ent, Ybt, Sch^R	+	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-2}	++		–	–	–
30	**К 203**	+ **темн.**/+ dark	–	+	Ent, Ybt, Abt, Sch^R	–	–	+*
		– **светл.**/– light	10^{-2}	+++		–	–	+*
33	**И 9941**	+ **темн.**/+ dark	10^{-1}	–	Ent, Ybt, Sch^R	–	–	–
		– **светл.**/– light	10^{-2}	+		–	–	–

Примечание. *В гене имеется мутация со сдвигом рамки считывания; **секвенирование штамма не проводили.

Note. *The gene contains frame shift mutation; **the strain was not sequenced.

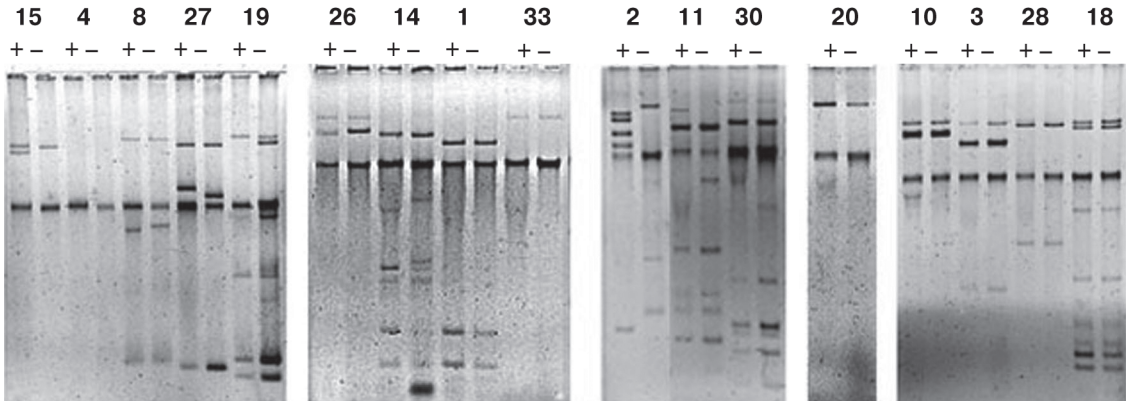


Рисунок 5. Электрофореграмма тотальной клеточной ДНК темных («+») и светлых («–») клонов штаммов *K. pneumoniae* в 0,7% агарозном геле

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

Обсуждение

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

Способность продуцировать низкомолекулярные хелаторы железа — сидерофоры — известна как один из важных факторов вирулентности разных видов бактерий, в том числе и *K. pneumoniae*. Клебсиеллы способны продуцировать четыре сидерофора: энтеробактин, иерсиниабактин, сальмохелин и аэробактин. Гены двух из этих сидерофоров — сальмохелина и аэробактина, которые характерны для hv*Kp*, содержатся на крупных плазмидах в непосредственной близости от генов регуляторов мукоидного фенотипа *rmp*A и *rmp*A2 [15]. Эти данные позволяют объяснить исторически сложившееся представление о корреляции повышенной сидерофорной активности и гипермукоидности штаммов клебсиелл.

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

Анализ геномов исследованных в настоящей работе штаммов выявил связь признака гипермукоидности с наличием интактного гена *rmp*A, но не *rmp*A2. Так, у шести гипермукоидных штаммов присутствовал ген *rmp*A, а ген *rmp*A2 либо отсутствовал, либо содержал единичные инсерции или делеции нуклеотидов, приводящие к сдвигу рамки считывания гена. Аналогичные изменения гена *rmp*A2 были отмечены и у пяти немукоидных штаммов, у которых ген *rmp*A не обнаруживался. Интересно, что у всех пяти штаммов имеется ген рецептора сальмохелина, но отсутствуют гены биосинтеза этого сидерофора, что позволяет судить о частичной делеции плазмиды, содержащей гены сальмохелинового кластера и регуляторов мукоидного фенотипа.

Хотя полученные данные свидетельствуют о корреляции гипермукоидности с присутствием гена *rmp*A, нами обнаружен штамм, который обладал гипермукоидным фенотипом, несмотря на отсутствие генов *rmp*A и *rmp*A2. Проведенное ранее исследование вирулентности этого штамма [2] показало, что в дозе 10^5 м.кл. он не вызывал гибели мышей, в отличие от других гипермукоидных штаммов, имеющих DCL ≤ 10^3 м.кл. По-видимому, аттенуация этого штамма связана именно с отсутствием *rmp*A при сохранении гипермукоидности. О существовании у клебсиелл других механизмов регуляции продукции капсулы свидетельствуют многочисленные исследования последних лет [10, 12, 14, 17, 20, 29, 30, 31]. Так, к гиперпродукции капсулы и формированию гипермукоидного фенотипа приводят миссенс-мутации в гене *wzc* [10, 17], который кодирует тирозинкиназу, отвечающую за секрецию и длину цепи кап-

сульного полисахарида. В регуляции экспрессии капсулы участвуют множественные молекулярные механизмы: глобальные регуляторы RcsAB, рецептор cAMP, регулятор метаболизма железа Fur, регуляторы KvrAB, двухкомпонентные регуляторые системы KvgAS и KvhAS [29]. Такое разнообразие регуляторов капсулообразования, очевидно, является индикатором важности капсулы для выживания *K. pneumoniae*. Накапливаются данные о том, что гиперпродукция капсулы не обязательно коррелирует с гипермукоидным фенотипом и присутствием генов *rmp*A и *rmp*A2 [20, 29, 30]. Обнаружено, что мутации в генах-регуляторах, входящих в один оперон с *rmp*A, имеют различный эффект: мутация в *rmp*C приводит к снижению капсулообразования, но сохранению гипермукоидности, а в *rmp*D — не изменяет синтез капсулы, но приводит к отсутствию мукоидности [30, 31].

Изучение фенотипических и генотипических свойств клонов (образующих темные и светлые колонии) разных штаммов *K. pneumoniae* показало, что, хотя эти клоны имели идентичный состав сидерофорных кластеров, клоны из темных колоний проявляли сниженную сидерофорную активность и чувствительность к действию клебсиеллезного бактериофага по сравнению со светлыми клонами, независимо от их мукоидных свойств. При этом анализ генов бактерий из темных и светлых колоний подтвердил, что темные клоны гипермукоидных штаммов имели ген *rmp*A, в то время как светлые варианты либо не содержали этот ген, либо он имел мутацию. У немукоидных штаммов этот ген не выявлялся у обоих вариантов, что указывает на отсутствие связи морфологии колоний с регуляторами мукоидного фенотипа. Причину различий фенотипических свойств двух обнаруженных нами морфотипов *K. pneumoniae* на данном этапе работы выяснить не удалось. Вероятно, их различия в сидерофорной активности и чувствительности к бактериофагу связаны с изменениями клеточной стенки, которые могут быть вызваны самыми разными причинами. О способности клебсиелл образовывать различающиеся по морфологии колонии свидетельствуют данные Nucci A. и соавт. [22], которые обнаружили в популяции *K. varicola* колонии rdar-подобного (шероховатые и сухие) морфотипа, образование которого было обусловлено мутациями в генах регуляторов ассимиляции азота *(nac)* и фимбрий III типа *(mrkH)*. Свойства описанных авторами rdar-подобных колоний отличаются от свойств обнаруженных нами колоний темного морфотипа, для выяснения механизмов образования которого требуются дальнейшие исследования.

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

Список литературы/References

1. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у Klebsiella pneumoniae // 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 Klebsiella pneumonia. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 450–460. (In Russ.)*] *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 Klebsiella pneumoniae и ее роль в этиологической структуре возбудителей внебольничных пневмоний // Антибиотики и химиотерапия. 2023. Т. 68, № 5–6. С. 11–18. [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 Klebsiella pneumonia and its role in the etiological structure of community-acquired pneumonia pathogens. *Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy, 2023, vol. 68 (5–6), pp. 11–18. (In Russ.)*] *doi: 10.37489/0235-2990-2023-68-5-6-11-18*
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. *(In Russ.)*]
4. Кузнецова Д.А., Водопьянов А.С., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Трухачев 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. [Kuznetsova D.A., Vodopyanov A.S., Podladchikova O.N., Rykova V.A., 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. *(In Russ.)*]

5. Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics. Прямое белковое профилирование. М., 2010. [MU for operation on Bruker Daltonics flex series devices “Direct protein profiling”. *Moscow, 2010. (In Russ.)*]
6. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности: методические указания МУК 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: Methodological guidelines MUC 4.2.0089-14. *(In Russ.)*]
7. Чеботарь И.В., Бочарова Ю.А., Подопригора И.В., Шагин Д.А. Почему Klebsiella pneumoniae становится лидирующим оппортунистическим патогеном // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2020. Т. 22, № 1. С. 4–19. [Chebotar I.V., Bocharova Yu.A., Podoprigora I.V., Shagin D.A. The reasons why Klebsiella pneumoniae becomes a leading opportunistic pathogen. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2020, vol. 22, no. 1, pp. 4–19. (In Russ.)*] *doi: 10.36488/cmac.2020.1.4-19*
8. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A.S., 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*
9. Dai P., Hu D. The making of hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *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., Manson A.L., Nair A.V., Benson M., Cummins K., Clatworthy A.E., Earl A.M., Cosimi L.A., Hung D.T. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. *Nat. Med., 2020, vol. 26, pp. 705–711. doi: 10.1038/s41591-020-0825-4*
11. Guo Y., Wang S., Zhan L., Jin Y., Duan J., Hao Z., Lv J., Qi X., Chen L., Kreiswirth B.N., Wang L., Yu F. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae isolates associated with invasive infections in China. *Front. Cell. Infect. Microbiol., 2017, vol. 7: 24. doi: 10.3389/fcimb.2017.00024*
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 Klebsiella pneumoniae isolates causing bloodstream infections in Japan: occurrence of hypervirulent infections in health care. *J. Clin. Microbiol., 2019, vol. 57, no. 11: e01206-19. doi: 10.1128/JCM.01206-19*
13. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. Klebsiella pneumoniae siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1a stabilization during pneumonia. *mBio, 2016, vol. 7, no. 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 Klebsiellapneumoniae, Klebsiella variicola, and Klebsiella quasipneumoniae: a comparative study, Japan, 2014–2017. *BMC Infect. Dis., 2019, vol. 19, no. 1: 946. doi: 10.1186/s12879-019-4498-x*
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 Klebsiella pneumoniae 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 Klebsiella pneumoniae mucoidy is counteracted by spontaneous Wzc variants altering capsule chain length. *mSphere., 2023, vol. 8, no. 5: e0028823. doi: 10.1128/msphere.00288-23*
18. Lam M.M.C., Wyres K.L., Judd L.M., Wick R.R., Jenney A., Brisse S., Holt K.E. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in Klebsiella pneumonia. *Genome Med., 2018, vol. 10, no. 1: 77. doi: 10.1186/s13073-018-0587-5*
19. Lawlor M.S., O’Connor C., Miller V.L. Yersiniabactin is a virulence factor for Klebsiella pneumoniae 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 Klebsiella pneumoniae 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 Klebsiella pneumoniae 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., Janaszkiewicz J., Rocha E.P.C., Rendueles O. Emergence of novel non-aggregative variants under negative frequency-dependent selection in Klebsiella variicola. *Microlife, 2023, vol. 4: uqad038. doi: 10.1093/femsml/uqad038*
23. Russo T.A., Marr C.M. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *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., 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*
25. 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. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent Klebsiella pneumoniae from classical K. pneumoniae. *J. Clin. Microbiol., 2018, vol. 56, no. 9: 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., Visitacion M.P. Hypervirulent K. pneumoniae secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” K. pneumoniae thereby enhancing its virulence. *PLoS One, 2011, vol. 6, no. 10: e26734. doi: 10.1371/journal.pone.0026734*

27. Schwyn B., Neilands J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem., 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 Klebsiella pneumoniae. In: Microbial genomic islands in adaptation and pathogenicity. Eds: Mani I., Singh V., Alzahrani K.J., Chu D.T. *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 Klebsiella pneumoniae. *Curr. Opin. Microbiol., 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 Klebsiella pneumoniae regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity. *mBio, 2019, vol. 10: e00089-19. doi: 10.1128/mBio.00089-19*
31. Walker K.A., Treat L.P., Sepúlveda V.E., Miller V.L., Heran Darwin K. The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in Klebsiella pneumoniae. *mBio, 2020, vol. 11: e01750-20. doi: 10.1128/mBio.01750-20*
32. Zhu J., Wang T., Chen L., Du H. Virulence factors in hypervirulent Klebsiella pneumonia. *Front. Microbiol., 2021, vol. 12, pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2021.642484*

Авторы:
Рыкова В.А., к.б.н., научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Подладчикова О.Н., к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Анисимова А.С., младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Аронова Н.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Водопьянов А.С., к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Темякова С.Ю., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия;
Гудуева Е.Н., младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону, Россия.

Authors:
Rykova V.A., PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Podladchikova O.N., PhD (Chemistry), Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Anisimova A.S., Junior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Aronova N.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Vodopyanov A.S., PhD (Medicine), Leading Researcher, Molecular Biology Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Temyakova S.Yu., Junior Researcher, Molecular Biology Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation;
Gudueva E.N., Junior Researcher, Laboratory “Collection of Pathogenic Microorganisms”, Rostov-on-Don Scientific Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2024
Принята к печати 09.08.2024

Received 26.03.2024
Accepted 09.08.2024

Иллюстрации к статье «Фенотипический и генетический анализ штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных внебольничной пневмонией в г. Ростове-на-Дону в 2021–2023 гг.» (авторы: В.А. Рыкова, О.Н. Подладчикова, А.С. Анисимова, Н.В. Аронова, А.С. Водопьянов, С.Ю. Темякова, Е.Н. Гудуева) (с. 1104–1116)

Illustrations for the article “Phenotypic and genetic analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from community-acquired pneumonia patients in Rostov-on-Don in 2021–2023” (authors: Rykova V.A., Podladchikova O.N., Anisimova A.S., Aronova N.V., Vodopyanov A.S., Temyakova S.Yu., Gudueva E.N.) (pp. 1104–1116)

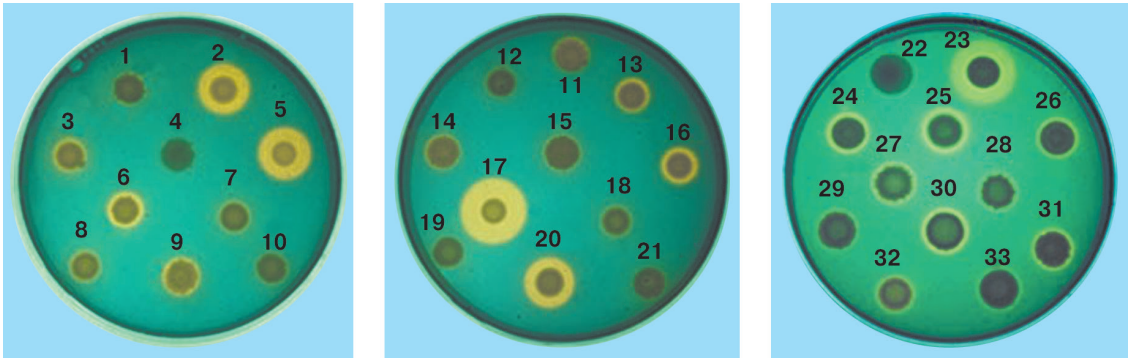
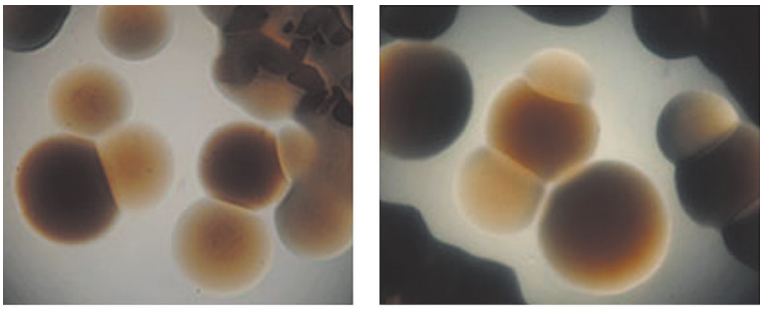


Рисунок 1. Сидерофорная активность 33-х исследованных штаммов *K. pneumoniae* на индикаторной среде для выявления сидерофоров (CAS-агаре)

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



И 9537 И 9941

Рисунок 3. Микрофотографии колоний двух штаммов *K. pneumoniae*: гипермукоидного И-9537 (№ 26) и классического И-9941 (№ 33). Увеличение ×28

Figure 3. Micrographs of colonies of two *K. pneumoniae* strains: hypermucoid I-9537 (No. 26) and classic I-9941 (No. 33). Magnification ×28

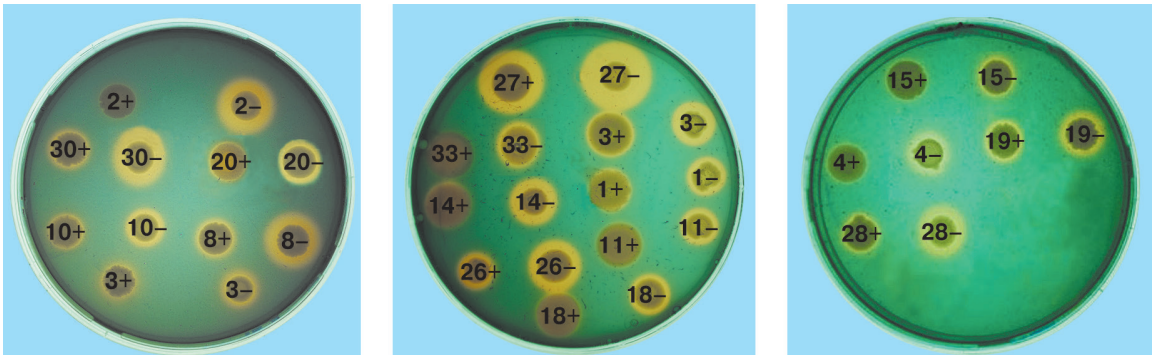


Рисунок 4. Сидерофорная активность клонов, различающихся по морфологии колоний (номер штамма соответствует номеру в таблицах 1–3)

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