

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

На правах рукописи

Чулкова Полина Сергеевна

**Конвергенция вирулентности и антимикробной резистентности  
у *Klebsiella pneumoniae***

1.5.11. Микробиология  
(Биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:  
Член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор  
Сидоренко Сергей Владимирович

Санкт-Петербург – 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	5
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>18</b>
1.1. Морфологические и культуральные свойства <i>K. pneumoniae</i> .....	18
1.2. Клиническое значение <i>K. pneumoniae</i> .....	18
1.3. Характеристика генома <i>K. pneumoniae</i> и их генетическое разнообразие .....	20
1.4. Антимикробная резистентность у <i>K. pneumoniae</i> .....	21
1.4.1. Механизмы антимикробной резистентности .....	21
1.4.2. Клиническое значение антимикробной резистентности <i>K. pneumoniae</i> ..	23
1.4.3. Механизм действия $\beta$ -лактамовых антибиотиков и механизмы резистентности .....	24
1.4.4. Приобретенная резистентность к другим классам антибиотиков.....	30
1.4.5. Вирулентность <i>K. pneumoniae</i> .....	32
1.4.6. Факторы вирулентности <i>K. pneumoniae</i> .....	34
1.4.7. Генетическая локализация детерминант вирулентности.....	42
1.5. Конвергенция MDR и hv .....	44
1.5.1. Пути формирования CR-hvKp.....	45
1.5.2. Клональное распространение конвергентного патотипа <i>K. pneumoniae</i> .	48
1.5.3. Обусловленное гибридными плазмидами, клональное распространение <i>K. pneumoniae</i> , обладающих признаками конвергентного патотипа.....	50
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>54</b>
2.1. Фенотипические методы исследования.....	54
2.1.1. Выделение, идентификация и хранение изолятов .....	54
2.1.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам .....	54
2.1.3. Стринг-тест.....	55
2.2. Генотипические методы исследования.....	56
2.2.1. Детекция генов карбапенемаз и маркера гипервирулентности (выделение ДНК, амплификация) .....	56
2.3. Подготовка библиотек коротких прочтений .....	59
2.4. Секвенирование с получением длинных прочтений.....	59
2.5. Биоинформатический анализ данных.....	60
2.6. Клонирование <i>bla</i> <sub>NDM-29</sub> и <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> .....	62
2.6.1. Амплификация, гель-электрофорез, выделение ДНК.....	62

2.6.2.	Приготовление компетентной культуры клеток <i>E. coli</i> .....	62
2.6.3.	Трансформация .....	63
2.6.4.	Выделение плазмидной ДНК, электрофорез, рестрикция .....	64
2.6.5.	Секвенирование по Сэнгеру.....	66
2.7.	Септическая модель мышей.....	66
2.8.	Обработка результатов исследования.....	67
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>		<b>68</b>
3.1.	Формирование коллекции .....	68
3.2.	Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	71
3.2.1.	Генотипическая оценка изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	71
3.2.2.	Фенотипическая оценка микробиологической активности изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	74
3.3.	Результаты полногеномного секвенирования .....	78
3.3.1.	Генетические детерминанты антибиотикорезистентности в изолятах <i>K. pneumoniae</i> .....	79
3.3.2.	Оценка разнообразия вариантов $\beta$ -лактамаз группы NDM .....	84
3.3.3.	Функциональный анализ <i>bla</i> <sub>NDM-29</sub> .....	87
3.3.4.	Генетические детерминанты вирулентности в изолятах <i>K. pneumoniae</i> .. .....	90
3.4.	Анализ молекулярной эпидемиологии изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	94
3.4.1.	Характеристика плазмидного состава изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	100
3.4.2.	Филогенетический анализ изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	101
3.5.	Детальная характеристика представителей CR-hvKp.....	106
3.5.1.	Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика вирулентности изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	108
3.5.2.	Характеристика геномов репрезентативных изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	109
3.5.3.	Анализ механизма поддержания гибридных плазмид представителей конвергентного патотипа <i>K. pneumoniae</i> .....	118
3.5.4.	Характеристика гибридных плазмид представителей конвергентного патотипа <i>K. pneumoniae</i> .....	120
3.5.5.	Эволюционный путь возникновения гибридных плазмид <i>K. pneumoniae</i> .....	123
3.6.	Оценка уровня вирулентности <i>in vivo</i> изолятов с различным набором генов вирулентности в септической модели на мышах.....	127
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>		<b>129</b>

4.1. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика антибиотикорезистентности изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	129
4.2. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика вирулентности изолятов <i>K. pneumoniae</i> .....	132
4.3. Особенности эпидемиологии CR-hvKp .....	133
4.4. Гибридные плазмиды CR-hvKp .....	136
4.5. Распространение и механизм возникновения гибридных плазмид <i>K. pneumoniae</i> .....	138
Заключение .....	140
Выводы .....	142
Практические рекомендации .....	143
Список используемых сокращений и обозначений .....	144
Список использованной литературы.....	151

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) – микроорганизм, который на протяжении последних десятилетий, по данным ряда исследований, стабильно входит в тройку ведущих патогенов в этиологии широкого круга внебольничных и госпитальных инфекций, представляя серьезную проблему для здравоохранения [44].

Варианты взаимоотношений хозяин-паразит между клебсиеллами и человеком варьируют в широких пределах от бессимптомного носительства до патогенности. На сегодняшний день у клебсиелл, как и других возбудителей инфекционных болезней, можно выделить два основных свойства, определяющих их значимость для здравоохранения: вирулентность и антимикробную резистентность. С момента описания двух патотипов возможность совмещения этих свойств в одной генетической линии была темой научных дискуссий и рассматривалась как одна из фундаментальных проблем микробиологии. Долгий период времени преобладало мнение о низкой вероятности подобного сценария, в том числе и в отношении *K. pneumoniae* с учетом того, что в значительной части случаев, детерминанты вирулентности и антимикробной резистентности локализованы на подвижных генетических элементах и приобретение большого количества дополнительного генетического груза неизбежно приведет к снижению адаптивности и конкурентоспособности микроорганизма. Во многом это определяется геномикой и популяционной структурой *K. pneumoniae*. Геном типичных штаммов *K. pneumoniae* представлен 5000-6000 генами, из которых приблизительно 1 700 относятся к «ядерному» геному, а остальные, в том числе и большинство генов резистентности и вирулентности – к вспомогательному. Вспомогательный геном у отдельных изолятов *K. pneumoniae* крайне

вариабелен, благодаря чему размер пан-генома (сумма ядерных и всех известных вспомогательных генов) может достигать 30 000 [58].

На основании филогенетического анализа глобальной популяции *K. pneumoniae* в ней удастся выделить несколько сотен обособленных генетических линий, обозначаемых как CG (clonal groups – клональные группы) [162]. По выраженности таких свойств, как вирулентность и антимикробная резистентность, среди отдельных CG наблюдается широкая вариативность, однако при этом проявляется четкая тенденция: у представителей отдельных групп проявляется либо повышенная вирулентность, либо резистентность. С генотипическим разделением популяции *K. pneumoniae* в значительной степени совпадает и фенотипическая дифференцировка популяции *K. pneumoniae* на два патотипа: классические *K. pneumoniae* (сКр) и гипервирулентные (hvКр).

Исторически, первое описание возбудителя тяжелых пневмоний с высоким уровнем летальности, именуемого бациллой Фридендера, относят к 1882 г. В рамках современной микробиологии первые упоминания о hvКр датируются 1986 годом [92]. С тех пор hvКр долгое время считались специфичными для внебольничной среды в странах тихоокеанского региона. Для hvКр характерны низкие летальные дозы в мышинной модели сепсиса ( $LD_{50} < 10^3$  КОЕ/мл), обусловленные наличием неконъюгативной консервативной плазмиды pLVPK, а также сохранение чувствительности к антибиотикам. HvКр вызывают заболевания, характеризующиеся многоочаговым поражением с метастатическим распространением из первичного очага инфекции, могут быть причиной инвазивного абсцесса печени, гнойно-воспалительных заболеваний поражения центральной нервной системы, некротического фасциита или эндофтальмита у исходно здоровых лиц [69]. Для нормального метаболизма клебсиелл необходима продукция сидерофоров, связывающих ионы железа из внешней среды. К хромосомным сидерофорам относят энтеробактин, продуцируемый всеми клебсиеллами, и иерсиниобактин. HvКр характеризуются наличием двух дополнительных плазмидно-локализованных

сидерофоров – сальмохелина и аэробактина, чаще относятся к капсульным типам K1 и K2.

СКр, характерные для внутрибольничной среды, обладают низкой вирулентностью, но часто проявляют множественную устойчивость к антибиотикам (multiple drug resistance – MDR). В 2013 г. центр по контролю и профилактике заболеваний США (Centre for disease control – CDC) опубликовал список возбудителей, представляющих непосредственную угрозу здоровью населения, в число которых вошли *Enterobacteriaceae*, устойчивые к карбапенемам, считающимся на сегодняшний день препаратами выбора при лечении наиболее тяжелых инфекций. В 2017 году ВОЗ подтвердила распространяющуюся угрозу карбапенем-устойчивых *Enterobacteriaceae*, а также ряда других патогенов, требующих приоритетности в разработке новых антибиотиков.

Принципиальное изменение ситуации произошло в 2018 году, когда в Китае была описана внутрибольничная вспышка, вызванная множественно резистентной клебсиеллой, но с уровнем летальности, характерным для hvKp [47]. С тех пор стало появляться всё больше и больше сообщений по распространению конвергентных изолятов *K. pneumoniae*, объединяющих оба патотипа, которые могут вызывать высокую летальность в том или ином лечебном учреждении.

Существует несколько эволюционных путей формирования генетических линий *K. pneumoniae*, демонстрирующих высокую вирулентность и устойчивость к карбапенемам, и все они связаны с горизонтальным переносом генов: приобретение каноническими вирулентными линиями плазмид с генами резистентности или же приобретение плазмид с основными маркерами гипервирулентности генетическими линиями, характеризующимися множественной резистентностью. На сегодняшний день растет число публикаций о случаях обнаружения *K. pneumoniae*, несущих несколько плазмид, каждая из которых содержит либо гены вирулентности, либо резистентности, однако данные о гибридных плазмидах, несущих

одновременно детерминанты резистентности к карбапенемам и гены вирулентности, крайне ограничены.

Остается открытым вопрос о роли отдельных генов вирулентности в экспрессии гипервирулентного и конвергентного патотипов.

### **Степень разработанности темы исследования**

Ретроспективный анализ коллекций клебсиелл [90], показал, что появление гипервирулентных карбапенем-устойчивых клебсиелл (CR-hvKp) относят к 2008 г., тем не менее, конвергенция свойств двух патотипов клебсиелл представляет собой относительно новое явление, многие детали проявления которого не ясны.

В Великобритании описано 12 изолятов *K. pneumoniae*, несущих гибридные плазмиды, относящихся к внутрибольничным генетическим линиям (ST15, 48, 101, 147 и 383). Идентичные плазмиды были обнаружены в Швейцарии (у семи изолятов) и Тоскане во время описания вспышки в 2018-2021 гг., вызванной теми же генетическими линиями клебсиелл. Идентичные двум другим английским гибридным плазмидам также были выявлены в Египте (ST11, 383), Чехии и на Среднем Востоке (ST15, 377). Таким образом, мы наблюдаем распространение «английских» плазмид по европейскому континенту, юго-западу и России. Также, гибридные плазмиды, несущие комбинацию признаков двух патотипов клебсиелл, на сегодняшний день были описаны в Германии (ST307), Китае (ST11), Японии (ST147).

До момента проведения данного исследования [144], в России не публиковалось данные о конвергентных изолятах *K. pneumoniae* с подтвержденными гибридными плазмидами, несущими гены карбапенемаз и гипервирулентности одновременно. Однако в 2023 г. были описаны CR-hvKp ST39, 512, несущих гибридную плазмиду, причём в первом случае, три изолята, также несли две другие плазмиды с карбапенемазами NDM-1 и KPC-2.



## **Цель исследования**

Оценить распространение и охарактеризовать генетические линии *K. pneumoniae*, обладающие признаками конвергентного патотипа.

## **Задачи исследования**

1. Сформировать коллекцию изолятов *K. pneumoniae*, с признаками классического, гипервирулентного и конвергентного патотипов.

2. Провести фенотипическую и генотипическую характеристику изолятов *K. pneumoniae*, включенных в коллекцию, отобрать изоляты с признаками конвергентного патотипа.

3. Провести секвенирование геномов, отобранных изолятов на платформах Illumina и Oxford Nanopore, охарактеризовать их резистом и вирулом.

4. Расшифровать структуру гибридных плазмид, одновременно несущих гены устойчивости к карбапенемным антибиотикам и вирулентности.

## **Научная новизна**

Установлено, что одним из направлений эволюции *K. pneumoniae* в госпитальных условиях является формирование конвергентного патотипа – генетических линий, обладающих одновременно фенотипическими признаками и генетическими маркерами повышенной вирулентности и множественной антимикробной резистентности. Показано, что ведущим и потенциально наиболее опасным механизмом возникновения конвергентного патотипа *K. pneumoniae* является формирование гибридных плазмид, несущих одновременно гены антимикробной резистентности и повышенной вирулентности и обладающих способностью к конъюгативному переносу.

Однотипные гибридные плазмиды длиной более 300 т.п.о., несущие одновременно гены карбапенемаз NDM-типа и гены, связанные с повышенной вирулентностью обнаружены среди *K. pneumoniae*, относящихся к генетическим линиям ST395, ST147, ST15, ST874. Сравнительный генетический анализ выявил распространение указанных генетических линий

на значительных географических территориях, включающих Азиатские и Европейские регионы Российской Федерации, Европу, Северную Африку и Северную Америку. На фоне формирования гибридных плазмид продолжается эволюция карбапенемаз NDM-типа, проявившаяся в формировании нового варианта карбапенемазы NDM-типа (NDM-29).

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Теоретическая значимость работы заключается в выявлении нового биологического феномена – формирования стабильных гибридных плазмид, несущих одновременно гены антимикробной резистентности, и их распространения среди различных генетических линий *K. pneumoniae*. Распространение гибридных плазмид является наиболее важным механизмом формирования конвергентного патотипа *K. pneumoniae*, сочетающего свойства классического и гипервирулентного патотипов. Угроза распространения гибридных плазмид может представлять принципиальную опасность для других бактерий. Это основано на опыте быстрого распространения генов антибиотикорезистентности, а также появления изолятов *Escherichia coli*, несущих плазмиды с генами карбапенемаз и детерминант вирулентности одновременно.

Практическая значимость работы состоит в выявлении в России высокой частоты распространения среди CRKp, генов биосинтеза аэробактина (80%), являющихся основными маркерами гипервирулентности, что свидетельствует о широком распространении конвергентного патотипа, представляющего серьезную угрозу здравоохранению в связи с потенциально повышенной летальностью при соответствующих инфекциях. Полученные данные о новой биологической угрозе должны быть основой для разработки мер по сдерживанию распространения подобных генетических линий. Получен патент «Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемого в качестве тест-культуры при детекции гена NDM методом полимеразной цепной реакции для

точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиеллёзных инфекций».

Полученные результаты внедрены в практическую работу ФГБУ НИИДИ ФМБА России (акт внедрения от 9.04.2024), ГБУ Спб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе (акт внедрения от 21.05.2024).

### **Перспективы дальнейшего изучения**

Полученные результаты не полностью охватывают все аспекты клинико-микробиологической характеристики инфекций, вызванных изолятами *K. pneumoniae* с маркерами hv. Для понимания эпидемиологии CR-hvKp необходимо провести крупномасштабное исследование по определению признаков клинического течения инфекций, вызванных различными группами *K. pneumoniae*, выделяемыми на основе наличия наборов фенотипических, генетических и клинических маркеров hv.

Появляется необходимость создания тест-системы по детекции CR-hvKp, проявляющих высоко вирулентные свойства, для рутинного использования в лечебно-профилактических учреждениях. Для определения комбинации генетических детерминант, влияющей на способность клетки вызывать инфекцию, характерную для hvKp, необходимо провести оценку вирулентности на септической модели мышей трансформантов, несущих векторы с различным набором маркеров вирулентности.

В большинстве коллекций преобладают клинические изоляты, однако полногеномное секвенирование образцов окружающей среды или изолятов, выделенных от сельскохозяйственных или домашних животных, может дать представление о передаче генов MDR. Данный анализ позволит выявить разнообразие гибридных плазмид во внебольничной среде.

Дальнейшее исследование эпидемиологии CR-hvKp с использованием полногеномных данных секвенирования послужит основой для принятия решений по инфекционному контролю за счет выявления основных резервуаров *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа.

## **Личное участие автора в получении результатов**

Аналитическая и экспериментальная и часть диссертационной работы выполнены самостоятельно, за исключением экспериментов на мышах, которые проводились Брянской межрегиональной ветеринарной лабораторией. Работа проводилась в рамках гранта Российского научного фонда в период 2018-2021 гг. «Механизмы формирования успешных генетических линий множественно резистентных гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae*», руководитель Агеевец И.В. (номер проекта: 18-75-10117). Отдельные этапы работы выполнены совместно с коллегами НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России. Часть работы по полногеномному секвенированию была проведена совместно с сотрудниками ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, а также работы по клонированию проведены совместно с коллегами из Центра трансгенеза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Распространенные на территории Российской Федерации изоляты *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа, продуцирующие карбапенемазы NDM-, OXA-48- и KPC-типов, а также несущие маркер вирулентности (*iucA*), относятся к 19-ти различным сиквенс-типам, среди которых ST395 и ST147, принадлежат к генетическим линиям, доминирующим в Европе, и ST23, ST11, ST86 – в Азии.

2. Проявление конвергентного патотипа *K. pneumoniae* связано с распространением в различных генетических линиях консервативных гибридных плазмид IncFIB/IncHI1B типа, содержащих одновременно гены карбапенемаз и гены вирулентности.

3. Плазмиды, на которых одновременно локализованы гены карбапенемаз и *h<sub>v</sub>*, представляют собой генетические конструкции, содержащие два или три репликона и состоящие преимущественно из фрагментов плазмиды pNDM-MAR, с которой связано распространение генов *bla*<sub>NDM</sub>-типа начиная с

2012 года, и фрагментов плазмиды pLVPK, описанной в 1986 году в тихоокеанском регионе, что позволяет называть их «гибридными». Впервые в мире было продемонстрировано распространение стабильной сформировавшейся гибридной структуры, не ограниченное отдельными генетическими линиями *K. pneumoniae*.

### **Апробация и публикация материалов диссертации**

1. Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии, XXII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 2019; XXV Кашкинские чтения, Санкт-Петербург 2022; XXVI Кашкинские чтения Санкт-Петербург, 2023.

2. XXXXII Итоговая научно-практическая конференция «Актуальные вопросы инфекционных заболеваний у детей», Санкт-Петербург, 2020.

3. The 30rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Paris, France 2020, online; 31st ECCMID 2021, Vienna, Austria, online; 32th ECCMID 2022, Lisbon, Portugal, online; 33th ECCMID 2023, Copenhagen, Denmark, online.

4. Сириус.Биотех, Саммит разработчиков лекарственных препаратов, Конференция для молодых ученых «Будущее антимикробной терапии», Сочи, 2023.

5. Молекулярная Диагностика (MOLDx), Москва, 2023.

6. Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемый в качестве тест-культуры при детекции гена *bla<sub>NDM</sub>* методом полимеразной цепной реакции для точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиелёзных инфекций. Патент № 2797025 РФ, МПК C12N 1/20 (2006.01). № 2022120911; Заявл. 29.07.2022; Оpubл. 30.05.2023, Бюл.№16.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации в  
рецензируемых журналах, входящих в наукометрические базы данных, из  
списка ВАК и приравненных к ним:**

1. Лазарева, И.В. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию / И. Лазарева, **П. Старкова**, В. Агеевец, М. Волкова, М. Лебедева, А. Навацкая, Е. Мясникова, Г. Митрошина, С. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия – 2018. – Т. 63. – № 11–12. – С. 18–23.

2. Lazareva, I. The emergence of hypervirulent *bla*<sub>NDM-1</sub>-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital / I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, M. Lebedeva, **P. Starkova**, D. Likholetova, V. Gostev, V. Moiseenko, V. Egorenkov, A. Navatskaya, G. Mitroshina, E. Myasnikova, I. Tsvetkova, Y. Lobzin, S. Sidorenko // Infection, Genetics and Evolution – 2020. – P. 1–17.

3. **Starkova, P.** Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia / P. Starkova, I. Lazareva, A. Avdeeva, O. Sulian, D. Likholetova, V. Ageevets, M. Lebedeva, V. Gostev, J. Sopova, S. Sidorenko // Antibiotics – 2021. – 10, 691. – P. 1–13.

4. Агеевец, В.А. Сравнительная активность карбапенемных антибиотиков в отношении грамотрицательных продуцентов карбапенемаз различных групп / Агеевец В. А., Сулян О. С., Авдеева А. А., **Чулкова П. С.**, Гостев В. В., Агеевец И. В., Голикова М. В., Алиева К. Н., Гладин Д. П., Сидоренко С. В. // Антибиотики и химиотерапия – 2022. – Т. 67. – № 1–2. – С. 9–15.

5. Пат. 2797025 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 (2006.01). Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемый в качестве тест-культуры при детекции гена NDM методом полимеразной цепной реакции для точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиелёзных инфекций / **Чулкова П.С.**, Агеевец И. В., Авдеева А. А., Сулян О. С., Лихолетова Д. В., Агеевец В. А., Лебедева М. С., Гостев В. В., Сопова Ю. В., Сидоренко С. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное

бюджетное учреждение "Детский научноклинический центр инфекционных болезней Федерального медикобиологического агентства". – № 2022120911; заявл. 29.07.2022; опубл. 30.05.2023, Бюл.№16. – 3с. : ил.

#### **Другие публикации в рецензируемых журналах:**

«Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию в один из специализированных стационаров Санкт-Петербурга» (2019, Санкт-Петербург). Российско-Китайский Конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XXII Кашкинские чтения), 12-15 июня 2019 г. / **Старкова П.С.**, Лазарева И.В., Агеевец В.А., Волкова М., Лебедева М., Навацкая А., Мясникова Е., Митрошина Г., Сидоренко С. // Проблемы медицинской микологии – 2019. – Т. 21. – № 2. – С. 132–133.

#### **Результаты исследований, опубликованные в материалах конференций:**

1. «Эпидемиологическая и микробиологическая характеристика *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга» (2020, Санкт-Петербург). Российско-Китайский Конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XXIII Кашкинские чтения), 9-11 ноября 2019 г. / Мироненко О.В., Сельничева В.В., Сопрун Л.А., Шмушкевич Е.Н., Алексеев А.Ю., Иванов А.С., Тованова А.А., **Старкова П.С.**, Набока В.А. // Антибиотики и химиотерапия – 2020. – Т. 22. – № 3. – С. 105.

2. «The emergence of new STs of *bla*<sub>NDM</sub>-positive hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in an oncology hospital, Russia» (2020, Paris). 30th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 18-21 April 2020 / **P.S. Starkova**, O.S. Sulyan, D.V. Likholetova, V.A. Ageevets, I.V. Lazareva, J.V. Sopova, S.V. Sidorenko // 30th ECCMID 2020 abstract book – С. 3397.

3. «Detection of the novel variant of NDM-type metallo-β-lactamase: significance of D130N amino acid substitution» (2020, Paris). 30th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 18-21 April 2020 / **P.**

**Starkova, I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, V. Gostev, I. Tsvetkova, M. Lebedeva, S. Sidorenko // 30th ECCMID 2020 abstract book – С. 4307.**

4. «Клинические синдромы, характерные для инфекции, вызываемой гипервирулентными полирезистентными штаммами *K. pneumoniae*, циркулирующими в Санкт-Петербурге» (2020, Санкт-Петербург). XII Всероссийский ежегодный конгресс «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика», 11-12 октября 2021 г. / Агеев И.В., **Старкова П.С.**, Агеев В.А., Цветкова И.А., Гостев В.В., Никитина Е.В., Калиногорская О.С., Сидоренко С.В. / Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика. – Том 13 (4). – 2021. – с. 27–28.

5. «Emergence of the hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia» (2021, online). 31th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 9-12 July 2021 / **P. Starkova**, A. Avdeeva, D. Likholetova, I. Lazareva, V. Ageevets, V. Gostev, J. Sopova, S. Sidorenko // 31th ECCMID 2021 abstract book.

6. «Multiclonal dissemination of multi-drug resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in Moscow and Saint Petersburg hospitals» (2022, Portugal). 32th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 23-26 April 2022 / V. Ageevets, I. Ageevets, **P. Chulkova**, M. Dyachkova, A. Matsvay, V. Shapovalova, Y. Savochkina, O. Sulian, I. Tsvetkova, G. Shipulin, S. Sidorenko // 32th ECCMID 2022 abstract book.

7. «Emergence of *Escherichia coli* harboring mosaic (hypervirulent and multidrugresistant) plasmids that may have been acquired from *Klebsiella pneumoniae*» (2023, Copenhagen). 33th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 15-18 April 2023 / **P. Chulkova**, V. Ageevets, O. Sulian, A. Avdeeva, V. Shapovalova, A. Matsvay, V. Nurmukanova, G. Shipulin, T. Chernenkaya, S. Sidorenko // 33th ECCMID 2023 abstract book.

### **Объем и структура диссертационной работы**

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка



литературы. Библиографический список литературы включает 177 источников литературы, в том числе 6 отечественных и 171 иностранных. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами и 23 рисунками.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

*Klebsiella pneumoniae* – один из наиболее значимых и широко распространенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Род *Klebsiella* был назван учёным Витторе Тревисаном в 1887 году в честь немецкого микробиолога 19 века Эдвина Клебса, который выявил бактерии, наблюдаемые в дыхательных путях умерших от пневмонии людей.

Успех патогена следует модели «лучшее нападение – это хорошая защита». Примером этого является способность этих бактерий уклоняться и расти на многих участках организма хозяина, адаптироваться к агрессивному действию антимикробных препаратов, а не подавлять многие компоненты иммунной системы [110].

### 1.1. Морфологические и культуральные свойства *K. pneumoniae*

*K. pneumoniae* представляют собой грамотрицательные факультативно-анаэробные, капсульные мелкие коккобациллы. Они не образуют спор, неподвижны, способны к образованию капсул, располагаются одиночно, попарно и скоплениями, легко окрашиваются анилиновыми красителями. Культивируется на простых питательных средах при 37°C: на плотных питательных средах образует блестящие, выпуклые, слизистые колонии, на жидких средах вызывает диффузное помутнение.

*K. pneumoniae* способна жить в окружающей среде, на слизистых поверхностях млекопитающих, медицинском оборудовании и бессимптомно колонизировать медицинский персонал. Первые включают почву, воду, ряд видов растений, насекомых, птиц, рептилий и большое число млекопитающих, у которых эта бактерия может быть либо организмом-комменсалом, либо потенциальным патогеном.

### 1.2. Клиническое значение *K. pneumoniae*

В свете растущего распространения *K. pneumoniae* по всему миру и усиления тяжести, вызываемых ею инфекций, значимость изучения данного

патогена не вызывает сомнений. *K. pneumoniae* является оппортунистическим патогеном, известным как возбудитель внутрибольничных инфекций во всём мире и вызывающим различные заболевания: пневмонии, инфекции мочевыводящих путей, бактериемии, абсцессы печени поражения респираторного, желудочно-кишечного тракта, центральной нервной системы, поражения, глаз, кожные инфекции. Бессимптомное носительство клебсиелл в желудочно-кишечном тракте выявляется у 5-38% здоровых людей [118].

Отмечается, что в госпитальных условиях носительство *K. pneumoniae* в нормальной флоре прямо коррелирует с инфекцией, вызванной *K. pneumoniae*, что указывает на то, что ближайшим источником большинства инфекций *K. pneumoniae* является микробиота человека [43, 112, 131]. *K. pneumoniae* часто распространяется через руки медицинских работников, медицинское оборудование или катетеры, где последние служат субстратом для образования биопленок [48, 101, 124, 145]. Вследствие этого бессимптомная колонизация *K. pneumoniae* зависит от предыдущих госпитализаций или прохождения длительного курса лечения антибиотиками. Наблюдалась разница в четыре раза в количестве пациентов-носителей *K. pneumoniae* в кишечнике, у которых развилась клебсиеллёзная инфекция в течение трёх недель после госпитализации, по сравнению с неносителями [133].

Исторически внебольничные инфекции, вызванные *K. pneumoniae*, были ассоциированы с хроническим алкоголизмом, обструктивной болезнью легких и диабетом [95, 120, 142]. В настоящее время клебсиеллы чаще вызывают госпитальные инфекции у пациентов с коморбидностью: помимо вышеупомянутых, к факторам риска инфекций относят пациентов, поступивших в отделение интенсивной терапии, пациентов со злокачественными новообразованиями, хроническими заболеваниями печени, подвергшихся трансплантации цельных органов и диализу [98, 154], а также состояния, повышающие риск аспирации микробов, такие как лучевую терапию и эндотрахеальную интубацию [60]. Пожилые люди и новорожденные представляют собой когорту пациентов с самым высоким риском смертности от

инфекций, вызванных *K. pneumoniae*. Данный микроорганизм часто является возбудителем сепсиса у новорожденных и основной причиной неонатального сепсиса в Африке [109] и Азии [132]. Относительно пожилых людей, смертность, ассоциированная с внебольничной пневмонией, вызванной *K. pneumoniae*, составила 30% [151].

### **1.3. Характеристика генома *K. pneumoniae* и их генетическое разнообразие**

На основании анализа ядерного генома глобальной популяции *K. pneumoniae* методами MLST в ней удается выделить несколько сотен обособленных генетических линий, представляющих разветвленную клональную структуру и обозначаемых как ST (sequence types – сиквенс-типы) и CG [165]. Это указывает на раннее разделение на сотни различных, равноудаленных клонов, что может быть вызвано адаптивным отбором или результатом генетического дрейфа.

По выраженности таких важных свойств как вирулентность и антимикробная резистентность отдельные CG варьируют в широких пределах, однако при этом проявляется четкая тенденция: у представителей отдельных групп проявляется либо повышенная вирулентность, либо резистентность. С генотипическим разделением популяции *K. pneumoniae* в значительной степени совпадает и фенотипическая дифференцировка популяции *K. pneumoniae* на два патотипа: cKp и hvKp.

Среди множества генетических линий клебсиелл выделяют группу наиболее широко распространенных, которые вносят непропорционально большой вклад в глобальное бремя болезней, обозначаемую как клоны высокого риска. Они включают географически широко распространенные MDR-CG, например, резистентные к цефалоспорином третьего поколения и/или карбапенемам (CG15, CG20, CG29, CG37, CG147, CG101, CG307, среди которых наиболее известной является CG258). Однако существуют определенные географические различия в их вкладе в бремя инфекций,

вызванных MD-CG. Так, например, в США наиболее распространенными ST были эндемичные клоны высокого риска ST258 и ST307 [68].

Nv генетические линии также входят в состав клонов высокого риска, у которых в отличие от инфекций MDR патогенами преобладают одни и те же генетические линии во всех регионах. Наиболее распространенной является CG23, за которой следуют CG65 и CG86, CG25, CG66, CG380, распространенные в меньшей степени. CG23 недавно была отнесена к одной из наиболее распространенных линий, ассоциированных с инфекциями кровотока *K. pneumoniae* в Китае, Вьетнаме и Лаосе. Доля *K. pneumoniae*, относящихся к CG23, составила  $> 10\%$  изолятов, что представляет собой высокую распространенность в Азиатско-Тихоокеанском регионе [163, 175]. Однако в других регионах ST23 составляет  $\leq 2\%$  клинических изолятов, несмотря на более длительную циркуляцию по сравнению с распространенными MDR-CG [55, 103].

При этом зачастую факторы влияющие на частоту, вероятность и продолжительность описанных вспышек локальных проблемных клонов, которые не вызывают инфекции повсеместно (ST70 и ST323), как описанные в Килифи и Мельбурне [45, 57], остаются неизвестны.

#### **1.4. Антимикробная резистентность у *K. pneumoniae***

##### **1.4.1. Механизмы антимикробной резистентности**

Начало современной «эры антибиотиков» чаще всего связывают с именами Пауля Эрлиха и Александра Флеминга. Однако нельзя забывать имена Герхарда Домагка, Рене Дюбуа, Зелмана Ваксмана. Эрлих утверждал, что можно синтезировать химические соединения, которые «были бы способны оказывать свое действие исключительно на паразита, затаившегося в организме», а не на клетки хозяина [17].

Устойчивость к противомикробным препаратам появилась задолго до вмешательства *Homo sapiens* в борьбу с инфекциями, поскольку доказана эволюция механизмов резистентности в удаленных от деятельности человека

районах [122]. Фактически, продуценты антибиотиков являются первоисточником многих генов устойчивости к антимикробным веществам, циркулирующих сегодня в клиниках, в качестве защиты от собственных токсичных метаболитов. Позднее во время активного применения антибиотиков детерминанты устойчивости распространились от свободноживущих бактерий микроорганизмам, составляющим человеческую микробиоту.

Известно о пяти основных группах механизмов антибактериальной резистентности. Модификация мишени антибиотика в результате спонтанных мутаций в их генах, инактивация молекулы антибиотика, активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюксные насосы), потеря или снижение уровня экспрессии поринов, что приводит к снижению проницаемости внешних мембран клетки [83]. Защита мишени является одним из наименее изученных механизмов антибактериальной резистентности. Его суть заключается в способности бактерий синтезировать белки, препятствующие связыванию антибиотиков с мишенью без её модификации. Несмотря на большое разнообразие механизмов биохимической резистентности, генетической основой формирования устойчивости к антибиотикам является модификация собственного генома (аминокислотные замены, делеции, инсерции) в генах-мишенях, системах эффлюкса, пориновых белках, а также приобретение новых детерминант резистентности на мобильных генетических элементах (МГЭ – плаزمиды, транспозоны) [97].

К основным механизмам распространения генов антибиотикорезистентности относятся горизонтальный перенос и клональное распространение резистентных бактерий. В клональной структуре бактериальных популяций гены, кодируемые хромосомами, передаются от материнской клетки к дочерней, а новые аллели, возникшие в результате мутации, остаются в той генетической линии, в которой они возникли. По мере накопления различных генов каждая линия приобретает характерную комбинацию детерминант. В клональной популяции новый аллель,

обуславливающий устойчивость к антибиотикам, останется в генетической линии, в которой он возник, и неизменно будет связан с другими характеристиками линии, такими как антигены серотипа. Горизонтальный перенос генов повышает возможности распространения фенотипа устойчивости к антибиотикам. Частый горизонтальный генетический обмен может нарушить клональную структуру путем распределения детерминант между линиями. Таким образом, стабильность клональных популяционных структур зависит больше от скорости, с которой происходит горизонтальный перенос, нежели от скорости клонального распространения. В популяциях с частым приобретением МГЭ, ассоциация определенных маркеров, таких как устойчивость к антибиотикам или серологические характеристики, может быть потеряна. Несмотря на то, что у *K. pneumoniae* все генетические линии подвергаются воздействию плазмид, несущих гены резистентности, некоторые сиквен-типы поддерживают их только временно. Напротив, глобально распространённые MDR-CG поддерживают специфические гены и плазмиды, несущие гены устойчивости, на протяжении десятилетий клональной экспансии [162]. Таким образом, обнаружение плазмид, несущих детерминанты резистентности у редких ST внутрибольничных изолятов *K. pneumoniae*, можно объяснить случайным приобретением плазмид от других энтеробактерий в кишечнике, которые сохраняются в условиях стационара в результате селективного воздействия антибиотиками, но быстро элиминируются при прекращении терапии или передаче другому хозяину [162].

#### **1.4.2. Клиническое значение антимикробной резистентности**

##### ***K. pneumoniae***

В работе, описывающей бремя резистентности, оценивали количество смертей, вызванных и связанных со MDR патогенами, где среди шести наиболее актуальных возбудителей *K. pneumoniae* стоит на третьей позиции. В 2019 году количество смертей, которые были связаны с инфекциями, вызванными *K. pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам (MDR-Kp), составило около 150000, а инфекциями, ассоциированными с MDR-

Кр – более 600 000. В случае инфекций, связанных с резистентностью, CRКр вызвали 55700 смертей и *K pneumoniae* резистентные к цефалоспорином третьего поколения – 50100 [18].

В основном фенотип резистентности *K pneumoniae* обусловлен адаптивной устойчивостью ко многим противомикробным препаратам в результате приобретения детерминант резистентности посредством горизонтального переноса генов или изменения экспрессии собственных генов. Тем не менее, данный микроорганизм обладает также и природной резистентностью к некоторым антибиотикам. Природная резистентность представляет собой свойство бактериального вида, которое не было сформировано в результате использования антибиотиков в терапии [40]. Природная резистентность микроорганизма объясняется отсутствием мишени действия антибиотика. К природной резистентности *K. pneumoniae* относят резистентность к ампициллину, амоксициллину и тикарциллину из-за наличия на хромосоме пенициллиназы SHV-типа, которая была впервые обнаружена на плазмиде в 1973 г [125]. Описана мобилизация гена *bla<sub>SHV</sub>* транспозазой IS26 из хромосомы *K. pneumoniae*, которая способствовала распространению β-лактамазы посредством передачи плазмид среди других видов бактерий [42, 86]. Говоря о приобретенной резистентности *K pneumoniae*, нужно отметить, что «золотая эра антибиотикотерапии» служила отправной точкой в эволюции предшественников множества современных вариантов детерминант резистентности, в результате чего произошло распространение MDR генетических линий основных клинически-значимых микроорганизмов.

#### **1.4.3. Механизм действия β-лактамных антибиотиков и механизмы резистентности**

В 2013 подсчитано, что ежегодные расходы на β-лактамные антибиотики составляют примерно 15 миллиардов долларов США, что составило 65% всего рынка антибиотиков [111]. В течение более тридцати лет важнейшей группой β-лактамов были карбапенемные антибиотики, которые играли ключевую роль в этиотропной терапии нозокомиальных инфекций. Так, карбапенемы



применялись при выявлении устойчивости патогена к другим классам антибактериальных препаратов, логичным следствием чего являлось формирование и распространение устойчивости к карбапенемным антибиотикам, ставшее основной проблемой в клинической практике.

$\beta$ -лактамы оказывают бактерицидное действие за счет угнетения ферментов, участвующих в синтезе клеточной стенки бактерий. Пептидогликан выполняет структурную роль, поддерживая форму клетки в гипертонической среде, противодействуя осмотическому давлению цитоплазмы и участвуя в клеточном делении. Структурное сходство  $\beta$ -лактамов и концевых аминокислотных остатков D-аланил-D-аланина облегчает их связывание с активным центром пенициллин-связывающего белка (ПСБ). Исходно данный фермент сшивает аминокислоты разных полисахаридных цепей, однако в случае действия антибиотика, ПСБ связывает его молекулу, принимая за строительный блок. Таким образом, ядро молекулы  $\beta$ -лактама необратимо связывается с сериновым остатком в активном центре ПСБ, что предотвращает окончательную транспептидацию зарождающегося пептидогликанового слоя, повышая проницаемость мембраны и, в конечном итоге, нарушая синтез клеточной стенки [111].

Устойчивость к  $\beta$ -лактамам может формироваться за счёт разных механизмов, среди которых модификация собственного генома обусловленная мутациями в ПСБ, системах эффлюкса или пориновых белках. Однако основным механизмом является приобретение новых детерминант устойчивости к антибактериальным препаратам с МГЭ – одной или нескольких различных  $\beta$ -лактамаз.

Карбапенемазы представляют собой наиболее разнообразную группу  $\beta$ -лактамаз, способных гидролизовать все типы  $\beta$ -лактамов, включая карбапенемы, при этом в большинстве случаев сохраняя устойчивость к коммерчески доступным ингибиторам  $\beta$ -лактамаз [23]. Гены, кодирующие карбапенемазы, обычно располагаются на МГЭ, таких как транспозоны или последовательности вставки, в свою очередь локализованные на плазмидах, что

способствует их быстрому распространению во внутрибольничной среде. То, что когда-то считалось проблемой клонального распространения, теперь стало глобальной проблемой межвидовой экспансии. По скорости распространения карбапенемаз можно предположить, что их гены за счет локализации на эволюционно более успешных МГЭ смогут распространяться быстрее, чем их функциональные предшественники [1].

По классификации Амблера, карбапенемазы делят на сериновые  $\beta$ -лактамазам (СБЛ), относящиеся к классам А, D с серином в активном центре, и металло- $\beta$ -лактамазы (МБЛ), с двумя атомами цинка в активном центре, относящиеся к классу В. В настоящее время наиболее актуальными карбапенемазами во всем мире являются КРС, ОХА, IMP, VIM и NDM, при этом среди клебсиелл преобладающие карбапенемазы являются специфичными для разных регионов.

КРС (карбапенемаза *K. pneumoniae*) является наиболее распространенным ферментом среди СБЛ молекулярного класса А. Впервые фермент КРС-1 был описан в Северной Каролине (США) в 2001 г. [172], в последующее десятилетие бактерии, продуцирующие КРС, распространились по США и всему миру. Продуценты КРС устойчивы ко всем группам  $\beta$ -лактамных антибиотиков, но плохо поддаются действию клавулановой кислоты и тазобактама, однако ингибируются авибактамом и ваборбактамом [23], кроме описанных случаях мутаций *bla*<sub>КРС-3</sub>, обуславливающих устойчивость к цефтазидиму-авибактаму [50]. На сегодняшний день известно о 216 вариантах КРС (доступных в генбанке NCBI на момент исследования), где КРС-2,3 получили наибольшее распространение.

Среди *K. pneumoniae* глобальное распространение генов *bla*<sub>КРС</sub> в настоящее время связано с основной линией – ST258. Изоляты *K. pneumoniae*, продуцирующие КРС, могут не иметь поринов (OmpK35 и OmpK36) для проникновения карбапенемов, что еще больше усиливает устойчивость к карбапенемам [35]. КРС не ограничиваются *Klebsiella* spp., а обнаруживаются

среди различных грамтрицательных бактерий: *E. coli* также оказалась актуальным продуцентом КРС [113].

По данным CDC продукция ферментов КРС стала на сегодняшний день наиболее распространенным механизмом резистентности к карбапенемам в США [24]. Отмечалось также, что продуценты КРС получили спорадическое распространение в Индии, Австралии и Южной Корее [102]. Локальное распространение продуцентов КРС также было зарегистрировано во многих европейских странах [79]. Кроме того продуценты КРС считаются эндемичными Китае, Италии, Польше, Греции, Израиле, Бразилии, Аргентине и Колумбии [158]. Первые случаи выявления в Санкт-Петербурге продуцентов карбапенемаз КРС-типа относят к 2012 г [12]. С тех пор, *K. pneumoniae* продуцирующие КРС выявляется в Санкт-Петербурге, однако занимает меньшую долю среди других общественно-значимых типов карбапенемаз [13].

По расчётным оценкам, *bla<sub>NDM</sub>* (New Delhi МБЛ) возник до 1985 г. и изначально локализовался на транспозоне Tn125 [11]. Однако карбапенемаза NDM достигла глобальной распространенности только примерно через десять лет после её первого описания. Так, в 2008 г. у *K. pneumoniae*, выделенной в Швеции из мочи пациента, который ранее посещал Нью-Дели (Индия), был выявлен NDM-1 [173]. На сегодняшний день известно о 28 вариантах NDM, особенно широко распространены NDM-1 и NDM-5 [107]. Различные варианты NDM в основном отличаются одной аминокислотной заменой. При этом ни одна из наблюдаемых мутаций не затрагивает активный сайт фермента, и их функциональное влияние остается под вопросом [11].

Фермент NDM гидролизуют многие β-лактамы, включая пенициллины, цефалоспорины и карбапенемы, но в отличие от СБЛ обладает слабой активностью в отношении монобактамов (таких, как азтреонам). Будучи представителем МБЛ, связывающим молекулу β-лактама с ионами металлов, хелатирование цинка может нарушать эффективность взаимодействия с антибиотиком. Однако их действие не подавляется комбинациями ингибиторов

$\beta$ -лактамаз, одобренными на данный момент управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) [23].

В 2014 г. продуценты NDM были обнаружены на всех континентах, при этом Индийский субконтинент и Балканский полуостров являются основными резервуарами [33]. В 2012 г. продуценты NDM-1 впервые были обнаружены в Санкт-Петербурге [2]. На 2019-2022 гг. было выявлено 36% продуцентов NDM семейства *Enterobacteriaceae*, в том числе её ко-продуцентов, в стационарах Санкт-Петербурга и Москвы, что демонстрирует значительное распространение за 10 лет с момента первого обнаружения [13].

У бактерий с геном  $bla_{NDM-1}$  выявляются дополнительные детерминанты резистентности, в том числе другие  $\beta$ -лактамазы. Несмотря на ко-продукцию продуцентами МБЛ других  $\beta$ -лактамаз, способных гидролизовать азтреонам, комбинация с авибактамом способна ингибировать синтез клеточной стенки у данных изолятов [116]. Многие продуценты NDM-1 остаются чувствительными только к тигециклину, колистину [176].

Несмотря на то, что  $bla_{NDM}$  был обнаружен на бактериальных хромосомах, преимущественно он переносится конъюгативными плазмидами [30]. Транспозон Tn125, по-видимому, играл важную роль в раннем плазмидно-опосредованном трансфере  $bla_{NDM}$ , где систематически присутствует ген устойчивости к блеомицину ( $ble_{MBL}$ ) в направлении 3' от  $bla_{NDM}$  и, по крайней мере, остаток последовательности вставки ISAba125 в направлении 5' от  $bla_{NDM}$  [165]. Продукция гена устойчивости к блеомицину, входящего в состав генной кассеты, снижает частоту спонтанных RecA-зависимых мутаций, способствуя стабилизации продуцентов NDM, а также может приводить к селективному отбору последних молекулами, подобными блеомицину [108]. Согласно гипотезе, *Acinetobacter* spp. являются реципиентами МГЭ с детерминантами резистентности, после чего передают их другим видам. Тот факт, что ISAba125 зачастую обнаруживался у *A. baumannii* позволил сделать предположение, что гены  $bla_{NDM-1}$  и  $ble_{MBL}$  произошли от одного и того же хозяина за счёт их первоначального расположения единым блоком. Также, GC-богатая

последовательность гена  $bla_{NDM}$  свидетельствует о том, что он был впервые интегрирован в хромосому *A. baumannii* от неизвестного вида в окружающей среде, а затем распространился среди *Enterobacteriaceae* [33]. Таким образом, *A. baumannii* можно считать исходной нишей вышеупомянутых генов устойчивости. Тем не менее, в литературе отмечается большое разнообразие генетического окружения гена  $bla_{NDM}$  часто с инсерцией нескольких IS-элементов и локализованного на составных транспозонах [11], что может объяснить высокую скорость его распространения по миру.

Отмечают превалирование гена  $bla_{NDM}$  у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, где основными продуцентами карбапенемаз NDM-типа являются *K. pneumoniae*, *E. coli* и *Enterobacter cloacae* [161].

ОХА- $\beta$ -лактамазы относятся к молекулярному классу D. Среди других оксациллиназ этого класса только ферменты ОХА-48-типа проявляют ингибирующую активность в отношении карбапенемов. Карбапенемаза ОХА-48-типа была впервые выделена в Стамбуле (Турции) в 2001 г. у *K. pneumoniae* от 54-летнего мужчины с инфекцией мочевыводящих путей и ожогами кожи [119]. Эти ферменты обладают активностью в отношении пенициллинов и цефалоспоринов узкого спектра действия, слабо гидролизуют карбапенемы и обладают ограниченной активностью в отношении цефалоспоринов широкого спектра действия и большинства ингибиторов  $\beta$ -лактамов [117]. Однако фермент может ингибироваться *in vitro* хлоридом натрия, что является отличительной чертой этого класса  $\beta$ -лактамаз [39]. В отличие от других карбапенемаз молекулярного класса D, ферменты ОХА-48-типа демонстрируют повышенные минимальной подавляющей концентрации (МПК) к карбапенемам (особенно имипенему) [117].

Было обнаружено, что значительная часть продуцентов ОХА-48 коэкспрессирует гены  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и  $\beta$ -лактамазу AmpC на плазмидах. Наиболее распространенными плазмидами, несущими  $bla_{OXA-48}$ , являются конъюгативные плазмиды IncL/M типа, описанные для *E. coli* и *K. pneumoniae*. Данные плазмиды, как правило, не несут каких-либо

других детерминант устойчивости к антибиотикам, кроме гена *bla*<sub>OXA-48</sub>. В дополнение, у глобально распространенных *E. coli* и *K. pneumoniae* были ранее описаны хромосомно-кодируемые карбапенемазы OXA-48-типа [56].

Было высказано предположение, что водная бактерия *Shewanella* spp. является предшественником ферментов OXA-48-типа. Так, штамм *Shewanella oneidensis* MR-1 естественным образом несёт ген *bla*<sub>OXA-54</sub>, который на 92% идентичен гену *bla*<sub>OXA-48</sub>. Данная гомология объясняется возможным переносом хромосомных карбапенемаз *Shewanella* в плазмиды, которые затем распространились на другие виды бактерий [117].

Карбапенемазы OXA-48-типа в основном обнаруживают в изолятах *K. pneumoniae*, выделенных в стационарах. К глобальным генетическим линиям *K. pneumoniae*, продуцирующим OXA-48, относятся ST11, ST15, ST147, в США распространён ST101, Польше – ST395, Испании – ST405 [117].

*Enterobacteriales*, продуценты OXA-48, в настоящее время циркулируют в Турции, других странах Среднего Востока и в Северной Африке, в то время как в странах Европы отмечают их спорадическое распространение [117]. Карбапенемазы OXA-48 обнаруживают также в России. В 2012 г. в Санкт-Петербурге были впервые описаны продуценты карбапенемаз OXA-48-типа [12].

В отличие от Московского региона, где преобладают *K. pneumoniae*, продуцирующие OXA-48, в Санкт-Петербурге среди устойчивых к карбапенемам клинических изолятов *K. pneumoniae* преобладают продуценты NDM, при меньшей представленности продуцентов OXA-48- и KPC карбапенемаз [4]. В целом, на сегодняшний день в Российской Федерации преобладают NDM- и OXA-48-типы карбапенемаз, а также отмечается распространение ко-продукции этих ферментов [13].

#### **1.4.4. Приобретенная резистентность к другим классам антибиотиков**

Помимо описанной естественной резистентности *K. pneumoniae*, многие другие ядерные гены особенно связанные с продукцией липополисахарида, эффлюксом или проницаемостью мембран, вносят вклад в чувствительность *K.*

*pneumoniae* к противомикробным препаратам [22, 63]. При этом для популяции *K. pneumoniae* характерна полярность в отношении распределения генов устойчивости: наличие нескольких приобретенных генов резистентности к разным классам антибиотиков или же полное отсутствие таковых [162].

Помимо карбапенемаз *K. pneumoniae* продуцирует и другие  $\beta$ -лактамазы: AmpC цефалоспориназы и БЛРС, среди которых к наиболее распространённым относятся SHV-, TEM-, OXA-, CTX-типы. БЛРС способны эффективно гидролизовать почти все  $\beta$ -лактамы антибиотики: пенициллины и цефалоспорины I-IV поколений, кроме карбапенемов [5, 64]. Кроме резистентности к цефалоспорином широкого спектра действия, AmpC также устойчива к ингибиторам  $\beta$ -лактамаз таких, как клавулановая кислота. Распространение AmpC было достигнуто в результате транслокации хромосомного гена на плазмиду. Однако данные ферменты не способны ингибировать действие карбапенемов [83]. Отмечаются госпитальные изоляты *Klebsiella* spp., несущие один или несколько генов  $\beta$ -лактамаз [114], так, один и тот же биохимический механизм устойчивости может обеспечиваться несколькими генами, которые одновременно встречаются в одной клетке.

Приобретённая устойчивость к аминогликозидам у *K. pneumoniae* реализована ферментами, модифицирующими данный класс антибиотиков, которые включают семейства генов с соответствующими функциями: фосфотрансферазы (*aph*), ацетилтрансферазы (*aac*), аденилтрансферазы (*ant*). Другой механизм, опосредующий устойчивость ко всем аминогликозидам, в отличие от снижения их действия антибиотик-модифицирующими ферментами, обусловлен наличием 16S рРНК-метилтрансфераз [62]. Устойчивость к хинолоновым антибиотикам у *K. pneumoniae* связана с мутациями в генах-мишенях гиразы и топоизомеразы (*gyrA* и *parC*), их защитой от молекул антибиотика посредством генов семейства *qnr*, инактивацией хинолонов посредством гена *aa(6')-Ib-cr*, и потерей порина OmpK35. Также изменения в экспрессии и/или активности эффлюксных насосов *oqxAB* и *acrAB* связаны с устойчивостью ко многим антибиотикам, таким как фторхинолоны,

нитрофурантоин, тигециклин, хлорамфеникол и карбапенемы [53, 168]. У *K. pneumoniae* устойчивость к тигециклину обусловлена гиперфункцией эффлюксных насосов *oqxAB*, *adeABC*, *tet(A)*, *kpgABC*, а также мутациями в гене *rpsJ*, кодирующем компонент 30S-субъединицы рибосомы, и рибосомальных белках S3, S13, S10 [84]. Устойчивость к полимиксину у *K. pneumoniae* обычно вызвана мутациями в гене *mgrB*, регулирующим синтез липополисахаридного слоя (ЛПС), и редко наличием плазмидно-локализованного гена *mcr1*, который чаще встречается у *E. coli* [83]. Механизмы резистентности к фосфомицину включают мутации в последовательности фермента-мишени MurA, участвующего в синтезе пептидогликана, двух транспортеров, GlpT и UhpT, а также наличие гена *fosA*, кодирующего фермент, инактивирующий фосфомицин [62].

#### 1.4.5. Вирулентность *K. pneumoniae*

В 1882 году Фридлиндер описал возбудителя в качестве основного возбудителя пневмонии, которая сопровождалась деструкцией легочной ткани, кавитацией, формированием внелегочных очагов инфекции. Течение инфекции характеризовалось острым началом, молниеносным течением с летальным исходом, который мог наступить в течение 24-48 часов и в среднем наступал через пять дней после поступления, в то время как при пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, через девять. Таким образом, клиническая картина имела ряд отличительных признаков, которые коррелируют с характеристикой гипервирулентного патотипа современной *K. pneumoniae* из чего следует, что *Bacillus friedlanderi* являлся их вероятным предшественником [127].

По результатам работы [75], авторы выявили, что для *K. pneumoniae*, относящихся к CG23, характерно тяжелое течение инфекции, свойственное hvKp. Периоды выделения культур относятся к 1878, 1928 и 1972 годам, что позволяет сделать предположение о формировании hvKp в конце XIX века с последующим глобальным распространением в XX веке.

В рамках современной микробиологии первые случаи упоминания о гипервирулентном патотипе *K. pneumoniae* относят к 1986 году в юго-



восточной Азии [92], где описывалось 7 случаев абсцесса печени с эндофтальмитом в течение четырёх лет. Причем инфекционный агент имел отличительные характеристики гипервирулентного патотипа: все пациенты являлись условно-здоровыми (4/7 пациентов имели сахарный диабет) и имели множественные очаги инфекции, либо последующее метастатическое распространение. В последующих работах [104-106] было показано, что изоляты, которые вызывают абсцессы печени у пациентов из Тайваня, обладали высокой вирулентностью в экспериментальной септической модели, были способны расти при низких концентрациях железа в питательной среде, а также с большей вероятностью обладали гипермукоидным фенотипом, чем неинвазивные изоляты. В дополнение, у них обнаружена крупная плазида, несущая кластер генов аэробактина, его рецептора и регулятора гипермукоидного фенотипа. Эта плазида отсутствовала у авирулентных изолятов. Однако в истории изучения hvKp причина практически полного отсутствия сообщений о таковых между концом 19 века и концом 20 века остается неясна.

В сравнении с сKp, гипервирулентный патотип имеет свои особенности по типу клинического проявления. Последние вызывают внебольничные инфекции, в том числе у здоровых людей: менингиты, эндофтальмиты, абсцессы печени, мозга, инфекции кожи и мягких тканей. Другим наиболее типичным проявлением является метастатическое распространение инфекции обуславливающее множественные очаги инфекции [127].

Основным резервуаром инфекции hvKp является кишечная микробиота человека. Несмотря на то, что в большинстве случаев колонизация проходит бессимптомно и в меньшинстве – клинические проявления инфекции являются следствием фекально-оральной передачи, отмечают, что кишечная колонизация, по-видимому, является критическим шагом, ведущим к инфекции [127]. Инфекции печени, вероятно, инициируются нарушением иммунной защиты хозяина в желудочно-кишечном тракте, что позволяет кишечной микробиоте проникать в участки других тканей. В свою очередь, абсцессы

печени могут вызывать ряд других вторичных инфекций в результате гематогенного распространения из печени. Так, hvKp, вызывающие абсцесс печени, часто являются инфекционными агентами метастатических менингитов [70].

Сохранение чувствительности к большинству антибактериальных препаратов является другим принципиальным отличием hvKp от cKp. До 2013 года отсутствовали сообщения о резистентности hvKp. В исследовании [139] большинство подобных изолятов, отобранных по положительному стринг-тесту, были чувствительны к антибиотикам, считалось, что изоляты hvKp по разным причинам не могут проявлять устойчивость.

Частота инфекций, вызванных hvKp, неуклонно растет в течение последних трёх десятилетий как в странах, входящих в Азиатско-Тихоокеанский регион, так и за пределами Азии, в том числе в Европе [127]. HvKp считается основной причиной абсцессов печени в Китае, Сингапуре, и Южной Корее. В отдельных городах Китая доля hvKp, вызывающих инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, достигала 73.9% [36]. В районах, эндемичных по hvKp, этот патоген частично замещает других возбудителей внебольничной пневмонии, такие как *Streptococcus pneumoniae* [36]. В 2018-2020 годах появились сообщения о выделении hvKp в Российской Федерации.

#### **1.4.6. Факторы вирулентности *K. pneumoniae***

Изоляты hvKp более устойчивы к фагоцитозу, нейтрофильной и комплемент-опосредованной активности и нейтрофильным внеклеточным ловушкам, чем cKp. HvKp также демонстрируют усиленный рост на слизистых оболочках организма человека *ex vivo* по сравнению с изолятами cKp [127]. Выявленные к настоящему времени специфические факторы вирулентности *K. pneumoniae*, играют различную роль у разных изолятов [110]. Факторы, опосредующие гипервирулентный патотип, делят на четыре основных, хорошо охарактеризованных класса.

К поверхностным антигенам относится К-антиген, составляющий бактериальную капсулу. Она представляет собой внеклеточный

полисахаридный матрикс, который покрывает бактерии. В организме человека капсула выполняет скорее защитную, нежели наступательную функцию: препятствует фагоцитозу бактерий иммунными клетками, бактерицидному действию антимикробных пептидов, блокирует взаимодействие комплемента с мембраной, затрудняет формирование эффективного иммунного ответа. Гены, участвующие в образовании капсул (*wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *wca*, *cpsB*, *cpsG* и *galF*) объединены в хромосомном опероне (*cps*). Типирование К-антигена часто выполняется путем секвенирования локуса *wzi*, кодирующего поверхностный белок, который участвует в прикреплении капсулы к внешней мембране. Так, различные последовательности этого локуса ассоциированы со специфическими К-антигенами [115]. При помощи генетического капсульного типирования был идентифицирован 161 вариант различных К-локусов, из которых только 77 можно идентифицировать серологически (локусы на основе данных последовательности ДНК KL1-KL77 соответствуют серологически определенным типам капсул K1-K77) [163].

На сегодняшний день устаревшее название *Bacillus mucosus capsulatus* обращает внимание на две критические особенности, опосредующие гипервирулентный патотип *K. pneumoniae*: выраженную степень развития капсулы (вязкая, слизистая) и увеличение её выработки при росте, как на искусственных средах, так и в организме человека [127]. В дополнение к генам *cps* кластера продукция гиперкапсулы также связана с рядом генов вирулентности: *rmpA*, *rmpA2*, *rscB*, *kvrA* и *kvrB*. Ген *rmpA* может иметь как плазмидную, так и хромосомную локализацию, где хромосомный вариант, как правило, обнаруживается на интегративно-конъюгативном элементе (ICEKp1). Белок RmpA активирует экспрессию *rmpC* и *rmpD*, которые регулируют гипермукоидный фенотип и экспрессию *cps* по отдельности: RmpC – активирует синтез капсульного полисахарида; RmpD – отвечает за экспрессию гипермукоидного фенотипа [177]. Гены *rmpA* и *rmpA2* идентичны на 83%, поэтому их легко различить. Гены *kvrA* и *kvrB* влияют на вирулентность изолятов K1/K2 hvKp за счет активации экспрессии капсульного гена, которого

нет у сКр. Также отмечаются факторы окружающей среды, влияющие на образование капсул: анаэробная среда (уменьшает количество капсульного полисахарида), доступность железа (регулятор поглощения железа (*fur*) снижает продукцию капсулы) и глюкозы (индуцирует образование капсульного полисахарида) [177].

К удивлению, продукция гиперкапсулы достаточна, но не обязательна для формирования гипермукоидного фенотипа. Таким образом, гипермукоидность возникает не только из-за гиперэкспрессии капсулы, а также не все гены *gtmA*, *gtmA2* могут увеличивать её экспрессию. Это подтверждается тем фактом, что процессы формирования гиперкапсулы и гипермукоидности отличаются, и корреляция между гипермукоидностью hvКр и экспрессией капсулы еще не выяснена. Вторым актуальным вопросом является определение влияния различий в капсульном типе *K. pneumoniae* на вирулентность в септической модели на мышах. В исследовании [61] было показано, что тип капсулы определяет вирулентность *K. pneumoniae* путем дифференцированного ухода от захвата клетками Купфера. Серотипы K1, K2, K47, характеризующиеся высокой вирулентностью, полностью блокируют захват макрофагами в печени, тогда как типы капсул, характеризующиеся низкой вирулентностью, обеспечивают лишь частичную защиту. Таким образом, гиперкапсула является необходимым фактором вирулентности, но недостаточным: возможными причинами гипермукоидности могут быть неизвестные функции описанных генов или дополнительные регуляторные факторы [177].

Другим поверхностным антигеном является О-антиген, входящий в структуру ЛПС, функция которого проявляется в защите от комплемента. Изоляты, содержащие полноразмерный О-антиген («гладкий ЛПС») являются устойчивыми к комплемент-опосредованному уничтожению, в то время как изоляты с укороченными или отсутствующими О-цепями («шероховатый ЛПС») – восприимчивыми. Гены необходимые для биосинтеза ЛПС включают *ige* (кодирует UDP галактуронат-4-эпимеразу) и *wabG* (кодирует трансферазу GalA) [177]. У *K. pneumoniae* было идентифицировано 11 различных О-

антигенов. Среди них два О-локуса (O1/O2v1 и O1/O2v2), которые связаны с серологически определенными О-типами O1 и O2, являются на сегодняшний день наиболее распространенными. При этом, гены, расположенные в другом месте генома, используются для определения того, какой из этих двух серотипов наиболее вероятно экспрессируется. Изоляты серотипов K1, K10 и K16 могут использовать капсулу для частичной защиты своего ЛПС от обнаружения толл-подобными рецепторами, т.к. липид А является их лигандом [52].

Большинство грамотрицательных бактерий образуют мембраносвязанные адгезивные структуры на поверхности клеток – фимбрии. У *K. pneumoniae* есть два хорошо охарактеризованных фимбриальных адгезина, которые часто обнаруживаются на поверхности клинических изолятов – фимбрии 1 и 3 типа. Также, в геноме hvKp было идентифицировано семь новых кластеров фимбриальных генов, *kpa,b,c,d,e,f,g*. Среди них фимбрии, кодируемые *kpc*, ассоциированы с серотипом K1 hvKp [177].

*K. pneumoniae* экспрессирует фимбриальные опероны 1-го и 3-го типа, имеющие различные функции. Нитевидные фимбрии 1-го типа состоят в основном из субъединиц FimA с субъединицей FimH на конце, в то время как спиралевидные фимбрии 3 типа – из субъединиц MrkA с субъединицей MrkD на конце. Фимбрии 1 типа играют роль в инвазии клеток мочевого пузыря и образовании в нём биопленок, в дополнение к абиотическим поверхностям. Однако фимбрии типа 1 могут оказывать негативное влияние на вирулентность *K. pneumoniae* из-за усиления лектинофагоцитоза макрофагами и нейтрофилами, а также связывания субъединицы FimH с иммунными клетками организма [157]. Было обнаружено, что MrkD связывает внеклеточный матрикс и обволакивает постоянно введенные в организм пациента устройства, покрытые коллагеном и белками хозяина, в то время как MrkA связывает абиотические поверхности, такие как недавно введенные медицинские устройства. В исследовании [28] сообщалось, что гипермукоидные изоляты серотипа K1, несмотря на наличие генов *mrkD* и *fimH*, демонстрируют низкую

начальную адгезию, поскольку продукция гиперкапсулы может скрывать фимбрии.

Способность фиксировать железо в среде с низким его содержанием во время инфекции является необходимым условием патогенеза *K. pneumoniae*. Бактерии секретируют белки с высоким сродством к железу, называемые сидерофорами: энтеробактин, сальмохелин, иерсиниобактин и аэробактин. Сидерофоры синтезируются внутри клетки и экспортируются во внешнюю среду, где происходит захват ионов железа. После распознавания комплекса сидерофор-железо специфичными рецепторами внешней мембраны, он транспортируется в периплазму и далее через внутреннюю мембрану в цитоплазму, где трехвалентное железо восстанавливается до двухвалентного, воспринимаемого бактериями [76].

Энтеробактин продуцируется как сКр, так и hvКр. Он содержит три катехиновых кольца, которые обеспечивают наивысшую аффинность связывания с  $Fe^{3+}$  и поэтому считается основной системой захвата железа *K. pneumoniae*. Кластер генов *entABCDEFG*, локализуемый на хромосоме, необходим для биосинтеза энтеробактина. В свою очередь, кластер генов *ferABCDG* кодирует белки, которые опосредуют его транспорт, при этом *ferA* специфически кодирует рецептор поглощения. Энтеробактин ингибируется липокалином-2, что приводит к утрате способности *K. pneumoniae* поглощать железо из организма хозяина путем его связывания с сидерофорами. Чтобы избежать связывания с липокалином-2, в ходе эволюции у *K. pneumoniae* сформировались модифицированные сидерофоры такие, как высокогликозилированный энтеробактин – сальмохелин, и альтернативный некатехолатный сидерофор – иерсиниобактин [177].

Синтез иерсиниобактина, исходно обнаруженного у бактерий одноименного рода *Yersinia*, кодируются генами *irp*, как правило, хромосомной локализации. Предполагается, что транспортеры, необходимые для секреции этого сидерофора, кодируются генами *ybt* и *fyu*, а рецептор поглощения – *ybtQ*. Иерсиниобактин не ингибируется липокалином-2, потому что его структура

значительно отличается от структуры энтеробактина. Однако функциональность иерсиниобактина снижается в присутствии транспортных молекул железа хозяина – трансферрина, так как он не может получать железо, необходимое для роста *K. pneumoniae*. Несмотря на то, что иерсиниобактин встречается у изолятов *K. pneumoniae* всех патотипов, среди сКр он был обнаружен только у 18%, но среди клинических изолятов hvКр – у 90% [141].

Сальмохелин первоначально продуцировался одноименными бактериями рода *Salmonella* и имел как хромосомную, так и плазмидную локализацию. Сальмохелин кодируется кластером *iroABCDE* с геном *iroN*, обеспечивающим его транспорт. Сальмохелин в сочетании с микроцином E492, является важным медиатором колонизации желудочно-кишечного тракта hvКр. При этом для активности микроцина необходимо прикрепление сальмохелина, который обеспечивает поглощение бактериоцина бактериями-мишенями.

Аэробактин представляет собой цитрат-гидроксаматный сидерофор, который кодируется кластером генов *iucABCD*, вместе с транспортёром, кодируемым геном *iutA*. Структура локуса *iuc* представлена шестью линиями, где большинство из них локализуется на различных плазмидах, за исключением *iuc4*, гены которого переносятся на хромосоме подвида *K. pneumoniae rhinoscleromatis* [76]. Аэробактин является основной детерминантой вирулентности среди сидерофоров hvКр, которая способствует системной инфекции. Сальмохелин и аэробактин обнаруживаются в большинстве изолятов hvКр, но также продуцируются рядом изолятов сКр, таким образом, данные сидерофоры сами по себе не могут быть использованы для отнесения изолята к hvКр [127].

Дополнительная система транспорта железа – *kfu* – локализованная на хромосоме, может способствовать кишечной колонизации. Среди гипервирулентных линий оперон *kfu* является консервативным у CG23, а также преобладает у hvКр по сравнению с сКр [162]. Несмотря на то, что железо необходимо для роста бактерий, избыток ионов  $Fe^{2+}$  катализирует образование активных форм кислорода, повреждающих клетки. Функцией белка Fur

является регуляция поглощения железа путём связывания с последовательностями в промоторных областях локусов, кодирующих сидерофоры. Благодаря взаимодействию Fur с  $Fe^{2+}$  в условиях, богатых железом, этот белок подавляет синтез сидерофоров, тем самым нейтрализуя избыточное железо и способствуя повышенной вирулентности клеток. Способность функционировать в разных органах и при различной доступности компонентов окружающей среды во время инфекции говорит о взаимодополняющих свойствах описанных систем транспорта железа [177].

К другим факторам вирулентности относятся несколько белков наружной мембраны, пептидогликан-ассоциированный липопротеин (Pal), муреиновый липопротеин (LppA) и система секреции 6 типа (T6SS) [177]. Белки наружной мембраны, ассоциированные с вирулентностью, включают два основных порина, OmpK35 и OmpK36, потеря которых снижает патогенность и скорость роста, а также недавно описанный порин KpnO, утрата которого приводит к уменьшению выработки полисахаридной капсулы. Система секреции 6 типа вводит эффекторные белки в клетки-мишени для уничтожения эукариотических клеток или борьбы с другими прокариотическими клетками. На основании того, что соседние гены локусов T6SS кодируют системы поглощения железа, можно предположить, что T6SS участвует в импорте железа в клетки hvKp [21]. Плазмиды, несущие детерминанты вирулентности, также зачастую несут гены, кодирующие резистентность к тяжелым металлам, таким как теллур (*terZABCDE* и *terWXY*), серебро (*silS*), ртуть (*merARCTP*), медь (*pcoABCDERS*), свинец (*pbrRABC*) и мышьяк (*arsABCDR*) [135].

На фоне описания у клебсиелл большого количества факторов вирулентности, нерешенным остается вопрос об их наборе необходимом и достаточном для проявления гипервирулентного фенотипа. Долгое время маркером при дифференцировке hvKp являлся положительный стринг-тест. Позднее было показано, что не все изоляты hvKp являются гипермукоидными, а также некоторые изоляты cKp обладают этой характеристикой [25]. Другим критерием являлось наличие капсул K1 или K2 типов. Однако, из-за



интенсивного горизонтального переноса генов и гомологичных рекомбинаций *K. pneumoniae*, включая гены, кодирующие типы капсул, данная характеристика не может быть использована для отнесения изолята к гипервирулентному патотипу [127].

В работе Russo T.A. и соавт. [128], где оценивалась значимость около 20-ти различных генотипических и фенотипических биомаркеров на основании данных по уровню вирулентности на модели сепсиса у мышей, был определён репертуар генов вирулентности, с высокой чувствительностью и специфичностью идентифицирующий гипервирулентный патотип – *iroB*, *iucA*, *peg-344*, *rmpA* и *rmpA2*. В дополнение, известно, что факторы вирулентности переносимые на ICE, менее точны для определения [127]. Было продемонстрировано, что аэробактин является доминирующим сидерофором, который усиливает вирулентность *ex vivo* и *in vivo* [129]. Позже было подтверждено экспериментом, что, несмотря на делецию *iro*, *peg-344* и *rmpA*, но не *iuc* и *rmpA2*, изолят XDR-hvKp сохранил вирулентные свойства [47]. Необходимость продукции аэробактина и *rmpA*, *rmpA2* для опосредования гипервирулентного патотипа подтверждается работой, где показано, что у *K. pneumoniae* продукция аэробактина коррелирует с наличием генов биосинтеза капсульных полисахаридов [174]. Также, в другом исследовании показано, что наличие аэробактина более точно определяет принадлежность изолята к hvKp, чем результаты стринг-теста [87].

В другом исследовании Russo T.A. и соавт. показано, что количественная концентрация сидерофоров > 30 мкг/мл является надёжным прогностическим фактором для отнесения изолятов к hvKp [128]. Предыдущие исследования показали, что hvKp по сравнению с cKp демонстрируют 6-10 кратное увеличение продукции сидерофоров, из чего следует, что суммарная продукция последних соотносится с уровнем вирулентности изолята [130]. К биохимическим методам, определяющим интенсивность капсулообразования и гипермукоидности, относится оценка содержания уроновых кислот и анализ

остаточной оптической плотности суспензии после центрифугирования при использовании бульонной культуры [99].

В некоторых исследованиях используется комбинация двух или более факторов вирулентности для точной дифференцировки hvKp. В одной работе [90] использовали положительный стринг-тест и присутствие аэробактина. В другой работе [160] предложили, что изолят должен соответствовать как минимум двум из следующих критериев: положительный стринг-тест, наличие *trpA* и наличие гена биосинтеза аэробактина. Несмотря на активный поиск маркеров для дифференцировки hvKp и cKp, лучшим критерием остаётся летальная модель беспородных мышей. Попытки использовать личинки восковой моли (*Galleria mellonella*) для определения потенциала вирулентности *K. pneumoniae* дают противоречивые результаты [126].

#### **1.4.7. Генетическая локализация детерминант вирулентности**

Гены вирулентности, как правило, локализуются и передаются на крупных плаزمиде KpVP-1 типа. Каноническими вирулентными плаزمидами являются плазмиды pK2044 размером 224 Кб штамма NTUH-K2044 серотипа K1, ST23, и плаزمиды pLVPK размером 219 Кб штамма K2, ST86, CG43. Потеря этих плазмид значительно снижала вирулентность [34].

Плазмиды, несущие детерминанты вирулентности, редко обнаруживаются у генетических линий MDR-Kp по сравнению с hvKp. К причинам относят: существование клональной специфичности hvKp в распределения плазмид; плазмиды, несущие детерминанты вирулентности, как правило, неконъюгативны, а также влекут за собой снижение адаптивности за счёт приобретения дополнительного генетического груза [148].

Однако детерминанты вирулентности также могут локализоваться и на хромосомах и передаваться посредством ICEKp, способствующих передаче островков патогенности, интегрированных, как правило, в сайты tРНК. Наиболее охарактеризованное семейство ICEKp1 определяется наличием локуса *ybt*. В исследовании [74] 17 линий *ybt* были ассоциированы с одной из 14 различных структур ICEKp (ICEKp1-ICEKp14). В дополнение к генам

биосинтеза иерсиниобаكتина, на ICEKp1 содержатся гены, кодирующие синтез сальмохелина (*iro*) и капсульных полисахаридов (*rmpA*). В последующих исследованиях Lai и соавт. описали более консервативный ICEKp10, присутствующий в большинстве изолятов hvKp. В нем сохранялись гены, кодирующие иерсиниобактин, а также уникальной областью являлся локус синтеза микроцина E492 и колибактина [72]. Последний кодируется кластером *clbABCDEFGHIILMNPOQ* и опосредует более эффективную колонизацию клебсиелл в организме хозяина. Наблюдается стабильное и специфичное приобретение ICEKp в общей популяции *K. pneumoniae*, что позволяет говорить о их важной эволюционной роли. В дополнение, недавно был обнаружен новый вариант ICEKpSL1 у изолята hvKp, выделенного из печени инфицированных свиней [91].

Все четыре сидерофора могут быть плазмидными и потенциально мобильными. Так, *ybt* локус, как правило, располагаемый на хромосомном ICE, был идентифицирован на плазмиде F1Bk, что рассматривается как новый механизм распространения кластера генов иерсиниобаكتина [177]. И наоборот, вся плаزمида, несущая детерминанты вирулентности, может быть интегрирована в хромосому. Данная ситуация была описана у hvKp ST420 [38]. Изолят был выделен в 2021 году в Германии от 66-летнего мужчины, у которого он вызвал множественные очаги инфекции. Плазмида относилась к IncHI1B типу репликаона, была фланкирована новой последовательностью вставки ISKpn74. Изолят имел повышенную продукцию сидерофоров, гипермукоидный фенотип и проявлял чувствительность к большинству протестированных противомикробных препаратов. Авторы отмечают, что хромосомно-опосредованные факторы вирулентности характеризуются некоторыми преимуществами для бактериального хозяина: повышение адаптивности по сравнению с изолятами, которые несут плазмидно-опосредованные факторы вирулентности; снижение вероятности потери факторов вирулентности в процессе сегрегации плазмид; увеличение вероятности приобретения дополнительных плазмид.

## 1.5. Конвергенция MDR и hv

Детерминанты MDR и вирулентности до недавнего времени встречались в неперекрывающихся популяциях *K. pneumoniae*. Однако система здравоохранения столкнулась с серьезной проблемой слияния детерминант на одних и тех же или сосуществующих плазидах, что стирает традиционные эпидемиологические различия между патотипами hvKp и cKp [127]. Учитывая, что детерминанты MDR и вирулентности, как правило, локализуются на плазидах, их случайная конвергенция внутри отдельных изолятов не является неожиданной. Более того, мозаичная природа плазмид *K. pneumoniae* располагает к конвергенции детерминант на одном векторе, что ведет к повышенному потенциалу вирулентности и трудностям в лечении, связанным с MDR фенотипом.

Первый описанный случай конвергенции карбапенем-устойчивого и гипервирулентного патотипа относят к 2016 году. В Китае произошла фатальная вспышка пневмонии, вызванная CRKp, несущей карбапенемазу KPC-2 и относящейся к канонической китайской генетической линии ST11. Однако в этом случае наблюдалась летальность личинок восковой моли и положительный стринг тест из-за приобретения rLVPK-подобной плазмиды, что говорит о том, что эта генетическая линия приобрела одновременно свойства гипервирулентности и MDR [47]. Ретроспективно CR-hvKp обнаруживались в Китае уже в 2008 году, почти за десять лет до первого сообщения [85].

После первой публикации в 2018 году из Китая стало появляться всё больше и больше сообщений по распространению конвергентных линий, так в одном исследовании было показано, что 36% CRKp несут локус аэробактина [89]. Изоляты MDR-hvKp, циркулирующие за пределами Азии, были зарегистрированы еще в 2012 году во Франции, когда был выделен изолят ST86-K2 hvKp, продуцирующий БЛРС [147]. Следствием данного сообщения стало издание предупреждения о риске распространения hvKp ST23, несущей гены карбапенемаз, в странах ЕС и Европейской экономической зоны [36].

Гены карбапенемаз были обнаружены у 20,5% изолятов hvKp ST23 во всём мире, начиная с 2012 г., при этом авторы указывают на независимое приобретение последних. В частности, изоляты из Европейской зоны несли карбапенемазы VIM-1 и, в большинстве случаев, OXA-48. При этом, по мировым данным наиболее часто встречаемой карбапенемазой, продуцируемой CR-hvKp, была KPC-2 [148]. Различные вспышки, зарегистрированные в Китае, Иране, России указывают на то, что CR-hvKp, может заменить cKp как патогена, связанного с оказанием медицинской помощи [36]. На сегодняшний день к географическим регионам с широким распространением CR-hvKp относятся Таиланд, Германия, Италия, США и Россия [143]. В исследовании [143] авторы выявили девять кластеров CR-hvKp на основе алгоритма UMAP.

В исследовании [73], демонстрирующем функционал программного инструмента Kleborate, были проанализированы общедоступные геномы *K. pneumoniae*. Авторы выявили 174 эпизода конвергенции, обусловленные либо приобретением генов вирулентности MDR-CG (38,5%), либо приобретением генов БЛРС/карбапенемаз hvKp (37,4%). HvKp с меньшей вероятностью приобретают гены резистентности, чем MDR-Kp, приобретают гены вирулентности из-за более низкого разнообразия генома hvKp, чем у cKp. Данный факт позволяет предположить существование барьера для захвата и/или интеграции фрагментов ДНК в hvKp [148].

В дополнение, вызывает тревогу колонизация CR-hvKp ниш окружающей среды. Результаты исследования [123] свидетельствуют о возможной передаче изолятов CR-hvKp из сточных вод в виде биоаэрозоли в верхние дыхательные пути работников очистных сооружений. А также, в Китае описано обнаружение hvKp ST23, несущего *bla*<sub>KPC-2</sub>, в готовых к употреблению овощах (огурце) [88].

### 1.5.1. Пути формирования CR-hvKp

Высокая предрасположенность *Klebsiella* spp. к генетической изменчивости позволили им быстро адаптироваться к разнообразным экологическим нишам, в связи с чем эволюция CR-hvKp представляет собой сложный процесс. Описано 3 варианта формирования конвергентного патотипа:

приобретение плазмиды, несущей детерминанты *h<sub>v</sub>*, внутрибольничными устойчивыми генетическими линиями; приобретение плазмиды с детерминантами резистентности каноническими гипервирулентными генетическими линиями (условно «азиатскими»); приобретение гибридных конъюгативных плазмид, несущих гены резистентности и вирулентности [148].

К механизмам, обуславливающим данные варианты формирования конвергентного патотипа, относят как приобретение *h<sub>v</sub>K<sub>p</sub>* везикул наружной мембраны, несущих гены резистентности, так и приобретение *CRK<sub>p</sub>* везикул наружной мембраны, несущих гены вирулентности. В случае если при горизонтальном переносе реципиентом является *h<sub>v</sub>K<sub>p</sub>*, к механизмам формирования конвергентного патотипа также относится приобретение конъюгативных плазмид с детерминантами резистентности, а также хромосомная интеграция ICE элементов, несущих факторы резистентности. Напротив, в случае если реципиентом является *CRK<sub>p</sub>*, к механизмам формирования конвергентного патотипа относят приобретение конъюгативной или неконъюгативной плазмиды с генами вирулентности.

Одним из механизмов мобилизации неконъюгативной плазмиды с генами вирулентности является перенос плазмиды, несущей детерминанты вирулентности, путем образования коинтеграта с хелперной конъюгативной плазмидой в сайтах слияния [166, 171] или в результате гомологичной рекомбинации [82, 169, 170]. Другим вариантом является передача вирулентных плазмид с помощью конъюгативной хелперной плазмиды (без слияния) [82, 169] или интеграция конъюгативного элемента *tra-trb* в каноническую рK2044-подобную плазмиду вирулентности [152]. Сообщалось о том, что вирулентная плазида изолята *K. pneumoniae* может передаваться другим сK<sub>p</sub>, несущим *bla<sub>KPC-2</sub>*, а также другим видам бактерий, путем коинтеграции с конъюгативной хелперной плазмидой IncF1A в сайтах слияния. В результате за счет взаимодействия между короткими гомологичными участками (241 п.н.), кодирующими гипотетический белок, образуется конъюгативная гибридная плазида [167].

В работе [82] было показано образование гибридной плазмиды (p17-15-vir), несущей детерминанты резистентности и вирулентности, путём рекомбинации двух гомологичных областей, содержащих ген обратной транскриптазы интрона II группы и ISShes11. Также определили, что неконъюгативная вирулентная плазида может передаваться с помощью конъюгативной хелперной плазмиды (p17-16-vir с хелперной p17-16-CTX или p17-16-KPC) или путем слияния с конъюгативной плазмидой MDR (p17-16-vir с конъюгативной плазмидой резистентности p17-16-CTX = p17-15-vir). В другом исследовании [169] эти механизмы дополнили, тем, что после получение конъюгативной плазмиды IncF плазида, несущая детерминанты вирулентности, может быть мобилизована при помощи отдельного переноса или образования гибридной плазмиды за счет двух раундов одноцепочечных обменов в специфических сайтах слияния. В другом исследовании [170] авторы также показали, что плазмиды с генами вирулентности от изолятов CR-hvKp могут быть перенесены *E. coli* посредством конъюгации разными механизмами. Некоторые варианты передачи плазмид с генами вирулентности включают образование плазмид слияния с конъюгативной плазмидой типа Inc11 и малой плазмидой ColRNAI, путём гомологичной рекомбинации или вставки последовательностей IS26 и IS903B. В основе же формирования гибридных плазмид лежит приобретение детерминант вирулентности CRKp или детерминант устойчивости к противомикробным препаратам hvKp в результате IS-опосредованной транспозиции.

Пока ещё небольшое распространение изолятов с признаками конвергентного патотипа говорит о существовании факторов, затрудняющих формирование подобных линий. HvKp имеют более низкое разнообразие и пластичность генома, чем у MDR-Kp, и проявляют чувствительность к антибиотикам, что приводит к подавлению их роста до того, как hvKp приобретут плазмиды с генами резистентности. К другим факторам относится отсутствие у плазмид, несущих детерминанты hv, кластера генов ответственных за конъюгацию, а также возможное снижение адаптивности в

результате приобретения экзогенной ДНК. Сверхпродукция внеклеточных полисахаридов ограничивает перенос плазмиды, несущей детерминанты вирулентности, от hvKp к CRKp. Кроме этого формирование механизмов передачи генов вирулентности, в целом, является длительным эволюционным процессом.

### 1.5.2. Клональное распространение конвергентного патотипа *K. pneumoniae*

На сегодняшний день MDR-hvKp были зарегистрированы на нескольких континентах, включая Азию (Китай (материковый Китай, Гонконг и Тайвань), Индию, Иран, Японию), Европу (Францию, Норвегию, Великобританию, Италию, Чехию, Германию, Швейцарию), Россию, Африку (Египет), Южную (Аргентину, Бразилию) и Северную Америку (Канаду, США). MDR-hvKp принадлежат, как минимум, к 51 различному ST и 13 серотипам с региональными различиями (Рисунок 1).

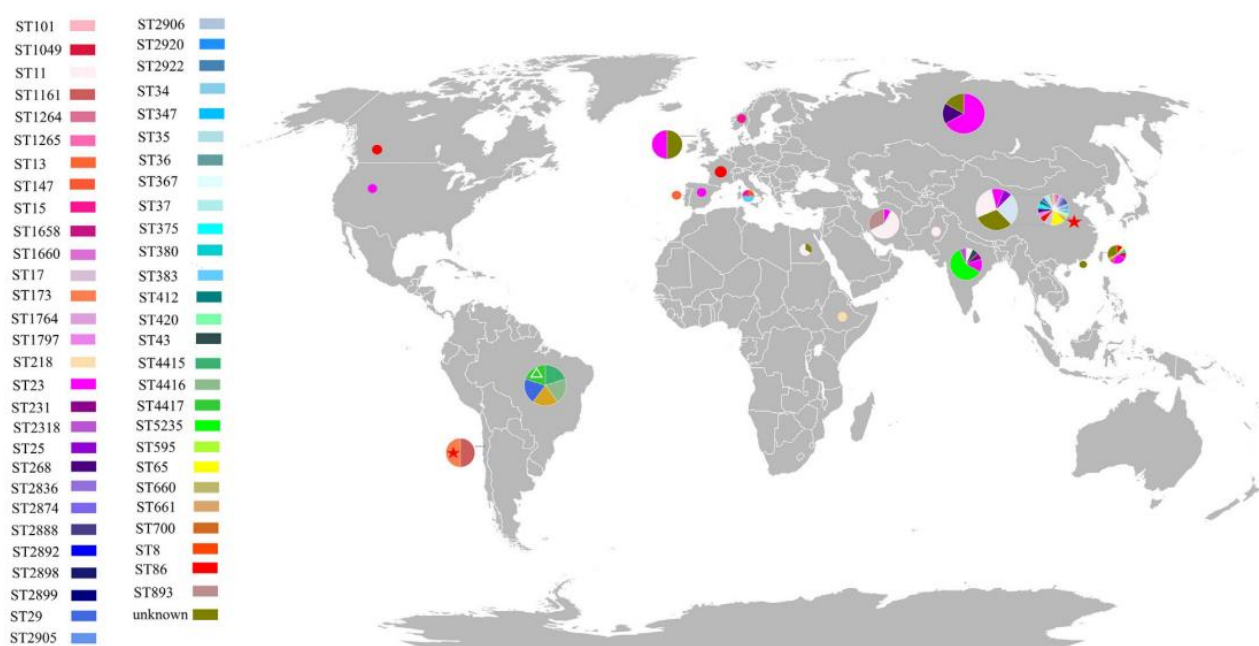


Рисунок 1 – Распространение MDR-hvKp (данные, полученные до февраля 2022 г.) [32]

В Российской Федерации опубликовано небольшое число исследований MDR-hvKp. Первые случаи описания MDR-hvKp в России относят к 2018 г. В



работе [81] анализировали MDR-Kp, выделенные в 2012-2016 гг. в московском стационаре, где 18 из них проявляли вирулентность на септической модели мышей  $LD_{50} \leq 10^4$ . Последние относились к генетическим линиям вирулентных *K. pneumoniae* и были выделены от больных с инфекциями специфичными для гипервирулентного патотипа. На основе полногеномного секвенирования авторы определили, что один изолят ST23 K1 нёс вирулентную плазмиду, идентичную pLVPK, а также две другие с  $\beta$ -лактамазами OXA-48 и CTX-M-15 соответственно. Васильевым И.Ю. и соавт. было описано 5 изолятов *K. pneumoniae* ST23 с генами БЛРС, выделенных от здоровых детей в 2017 г. в родильном доме Казани [156]. Также в Казани было описано два летальных случая младенцев с менингитами [67]. Изоляты *K. pneumoniae*, выделенные в 2015-2016 гг., продуцировали БЛРС, а также гены аэробактина, колибактина и регулятора мукоидного фенотипа. На основании этого авторы предполагают взаимосвязь развития тяжелых форм неонатальной инфекции с факторами вирулентности. В другом исследовании [134] был описан изолят MDR-hvKp, относящийся к ST23 K1-O1v2. Изолят был выделен в Москве из раны пациента, у которого позже развились множественные абсцессы и фатальный сепсис. Шайдулиной Э.Р. и соавт. удалось определить локализацию генов вирулентности и карбапенемаз на разных фрагментах генома: плазида IncL/M несла карбапенемазу OXA-48, плазида IncFIIK несла  $bla_{CTX-M-15}$ , а гены вирулентности локализовались на хромосоме и плазмиде IncFIB/IncHI1B. Также в Москве описали два изолята ST23, выделенные в 2017 году и несущие гены вирулентности (в том числе *iutA*, *rmpA*) [137]. Один из них нёс карбапенемазу OXA-48. В основном, описанные случаи связаны с распространением hvKp, относящихся к ST23, имеющему эпидемиологическую связь с Тихоокеанским регионом.

В работе [3] описаны выделенные в 2020 г. MDR-hvKp, как доминирующий патоген у пациентов из ОРИТ инфекционных клинических больниц Санкт-Петербурга и Москвы с тяжелым течением COVID-19. Большинство изолятов, содержали кластеры генов аэробактина, регулятора

гипермукоидного фенотипа, а также все изоляты несли гены *bla*<sub>NDM</sub> и в двух случаях являлись ко-продуцентом OXA-48. Изоляты принадлежали к генетическим линиям, связанным с международными MDR-CG (ST874, ST395, ST147, ST15). Конвергенция патотипов клебсиелл в сочетании с сопутствующими заболеваниями в двух случаях привела к летальным исходам. В другом исследовании, на основании наличия детерминант вирулентности, генов карбапенемаз, и гипермукоидного фенотипа, описаны изоляты, выделенные в стационаре Санкт-Петербурга и обладающие свойствами гипервирулентности и MDR [100].

Однако в данных работах не определено относительное положение генов устойчивости и вирулентности, либо описано, что они находятся на различных векторах. Других изолятов CR-hvKp с подтвержденными гибридными плазмидами, содержащими гены карбапенемаз и hv, в России на момент исследования опубликовано не было.

### **1.5.3. Обусловленное гибридными плазмидами, клональное распространение *K. pneumoniae*, обладающих признаками конвергентного патотипа**

По мере распространения гибридных плазмид, несущих детерминанты резистентности и вирулентности, среди клебсиелл различных генетических линий мы наблюдаем утрату связи данного бипатотипа с исходной азиатской CG23. Ретроспективный анализ международных баз данных показал, что гибридные плазмиды были обнаружены с 2017 г. у различных генетических линий (ST307, ST11, ST15 и ST383) на европейском континенте: Италия, Германия, Россия, Великобритания, Норвегия; на севере Африки: Египет, Средний Восток; в Китае; Индии. Чаще всего изоляты *K. pneumoniae* относятся к внутрибольничным генетическим линиям, которые дополнительно приобрели плазмиду, несущую детерминанты вирулентности.

Группа исследователей из Великобритании была одной из первых, кто описал изоляты, несущие гибридные плазмиды, с детерминантами устойчивости/вирулентности, включая гены карбапенемаз. Такие плазмиды

впоследствии стали называть «английскими» (pKp $\nu$ ST147B-подобными). Изоляты, полученные из медицинских учреждений Великобритании, относились к внутрибольничным клонам высокого риска: ST15, 48, 101, 147, 383 [155]. В частности, все гибридные плазмиды несли *rmpA*, *rmpA2*, и кластер аэробактина, а также три представителя ST383 несли *bla*<sub>NDM-5</sub> [155]. Эти pKp $\nu$ ST147B-подобные плазмиды были обнаружены в Швейцарии и Италии.

Было опубликовано три независимых работы из Италии, которые описали появление вспышки в 2018-2021 гг. [150], вызванной внутрибольничными генетическими линиями клебсиелл (ST383, ST147, ST15) продуцентами карбапенемаз (NDM-1 или NDM-1/5 и OXA-48), которые несли гибридные плазмиды с детерминантами гипервирулентности и MDR. Вспышка была вызвана линией CRKp ST147, продуцирующим NDM-1, который имел набор детерминант резистентности, опосредующий устойчивость к большинству противомикробных препаратов. На ранней фазе вспышки было выявлено, что среди NDM-продуцирующих карбапенем-устойчивых *Enterobacteriaceae* шесть изолятов несли крупную плазмиду IncHIB/IncFIB(Mar), локализирующую детерминанты гипервирулентности (включая кластер генов аэробактина, *rmpA*, *rmpA2*), а также *bla*<sub>CTX-M-15</sub> [29]. Они характеризовались способностью к трансконъюгации и отсутствием гипермукоидного фенотипа, что не свойственно для типичной hvKp. В исследовании, изучающем коллекцию NDM-продуцирующих MDR-Kp, собранную на протяжении всей вспышки, изолят hvKp характеризовался повышенной продукцией сидерофоров и незначительным повышением потенциала вирулентности на модели подкожной инфекции у иммунокомпетентных мышей в сравнении с cKp [96]. Изолят приобрел гибридную плазмиду типа IncFIB/IncHIB, несущую ключевые биомаркеры вирулентности (гены биосинтеза аэробактина, *rmpADC*, *rmpA2*). Авторы показали, что клинические изоляты, выделенные на Среднем Востоке, являются недавним общим предком для доминирующей линии CR-hvKp. В другом исследовании, описывающим промежуточный период вспышки, обнаружили два изолята CR-hvKp ST383, чувствительные только к колистину,

тигециклину, имеющие гипермукоидный фенотип и демонстрирующие клинические проявления характерные для hvKp [93]. Изоляты несли гибридную плазмиду IncFIB/IncHI1 с маркерами вирулентности и резистентности: генами  $\beta$ -лактамаз, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>NDM-5</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, кластером генов аэробактина, *rtxA*, и *rtxA2*. Изоляты также ко-продуцировали OXA-48 на плазмиде IncL типа. В дополнение, один из изолятов нёс третью плазмиду с детерминантами резистентности, в том числе карбапенемазой NDM-1. Авторы указывают на широкое международное распространение (из Сирии в Великобританию и затем в Италию) крупных гибридных плазмид всего за несколько лет.

В Швейцарии обнаружили четыре MDR-Kp, выделенные в 2020 г. и продуцирующие NDM-1 [51]. Изоляты принадлежали к ST147/K64 линии, как правило, относящейся к cKp. Другая pKpVST101-подобная гибридная плазмида, впервые обнаруженная в Лондоне, также была выявлена в Египте в 2017-2018 гг., относилась к IncFIB/IncHI1B типу и несла *bla*<sub>NDM-1</sub> [15]. Изолят *K. pneumoniae* был выделен от 60-летней женщины в ОРИТ, принадлежал к ST11 и также являлся ко-продуцентом KPC-2. В отдельном исследовании из Египта [37] в 2020 г. была также выявлена другая «английская» pKpVST383L-подобная гибридная плазмида, несущая CTX-M-15 и NDM-5. Изолят *K. pneumoniae* относился к ST383 и ко-продуцировал карбапенемазу OXA-48. Авторы предполагают, что географическое распространение этой гибридной плазмиды произошло в Средиземноморском бассейне, достигнув Египта. Данная «английская» плазмида также была выявлена в Чехии и на Среднем Востоке. В первом случае, в 2019 г. в Праге был описан изолят *K. pneumoniae* от пациента, посетившего Египет за год до выделения [26]. Изолят был выделен из ректального мазка в рамках рутинного скрининга, принадлежал к ST15 и ко-продуцировал NDM-1, локализованный на гибридной плазмиде IncFIB/IncHI1B, и OXA-48. В дополнение изолят характеризовался ко-продукцией карбапенемазы OXA-244 на отдельной плазмиде IncFII типа. Во втором случае, изолят *K. pneumoniae*, выделенный не ранее 2020 г., принадлежал к ST377/KL102 и нёс ген *bla*<sub>NDM-1</sub> на гибридной плазмиде IncHI1B/IncFIB. Таким

образом, мы наблюдаем распространение «английских» плазмид по европейскому континенту, Среднему Востоку и России.

В другом исследовании [54] была выявлена гибридная плазмида IncFIB/IncHI1B, несущая *bla*<sub>NDM-1</sub>. Изолят *K. pneumoniae*, был выделен в 2019 году в Германии и относился к ST307, вызвавшему вспышку в четырех медицинских учреждениях на северо-востоке страны. Этот изолят характеризовался повышенной секрецией сидерофоров, гипермукоидным фенотипом и имел две другие плазмиды, несущие *bla*<sub>OXA-48</sub> и *bla*<sub>CTX-M-15</sub> соответственно.

Также описаны случаи CR-hvKp, относящиеся к исходной гипервирулентной азиатской линии CG23. В 2013 г. в Китае обнаружили *K. pneumoniae* ST23, выделенную из мокроты. Изолят нёс типичную плазмиду IncFIB/IncHI1B с маркерами вирулентности (*iuc*, *iro*, *rmpA* и *rmpA2*) и интегрированным транспозоном, локализуящим *bla*<sub>KPC-2</sub> [31].

Не так давно была опубликована работа [71], где в Москве у четырёх пациентов нейрореанимации, двое из которых погибло, в 2019 г. было обнаружено 4 MDR-Kp ST39/K23, несущих гибридную плазмиду IncHI1B типа. Данная генетическая структура несла детерминанты гипервирулентности и *bla*<sub>OXA-48</sub>, причём три изолята, среди исследованных, также несли две другие плазмиды с карбапенемазами NDM-1 и KPC-2. В другом исследовании [136], также в Москве в 2021 г. была выделена CR-hvKp ST512/KL107. Изолят нёс гибридную плазмиду CriePt494\_p2 IncHI1B/IncFIB с геном *bla*<sub>NDM-1</sub>.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Фенотипические методы исследования

#### 2.1.1. Выделение, идентификация и хранение изолятов

В работу включено 1290 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от больных с разными формами инфекций. Изоляты были собраны в период 2017-2022 годов в стационарах Санкт-Петербурга, Москвы, Красноярска, Перми, Хабаровска, Нижнего Новгорода, Казани, Мурманска, Ханты-Мансийска. Источниками выделения микроорганизмов были: раневое отделяемое различного происхождения (ожоговые, хирургические раны), отделяемое при инфекциях мягких тканей, мокрота (пневмонии), кровь (сепсис), ротоглоточные, ректальные мазки, смыв с бронхов, отделяемое зева, трахеи, ликвор, кал, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), отделяемое абсцесса, брюшная жидкость, выпот, дренаж, гной, катетер, легкое, ликвор, перикардальная, плевральная жидкость, печень, лёгкое, отделяемое уха, конъюктива.

Передача изолятов производилась в транспортной среде Эймса (Минимед, Россия). Идентификация культур осуществлялась с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT («Bruker Daltonics», Германия). Изоляты хранились в криопробирках музея культур при -80 °С в триптиказасоевом бульоне («Merk KGaA», Германия) с содержанием глицерина 20%.

#### 2.1.2. Определение чувствительности к антимикробным препаратам

Восстановление культур осуществлялось на агаре Мюллера-Хинтона. Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением МПК в бульоне Мюллера-Хинтона (Cation-Adjusted Mueller Hinton II Broth, «Becton Dickinson», США) в соответствии с рекомендациями и критериями EUCAST v\_11.0\_Breakpoint\_Tables. Были использованы следующие субстанции антибиотиков: ампициллин, цефтазидим (CAZ),

цефтазидима-авибактам (CAZ/AVI), азтреонам, азтреонам-авибактам (AZT/AVI), меропенем (MER), имипенем (IMI), биापенем, эртапенем, цефепим, цефотаксим (СТА), цефокситин, цефтриаксон, ципрофлоксацин, гентамицин (GEN), амикацин (АМК), тигециклин (TGC), колистин/полимиксин В (PB), фосфомицин (FOS), триметоприм/сульфатомексазол (ко-тримоксазол, SxT), пиперациллин-тазобактам. В качестве референс-штамма использовалась культура *E. coli* из Американской Коллекции Типовых Культур (АТСС) – АТСС 25922. Эксперименты проводились в трёх повторах.

Для комбинации азтреонама-авибактама отсутствуют критерии чувствительности, поэтому интерпретация результатов осуществлялась по данным для цефтазидима-авибактама, где  $S \leq 8$  мг/л,  $R > 8$  мг/л. При этом максимальная концентрация азтреонама составляла 32 мг/л, а концентрация авибактама была фиксированной и составила 4 мг/л. EUCAST в настоящее время не определяет критерии чувствительности *K. pneumoniae* к тигециклину, так для тигециклина были использованы критерии наиболее близкородственного вида – *E. coli*. Определение МПК в условиях ограниченного содержания цинка (50 мкМ ЭДТА) проводили в соответствии с рекомендациями Института клинических лабораторных стандартов (CLSI, M100 ED30:2020).

### 2.1.3. Стринг-тест

Стринг-тест, описанный [49], использовался для оценки гипермукоидного фенотипа культур. Результат считался положительным, если бактериологическая петля образует тяжи длиной более 5 мм при растяжении колонии на чашке с агаром.

## 2.2. Генотипические методы исследования

### 2.2.1. Детекция генов карбапенемаз и маркера гипервирулентности (выделение ДНК, амплификация)

ДНК бактериальных культур выделяли с использованием набора «ДНК-сорб Б» («АмплиСенс», Россия) согласно рекомендациям производителя. Выявление основных генов карбапенемаз осуществляли с помощью мультиплекс ПЦР в режиме реального времени в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Праймеры и зонды для генов, кодирующие три основных типа карбапенемаз NDM, OXA-48 и KPC, с длиной продуктов амплификации и температурой плавления представлены в таблице 1. Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия), зонды – в «Синтол» (Россия).

Таблица 1 – Праймеры и зонды для выявления генов основных типов карбапенемаз [80]. LNA-модификация (locked nucleic acids) обозначена знаком «+».

Название	Последовательность	Краситель и гаситель зонда	Т отжига, °С	Длина ампликона, п.н.
KPC-F	GGCCGCCGTGCAATAC		58,79	
KPC-R	GCCGCCCAACTCCTTCA		59,59	61
KPC-P	TGATAACGCCGCCCAATTTGT	FAM/BHQ1		
NDM-F	ATTAGCCGCTGCATTGATGC		59,69	
NDM-R	CCGGCATGTCTGAGATAGGAA		59,33	158
NDM-P	CTG +CCA+GAC+ATT+CGGTGC	Cy5/BHQ2		
OXA-48F	CAATGGYGACTATATTTCGGGC		57,58	
OXA-48R	CCACACATTATCATCMAGTTCAACC		58,68	103
OXA-48P	СТАAGATTGGCTGGTGGGT	HEX/BHQ1		

Таким образом, канал флуорофора Cy5 (красный) детектировал ген *bla*<sub>NDM</sub>, канал HEX (желтый) – *bla*<sub>OXA-48</sub>, а канал FAM (зеленый) – *bla*<sub>KPC</sub> (таблица 2).



Таблица 2 – Список генов карбапенемаз с соответствующими каналами флуорофоров.

Ген	Канал флуорофора
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Cy5/ Red
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	HEX/ Yellow
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	FAM/ Green

Температурный и покомпонентный протокол мультиплекс ПЦР при использовании Dream Taq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific, США) составлены в соответствии с рекомендациями производителя и представлены в таблицах 3 и 4 соответственно.

Таблица 3 – Температурный протокол мультиплекс ПЦР для выявления генов основных типов карбапенемаз при использовании Dream Taq Hot Start PCR Master Mix.

Температура, °С	Время	Количество циклов
50	2'	1
95	20''	1
95	5''	40
59	30''	
детекция флуоресц. сигнала		

Таблица 4 – Протокол компонентов мультиплекс ПЦР для выявления генов основных типов карбапенемаз при использовании Dream taq Hot Start PCR Master Mix.

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл
Dream taq Hot Start PCR Master Mix 2x	12,5
Смесь праймеров и зондов	2,63
Вода	5,14
ДНК	5
$\Sigma$	25

Выявление гена биосинтеза аэробактина *iucA* осуществляли с использованием ПЦР в режиме реального времени. Выделение ДНК проводили при помощи кипячения при 95 °С в течение 20 мин. Амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США). Праймеры и зонд для

амплификации гена биосинтеза аэробактина с длиной продукта и температурой плавления представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Праймеры и зонд для выявления гена биосинтеза аэробактина *iucA*.

Название	Последовательность	Краситель и гаситель зонда	Т отжига, °С	Длина ампликона, п.н.
<i>iucA_F</i>	GCGCAGTGCTTCCTTAATTCC		63,9	
<i>iucA_R</i>	CCAGCGGGATGATCAATTGGGTT		64,8	88 п.н.
<i>iucA_P</i>	CCGTCAGCCGCCAGTCTTTGGT	FAM/BHQ1	66,9	

Для проведения мультиплекс ПЦР в режиме реального времени использовали готовый мастермик БиоМастер HS-qPCR 2× («Биолабмикс», Россия) или Dream Taq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Температурный и покомпонентный протокол мультиплекс ПЦР составлены в соответствии с рекомендациями производителя и представлены в таблицах 6 и 7 соответственно.

Таблица 6 – Температурный протокол ПЦР в режиме реального времени на ген биосинтеза аэробактина *iucA*.

Температура, °С	Время	Количество циклов
95	3'	1
95	30''	
54	15'' детекция флуоресц. сигнала	35
72	20''	1

Таблица 7 – Протокол компонентов мультиплекс ПЦР на ген биосинтеза аэробактина *iucA*.

Компонент	Объем на одну реакцию, мкл
БиоМастер HS-qPCR 2× («Биолабмикс», Россия) / DreamTaq Hot Start PCR Master Mix	12,5
10 мкМ раствора прямого праймера	2,25
10 мкМ раствора обратного праймера	2,25
10 мкМ раствора зонда	1,25
Вода	1,75
ДНК	5
Σ	25

### **2.3. Подготовка библиотек коротких прочтений**

Набор PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, США) использовался для выделения геномной ДНК. Подготовку библиотек коротких прочтений проводили с помощью набора Nextera XT DNA Library Preparation Kit. Для получения парно-концевых ридов использовали набор MiSeq Reagent Kit v3 (600 циклов, Illumina, США). Для баркодирования библиотек использовался набор Nextera XT Index Kit (Illumina, США), для очистки – AMPure XP Beads (Beckman Coulter, США). Валидирование библиотек проводили с помощью набора dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США) для измерения концентрации на Qubit 2.0 (Invitrogen, США), а также набора Agilent High Sensitivity DNA Kit с использованием для оценки размера библиотек на 2100 Bioanalyzer Instrument (Agilent, США). Средняя глубина покрытия на геном составила x55, точность распознавания азотистых оснований составила Q36 на изолят. Часть изолятов секвенировали на платформе Illumina HiSeq с покрытием >100X.

### **2.4. Секвенирование с получением длинных прочтений**

Выделение геномной ДНК для полногеномного секвенирования на платформе Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION из чистых культур осуществлялось с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Германия). Элюцию ДНК проводили в 100 мкл буфера. Образцы разводились до 1 мкг. Дальнейшая подготовка библиотек проводилась в соответствии с протоколом Native barcoding genomic DNA (SQK-LSK109, проточная ячейка R9.4.1). Для пришивания уникальных индексов использовался набор Native Barcoding Expansion 1-12 (EXP-NBD104). Индивидуальные ДНК-библиотеки пулировали с получением конечной концентрации пула 700 нг для последующей загрузки в прибор.

Риды MinION были обработаны с помощью программного обеспечения Guppy (v4.0.11), доступном от ONT. Параметр конфигурации точности распознавания азотистых оснований соответствовал Super-accurate. Параметрами фильтрации ридов низкого качества с большой вероятностью

ошибок являлись показатель Phred ( $Q \leq 10$ ) и длина менее 5 Кб. Средняя длина прочтений составляла 7 Кб.

## 2.5. Биоинформатический анализ данных

Гибридная сборка *de novo* как коротких ридов Illumina, так и длинных ридов MinION была выполнена с использованием Unicycler v0.4.7 по алгоритму SPAdes v.3.10.0 [20]. Для оценки качества сборок использовался инструмент QUAST.

Изоляты были проанализированы на наличие генов устойчивости к антибиотикам с помощью скрипта ResFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) и ABRicate 0.9.8 (<https://github.com/tseemann/abricate>), определены их ST, типы репликонов плазмид с помощью скрипта PlasmidFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) и системы рестрикции-модификации (PM) с помощью скрипта Restriction-ModificationFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/Restriction-ModificationFinder/>). Некоторые гены были представлены двумя нуклеотидными последовательностями каждая (обозначены .v1, .v2).

Скрипт ABRicate с интегрированной базой VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) и инструмент blastn использовался для выявления детерминант вирулентности. Скрипт Kaptive использовался для определения антигенов К и О [164]. Функциональная аннотация геномов проведена с помощью бактериологического биоинформатического онлайн-ресурса PATRIC 3.5.31 [7] и Kleborate v2.1.0 [73]. При использовании сервиса Kleborate, использовались следующие параметры: идентичность – 90 %, покрытие – 80 %.

Анализ полиморфизма проводили с помощью инструмента Riddikulus [10]. Последовательности CRISPR локусов идентифицировали с помощью сервиса CRISPRFinder [8]. Спейсеры CRISPR локусов анализировали на предмет их идентичности в генбанке NCBI путём поиска в базах данных нуклеотидов с помощью сервиса BLAST [9]. Инструмент SLING 2.0.1 использовался для поиска токсин-антитоксиновых систем (ТА) с помощью

встроенной базы данных доменов токсинов [59]. Каждый IS-элемент был классифицирован по базе данных ISFinder [140]. Для визуализации последовательностей плазмид использовали BRIG v.0.95 [16] и Easyfig v.2.2.2 [146].

Плазмида, несущая *bla*<sub>NDM-29</sub>, была выгружена в публичный репозиторий NCBI (номер доступа в генбанке NCBI MN624980; BioProject PRJNA522420), а также гибридные плазмиды: phvKpST395\_NDM-1\_1657 (номер доступа в генбанке NCBI CP072809; BioProject PRJNA719704) phvKpST147\_NDM-1\_1659 (номер доступа в генбанке NCBI CP072810; BioProject PRJNA719707), phvKpST147\_NDM-29 (номер доступа в генбанке NCBI CP066856; BioProject PRJNA522420), phvKpST395\_NDM-1\_1971 (номер доступа в генбанке NCBI MW911666), phvKpST395\_NDM-1\_2024 (номер доступа в генбанке NCBI MW911667), phvKpST874\_NDM-1\_2471 (номер доступа в генбанке NCBI MW911668), phvKpST15\_NDM-1\_2501 (номер доступа в генбанке NCBI MW911669), phvKpST395\_NDM-1\_2512 (номер доступа в генбанке NCBI MW911670), phvKpST147\_NDM-1\_2566 (номер доступа в генбанке NCBI MW911671). Стабильность белка NDM-29 рассчитывали на сервере EASE-MM [41].

Филогенетический анализ ядерного генома на основе однонуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism – SNP) проводился с использованием инструмента parsnp v1.2 [153]. Удаление сайтов рекомбинаций выполнено с помощью Gubbins 2.4.1 [27]. Геном изолята 90\_kpn использовался в качестве референса. Полученное выравнивание было использовано для построения филогенетического дерева максимального правдоподобия с использованием инструмента IQ-TREE (v1.6.1, <http://www.iqtree.org/>) с числом бутстрэп итераций 100. Модель нуклеотидных замен, автоматически выбранная модулем ModelFinder, была TVM+F+ASC+R2. Для визуализации использовалось интерактивное программное обеспечение Interactive Tree of Life (IToL, v6, <https://itol.embl.de/>). Кластерный анализ вариантов гена *bla*<sub>NDM-like</sub>, проводили в Geneious Prime 2019.1.1 (<https://www.geneious.com>). Картирование

коротких прочтений на референсную плазмидную последовательность производилось с использованием Burrows Wheeler Aligner (0.7.17), а для идентификации SNP использовался SAMtools (v1.2).

Структуру белков моделировали с помощью PyMOL (Version 3.0 Schrödinger LLC).

## **2.6. Клонирование *bla*<sub>NDM-29</sub> и *bla*<sub>NDM-1</sub>**

### **2.6.1. Амплификация, гель-электрофорез, выделение ДНК**

Фрагмент ДНК размером 1139 п.н., несущий МБЛ, NDM-29, вместе с его нативным промотором, амплифицировали с использованием праймеров F\_NDM\_clon-forward (5'-CTGGGTCGAGGTCAGGATAG-3') и R\_NDM\_clon-reverse (5'-TTTGCTCAGCTTGTTGATTATC-3') и высокоточной полимеразы Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). В качестве реципиента использовался штамм *E. coli* XL10-Gold (endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 tetP F [proAB lacIqZΔM15 Tn10 CmR] TR10) (Stratagene, Великобритания). Фрагмент ДНК, несущий МБЛ, NDM-1, вместе с его нативным промотором использовался в качестве контроля.

Для разделения продуктов реакции проводили электрофорез в 0,9% агарозном геле TopVision (Thermo Fisher Scientific, США). Для визуализации использовался GelDoc (Bio-Rad, США), а также маркер длины ДНК 100 п.н. (100-3000 п.н., Ахурреп, США). ДНК выделяли из геля с использованием набора GeneJET (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

### **2.6.2. Приготовление компетентной культуры клеток *E. coli***

Отдельные бактериальные колонии (5-6) *E. coli* XL10-Gold переносили в 125 мл бульона Lysogeny broth (LB) в литровой колбе. Культуру инкубировали при 18-25 °C до OD 600 = 0,6. Бактериальные клетки затем переносили в стерильные центрифужные пробирки. Далее культуру охлаждали на льду в течение 10 минут. Бактериальные клетки центрифугировали при 4100 об/мин в

течение 10 минут при 4 °С, после чего удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 40 мл буфера (10 мМ Hepes, 55 мМ MnCl<sub>2</sub>, 15 мМ CaCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl) и инкубировали на льду в течение 10 минут. Затем бактериальные клетки снова центрифугировали при 4100 об/мин в течение 10 минут при 4 °С, после чего удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 10 мл буфера (0,1 М CaCl<sub>2</sub>), добавляли 750 мкл диметилсульфоксида (ДМСО). Взвесь инкубировали на льду в течение 10 минут. Далее клеточную взвесь аликвотировали по 200 мкл и замораживали при -70 °С.

### 2.6.3. Трансформация

Лигирование продуктов амплификации в вектор pJET, содержащий ген β-лактамазы (устойчивости к ампициллину), в сайтах рестрикции NdeI и XbaI осуществляли при помощи набора для клонирования CloneJET PCR (Thermo Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя с поправками (Таблица 8). Набор CloneJET PCR использовался для лигирования продуктов амплификации в вектор pEGFP-N3, содержащий ген устойчивости к канамицину, в сайтах рестрикции XhoI и HindIII. Структура двух типов векторов представлена на рисунке 2.

Таблица 8 – Покомпонентный протокол лигирования векторов.

Компонент	Объем на одну реакцию для вектора pJET, мкл	Объем на одну реакцию для вектора pEGFP-N3, мкл
2x буфер	5	2
вставка	1	10
вектор	0,5	3,5
вода	2,5	3,5
T4 ДНК лигаза	1	1
Σ	10	20

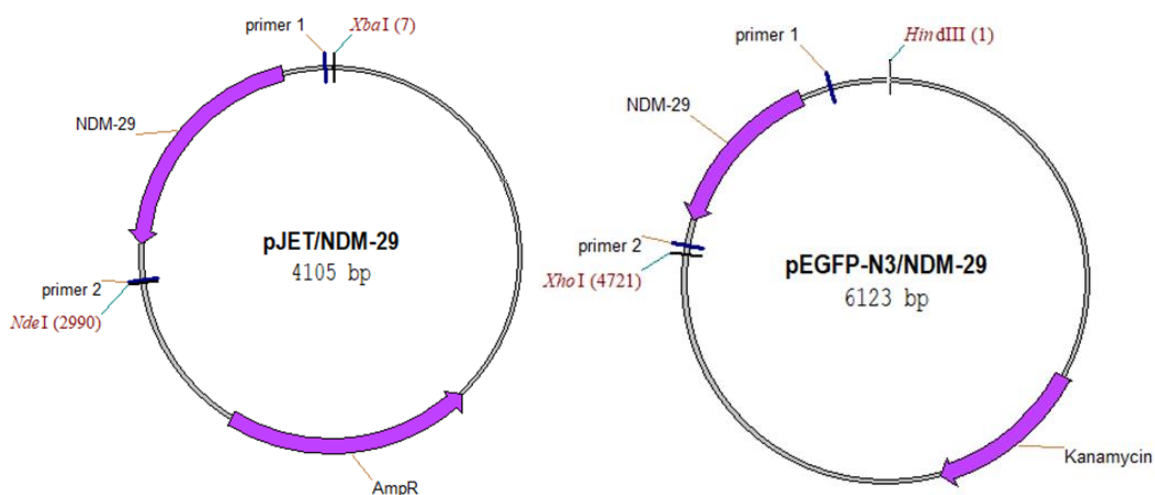


Рисунок 2 – Карта векторов pJET/NDM-29 и pEGFP-N3/NDM-29 с обозначенными сайтами рестрикции

Для получения рекомбинантных плазмид pJET1.2/NDM-29 и pJET1.2/NDM-1, pEGFP-N3/NDM-29 и pEGFP-N3/NDM-1 была проведена химическая трансформация компетентных клеток *E. coli* лигированными векторами. Так, 10 мкл лигированных плазмид переносили в 200 мкл суспензии компетентных клеток. Суспензию смешивали, взбалтывая, и инкубировали на льду в течение 30 минут при 4 °С. Далее пробирки с суспензией помещали в предварительно нагретую до 42 °С водяную баню с циркуляцией на 45 секунд. Затем пробирки быстро переносили на ледяную баню и инкубировали в течение 1 минуты. В пробирки добавляли 500 мкл бульона LB и инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После инкубации 100 мкл трансформированных компетентных клеток переносили на LB агар с концентрацией ампициллина 50 мкг/мл. После чего трансформанты инкубировали при 37 °С в течение 16 часов.

#### 2.6.4. Выделение плазмидной ДНК, электрофорез, рестрикция

1. Инкубировали культуру при 37 °С в среде Terrific Broth (TBR, триптон «Васто», дрожжевой экстракт, глицерин) в течение 16 часов. Затем 2 мл ночной культуры центрифугировали при 3000 об/мин в течение 7 минут. Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 200 мкл H<sub>2</sub>O.



2. Далее во взвесь добавляли 400 мкл свежего раствора для лизиса (0,2 М NaOH + 1% додецилсульфат натрия, SDS) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5-10 минут.

3. Также добавляли 300 мкл 5 М ацетата калия и инкубировали на льду в течение 10 минут. Далее взвесь центрифугировали в течение 5-7 минут на максимальной скорости, после чего супернатант переносили в новую пробирку.

4. Во взвесь добавляли 600 мкл изопропанола и инкубировали в течение 5-10 минут при комнатной температуре. Далее пробирки центрифугировали в течение 7 минут при комнатной температуре, а супернатант удаляли.

5. Далее добавляли 200 мкл 80% этанола и ресуспендировали. Клетки центрифугировали в течение 5 минут при комнатной температуре, после чего удаляли супернатант.

6. Затем добавляли 200 мкл H<sub>2</sub>O и инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 15 минут.

7. Далее добавляли 200 мкл 9М LiCl, охлаждали 15-20 минут при -20 °С, осаждали в течение 7 минут при комнатной температуре, с последующим переносом супернатанта в новую пробирку.

8. Вносили 900 мкл этанола, охлаждали 10 минут при -20 °С. Получали клеточный осадок в результате 7 минутного центрифугирования.

9. К осадку клеток вносили 400 мкл воды, 1 мл этанола и 40 мкл 3 М ацетата натрия (рН = 8,0). Взвесь охлаждали 10 минут при -20 °С. Получали клеточный осадок в результате 7 минутного центрифугирования с его последующей сушкой.

10. Затем для элюции плазмидной ДНК добавляли 15-20 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл РНКазы (10 мкг/мл). Так раствор инкубировали в течение 1 часа.

Электрофорез проводили для определения концентрации плазмиды как описано в пункте 2.6.1. Для валидации вставок целевых генов в векторах проводили рестрикцию (Таблица 9). Реакция проводилась с использованием 10X FastDigest буфера и ферментов рестрикции NdeI, XbaI, XhoI, HindIII (Thermo Scientific, США).

Таблица 9 – Протокол рестрикции ДНК с использованием выбранных рестриктаз и 10X FastDigest буфера.

Компонент	Объем на одну реакцию для вектора рJET, мкл	Объем на одну реакцию для вектора рEGFP-N3, мкл
10x FastDigest буфер	2	5
ДНК	2	20
FastDigest фермент 1	NdeI 0,5	XhoI 1
FastDigest фермент 2	XbaI 0,5	HindIII 1
вода	15	23
$\Sigma$	20	50

Следующим этапом валидации вырезанной вставки проводился гель-электрофорез, как описано в пункте 2.6.1. Продукты рестрикции разделялись на два ряда бэндов, где ДНК размером ~1100 п.н. соответствует вставке, и ДНК размером ~3000 п.н. соответствует вектору. Плазмиды образцов, в которых подтвердилось наличие вставки, использовались во втором этапе химической трансформации компетентной культуры клеток *E. coli*, как описано в пункте 2.6.3.

### 2.6.5. Секвенирование по Сэнгеру

Секвенирование по Сэнгеру использовали для валидации последовательностей клонированных вставок. Для вектора рEGFP-N3 использовался праймер NDM-F-forward (5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC-3') и M-NDM-R-reverse (5'-TGCTCAGTGTCGGCATCACCC-3'). Праймер для прямого секвенирования рJET1.2 (5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3 ') и праймер для обратного секвенирования рJET1.2 (5'-AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG-3') использовались для вектора рJET1.2 (CloneJET PCR Cloning Kit, Life Technologies).

## 2.7. Септическая модель мышей

Вирулентность отдельных изолятов гипермукоидных CRKp карбапенем-резистентных *K. pneumoniae* была проверена на септической мышинной модели с последующим подсчетом LD<sub>50</sub> методом Рида и Мюнха [121]. Эксперимент на животных одобрен биоэтической комиссией ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России и

Брянской межрегиональной ветеринарной лабораторией. Все мыши содержались в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63 / EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза о защите животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 г., и руководством по содержанию и использованию лабораторных животных. Были приложены все усилия, чтобы минимизировать страдания животных. Всего было отобрано пять репрезентативных изолятов СК-hvKp. Использовали беспородных мышей-самцов CD1 (15-20 граммов). Мышей заражали подкожно. Подкожные инъекции выполняли после культивирования изолятов в течение ночи в бульоне LB при 37 °С. Одновременно проводили два независимых эксперимента, в которых две группы по 5 мышей заражали каждой из концентраций инокулята:  $1 \times 10^5$  КОЕ/мл,  $1 \times 10^4$  КОЕ/мл,  $1 \times 10^3$  КОЕ/мл. За мышами наблюдали до 14 дней на предмет развития тяжелого заболевания или до смерти. Выделение изолятов *K. pneumoniae* из крови и органов брюшной полости свидетельствовало о причине летального сепсиса, вызванного данным микроорганизмом. Для первичного скрининга изолятов проводили внутрибрюшное инфицирование мышей в дозе  $10^6$  КОЕ/животное с последующим двухнедельным наблюдением. Для определения LD<sub>50</sub> отбирались культуры, вызывающие гибель особи если в течение периода наблюдения.

## **2.8. Обработка результатов исследования**

Результаты исследования анализировались с помощью Unipro Ugene, Vector NTI, SnapGene, Geneious. Для работы с массивами данных МПК использовали программу WHONET 5.6. (<https://whonet.org/software.html>). Все данные обработаны методами описательной статистики, с использованием пакета прикладных программ MS Excel, Statistica.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Формирование коллекции

Коллекция была составлена из нескольких сборов, отвечающих различным критериям. Критериями для отбора изолятов в результирующую коллекцию потенциально конвергентных, гипервирулентных и CRKp, являлась продукция карбапенемаз методом ПЦР, или устойчивость к карбапенемным антибиотикам меропенем/эртапенем/дорипенем в соответствии с микробиологическими точками отсечения EUCAST, или гипермукоидный фенотип по результатам стринг-теста.

К первому сбору относились изоляты энтеробактерий, полученные от пациентов в ОРИТ многопрофильных стационаров Москвы и Санкт-Петербурга, устойчивые к карбапенемам (МПК меропенема  $>0,125$  мг/л, эртапенема  $>0,125$  мг/л). Было собрано 258 изолятов *Enterobacteriaceae* с июля 2019 по январь 2020 г. Итого из данного сбора в результирующую коллекцию вошло 252 изолята *K. pneumoniae*.

В специализированном стационаре Санкт-Петербурга с апреля 2017 по февраль 2020 был проведён сбор изолятов *Klebsiella sp.*, являющихся этиологически значимыми при развитии инфекционных осложнений, а также смывы с объектов внутрибольничной среды. Для сбора образцов с поверхностей внутрибольничной среды были выбраны отделения, в которых устойчивые изоляты *K. pneumoniae* являлись наиболее частыми этиологическими агентами у пациентов с летальным исходом: онкологическое, хирургическое, абдоминальное, колопроктологическое, урологическое, анестезиологии и реаниматологии для взрослых. Сбор образцов с объектов внутрибольничной среды проводился с поверхностей, таких как внутренние поверхности труб раковин под сливом, руки и специализированная одежда персонала, матрацы, различные рабочие поверхности, ручки дверей, туалетные

комнаты, комнаты персонала. Сбор биоматериала проводился трижды с октября 2018 г. по октябрь 2019 г. с кратностью 1 неделя в квартал. Итого из данного сбора было получено 150 изолятов *K. pneumoniae*, при этом с объектов внутрибольничной среды – 5, выделенных из ректальных мазков пациентов при поступлении в стационар – 69. Таким образом, в результирующую коллекцию вошло 97 изолятов *K. pneumoniae*.

К третьему сбору относились 97 устойчивых к карбапенемам и положительных по стринг-тесту клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в стационарах Красноярска, Санкт-Петербурга, Москвы, Перми, Хабаровска, Нижнего Новгорода, Казани, Мурманска, Ханты-Мансийска с декабря 2021 по март 2022. Среди данного сбора в результирующую коллекцию вошло 88 изолятов *K. pneumoniae*.

Также в коллекцию вошли 8 изолятов музея граммотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России чувствительные к карбапенемам при наличии карбапенемаз. Изоляты были выделены в 2016, 2018 и 2019 гг. из 5 стационаров Санкт-Петербурга и одного стационара Москвы.

Итого, было собрано и проанализировано 1290 изолятов *K. pneumoniae*. Критериям результирующей коллекции удовлетворило 444 изолята *K. pneumoniae*, выделенные от пациентов из клинически значимых локусов и наиболее значимых поверхностей внутрибольничной среды в 2016-2022 гг. Изоляты *K. pneumoniae* были собраны из 25 лечебных учреждений среди 8 городов России включая Красноярск, Санкт-Петербург (10 стационаров), Москву (8 стационаров), Пермь, Хабаровск, Нижний Новгород, Казань, Мурманск. Коллекция изолятов неравномерно распределена по территории сбора, где превалирующее количество изолятов было получено из стационаров Санкт-Петербурга и Москвы, в то время как из городов других регионов страны было получено меньшее число (Рисунок 3).

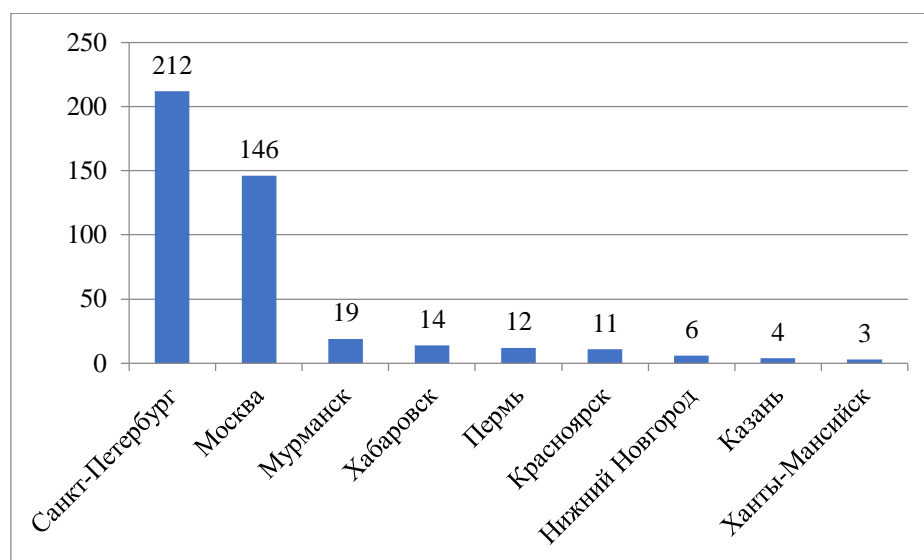


Рисунок 3 – Распределение количества выделенных изолятов *K. pneumoniae* по географическому объекту РФ

Источниками выделения изолятов *K. pneumoniae* являлись: кровь (19,1%), мокрота (13,7%), моча (11,5%), БАЛ (10,8%), трахеальный аспират (9,7%), раневое отделяемое (8,3%), от 0,2 до 1,8% составляли плевральная жидкость, катетер, кал, дренаж, брюшная жидкость, ротоглотка, ректальный мазок, отделяемое зева, отделяемое уха, ликвор, абсцесс, гной, промывные воды бронхов, центральный катетер, выпот, кожа, конъюнктив, перикардиальная жидкость, печень, легкое, сердце (Рисунок 4).

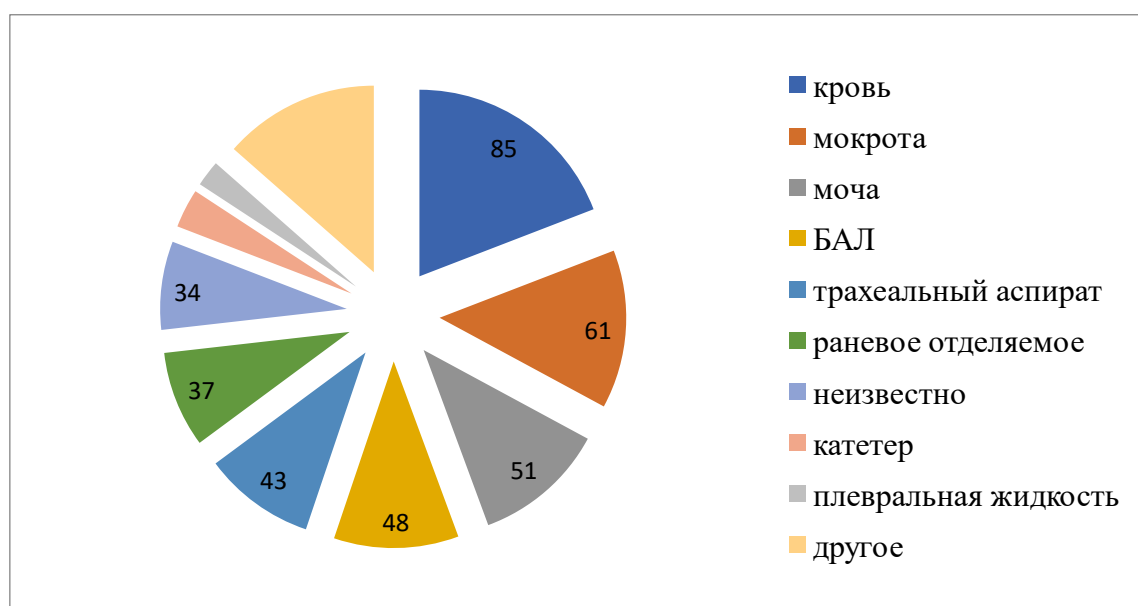


Рисунок 4 – Источники выделения изолятов *K. pneumoniae* изучаемой коллекции

## 3.2. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика изолятов *K. pneumoniae*

### 3.2.1. Генотипическая оценка изолятов *K. pneumoniae*

По данным мультиплексного ПЦР анализа среди полученных образцов *K. pneumoniae* 87% изолятов оказались продуцентами карбапенемаз. Результатом генотипирования карбапенемаз исследуемых изолятов стало выявление преобладающих NDM-, OXA-48-типов, и менее представленного KPC-типа; а также продукция комбинаций карбапенемаз: KPC+OXA-48, KPC+NDM, NDM+OXA-48, где последний обладает наибольшей представленностью исходя из распространения их моно-продуцентов (Таблица 10). Данные о распространении карбапенемаз в различных регионах РФ свидетельствуют о гетерогенности их состава на различных территориях.

Таблица 10 – Распространение генов карбапенемаз среди собранной коллекции изолятов *K. pneumoniae*.

Микроорганизм	Количество изолятов в коллекции	Карбапенемаза	Доля продуцентов карбапенемаз, %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	444	NDM	30,8
		KPC	3,2
		OXA-48	35,7
		KPC+OXA-48	1,6
		NDM+OXA-48	15,4
		KPC+NDM	0,5
		отрицательно	12,8

Не смотря на небольшое количество изолятов (n=3-19), собранных в городах отличных от Санкт-Петербурга и Москвы, результаты свидетельствуют о преимущественной циркуляции в стационарах Санкт-Петербурга, Казани и Ханты-Мансийска изолятов, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы NDM-типа, в то время как штаммы-продуценты OXA-48 преобладают в Москве, Нижнем Новгороде и Хабаровске (Рисунок 5). В Перми отмечается равное распределение продуцентов как NDM, OXA-48, так и KPC карбапенемаз. В отдельных городах наблюдается узкий спектр разнообразия карбапенемаз, с

превалированием  $\beta$ -лактамаз одного типа. Помимо Санкт-Петербурга и Москвы к таким городам относятся Хабаровск и Ханты-Мансийск. В Мурманске наблюдается наиболее благополучная ситуация, отражающаяся в низкой распространенности карбапенемаза-продуцирующих изолятов. Таким образом, превалирование разных генотипов клебсиелл в различных городах России обуславливает невозможность оценивать распространение продуцентов карбапенемаз по данным одного региона. Рассмотрение популяции клебсиелл как единое целое, и приведение результатов без разделения данных, становится малоинформативным. Появляется необходимость фрагментирования больших коллекций в контексте специфики конкретного региона с учётом генетических маркеров, классов карбапенемаз, чувствительности к антибиотикам.

На основе данных ПЦР ген аэробактин синтетазы, *iucA*, обнаружен у 81% изолятов (n=146) изучаемой коллекции, являющийся по работе Russo T.A. и соавт. [128] одним из пяти маркеров с точностью 97%, выявляющих hVКр. Вследствие, можно сделать вывод о превалировании в коллекции потенциально вирулентных изолятов *K. pneumoniae*.



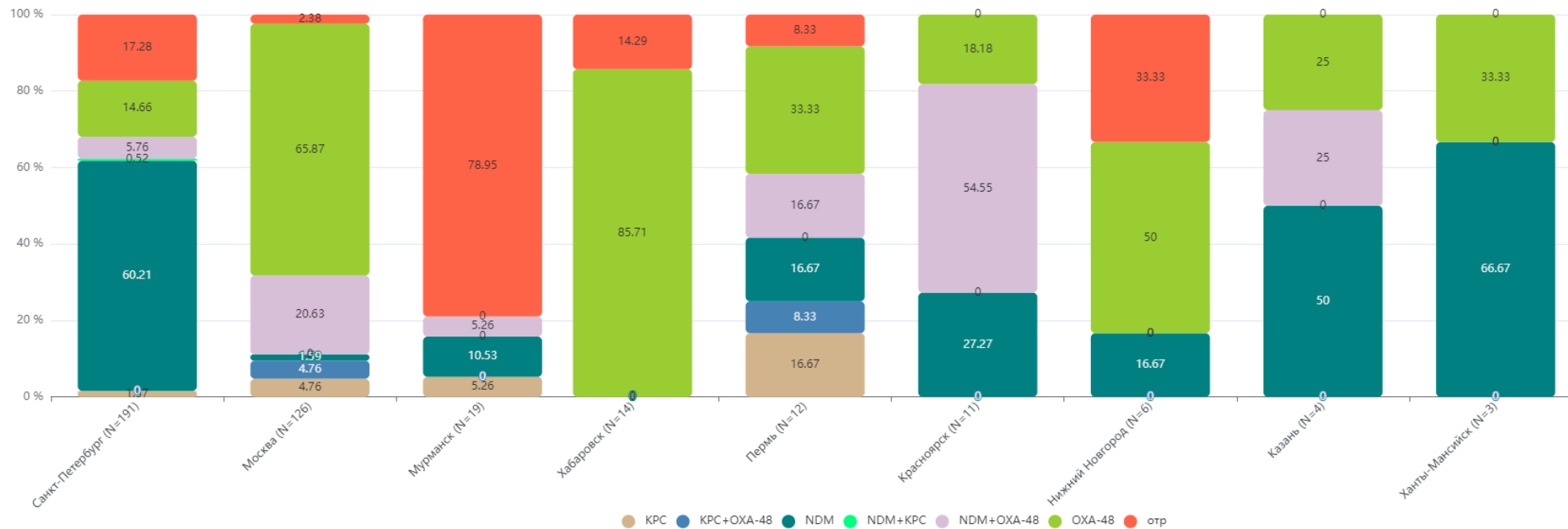


Рисунок 5 – Распределение продуцентов карбапенемаз *K. pneumoniae* по географическому объекту, процент от числа по группе

### 3.2.2. Фенотипическая оценка микробиологической активности изолятов *K. pneumoniae*

Изоляты исследуемой коллекции (n=403) демонстрировали множественную устойчивость к антибиотикам разных групп (Таблица 11). Подавляющее большинство изолятов проявляли резистентность к карбапенемам, цефалоспорином, фторхинолонам, и триметоприм-сульфаметоксазолу (от 84-94% устойчивых изолятов), однако частично сохраняли чувствительность к аминогликозидам. Продуценты МБЛ проявляли меньшую чувствительность к последним (53% чувствительных изолятов к гентамицину, 13% – к амикацину), нежели СБЛ (65% чувствительных изолятов к гентамицину, 37% – к амикацину), что показано в таблице 12. Большая доля продуцентов СБЛ (83%) проявляла резистентность к меропенему по сравнению с продуцентами МБЛ (66%).

Таблица 11. Устойчивость изолятов собранной коллекции *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам (n=403).

Антибиотик	Кол-во	%R	%I	%S	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>	МПК (мкг/мл)	
							С <sub>геом.</sub>	Диапазон
Ципрофлоксацин	441	94,8	0,5	4,8	32	64	26,7	0,06-512
Цефепим	423	94,1	2,8	3,1	32	32	26,8	0,06-512
Цефтазидим	433	91,9	2,1	6,0	64	128	39,8	0,06-512
Триметоприм-сульфаметоксазол	441	84,1	2,9	12,9	64	64	29,3	0,06-256
Тигециклин	441	76,6	0,0	23,4	2	8	1,7	0,03-256
Амикацин	441	66,7	0,0	33,3	64	64	22,2	0,25-512
Меропенем	441	65,8	16,1	18,1	32	32	9,4	0,004-128
Цефтазидим-авибактам	412	38,8	0,0	61,2	2	16	3,4	0,03-256
Гентамицин	441	35,4	0,0	64,6	1	64	2,4	0,06-512
Колистин	441	11,8	0,0	88,2	0,25	8	0,4	0,004-256
Азтреонам-авибактам	433	4,6	3,0	92,4	0,25	1	0,3	0,008-64

**Примечание:** С<sub>геом</sub> – средняя геометрическая.

Таблица 12. Сравнение уровня резистентности (%) продуцентов СБЛ и МБЛ к различным антибиотикам.

Антибиотик	СБЛ			МБЛ			Уровень значимости (p)
	S	R	N	S	R	N	
Азтреонам-авибактам	92,31	2,83	247	90,31	2,55	196	0,4
Колистин	86,69	13,31	248	89,16	10,84	203	0,2
Цефтазидим-авибактам	74,9	25,1	247	20,11	79,89	184	< 0,00001*
Гентамицин	65,73	34,27	248	53,2	46,8	203	0,003*
Амикацин	37,5	62,5	248	13,3	86,7	203	< 0,00001*
Тигециклин	20,97	79,03	248	27,09	72,91	203	0,06
Триметоприм-сульфаметоксазол	12,1	83,47	248	9,36	86,21	203	0,2
Меропенем	7,26	83,06	248	7,88	66,5	203	< 0,00001*
Цефтазидим	4,03	95,56	248	0,51	98,98	197	0,0001*
Ципрофлоксацин	4,03	95,56	248	0	99,51	203	0,004*
Цефепим	1,63	95,12	246	0,53	98,4	188	0,03*

**Примечание:** \* – статистически значимые различия при сравнении доли устойчивых (R) изолятов при  $p < 0,05$ . N – количество изолятов.

Наибольшую чувствительность (92%; 88%; 64%; 61%) изоляты *K. pneumoniae* проявляли к комбинации азтреонама-авибактама, колистина, гентамицина, и цефтазидима-авибактама соответственно. Исключение составляют продуценты МБЛ в отношении комбинации ингибитор-защищенного цефалоспориона, цефтазидима-авибактама. Доля чувствительных штаммов-продуцентов МБЛ к азтреонаму-авибактаму составляет 90%, что подтверждает тот факт, что металлоферменты не гидролизуют монобактамы. Более высокое процентное соотношение изолятов чувствительных к азтреонаму-авибактаму, чем к цефтазидиму-авибактаму, подтверждает дополнительную активность азтреонама в отношении полирезистентных изолятов.

Также продуценты МБЛ характеризовались ассоциированной устойчивостью к аминогликозидам из-за схожих последовательностей вставки, которые фланкируют МГЭ, содержащие ген *bla<sub>NDM</sub>* и ген устойчивости к аминогликозидам (*aphA6*). Данный факт подтверждается сниженной долей устойчивых продуцентов ОХА-48 к вышеупомянутому классу антибиотиков при сравнении с продуцентами NDM (26% продуцентов ОХА-48 и 44%

продуцентов NDM устойчивых к гентамицину; 46% продуцентов ОХА-48 и 82% продуцентов NDM устойчивых к амикацину,  $p < 0,0001$ ). Другим отличием в тенденции антибиотикорезистентности *K. pneumoniae* продуцентов  $\beta$ -лактамаз ОХА-48-типа от NDM-типа также является проявление первыми меньшего уровня резистентности к цефтазидиму-авибактаму (3% – продуценты ОХА-48, 81% – продуценты NDM,  $p < 0,00001$ ), однако меньшего процента чувствительных изолятов к тигециклину (17% – продуценты ОХА-48, 27% – продуценты NDM,  $p < 0,05$ ). При этом *K. pneumoniae*, ко-продуцирующие карбапенемазы NDM и ОХА-48, характеризовались большим уровнем устойчивости к меропенему (85/56%) и меньшим уровнем устойчивости к комбинации триметоприм-сульфаметоксазол (79/89%) при сравнении с моно-продуцентами NDM, а также большим уровнем устойчивости к амикацину (95/46%) при сравнении с моно-продуцентами ОХА-48 (Таблица 13).

Таблица 13. Сравнение уровня резистентности (%) продуцентов карбапенемаз NDM, ОХА-48 и ко-продуцентов NDM+ОХА-48 к различным антибиотикам.

Антибиотик	NDM				ОХА-48				NDM+ОХА-48		
	S	R	N	p	S	R	N	p	S	R	N
Азтреонам-авибактам	90,55	1,57	127	0,1	94,9	2,55	157	0,2	92,54	4,48	67
Гентамицин	55,22	44,78	134	0,3	73,42	26,58	158	0,0005*	50,75	49,25	67
Тигециклин	27,61	72,39	134	0,3	17,72	82,28	158	0,1	23,88	76,12	67
Цефтазидим-авибактам	18,26	81,74	115	0,2	96,18	3,82	157	0,00001*	22,39	77,61	67
Амикацин	17,91	82,09	134	0,004*	53,8	46,2	158	0,00001*	4,48	95,52	67
Меропенем	10,45	56,72	134	0,00001*	8,86	81,01	158	0,2	2,99	85,07	67
Колистин	9,7	90,3	134	0,2	86,71	13,29	158	0,5	86,57	13,43	67
Триметоприм-сульфаметоксазол	8,96	89,55	134	0,02*	11,39	86,71	158	0,07	10,45	79,1	67
Цефтазидим	0,78	99,22	128	0,00001*	7,59	87,97	158	0,005*	0	98,51	67
Ципрофлоксацин	0	99,25	134	0,2	6,33	93,04	158	0,01*	0	100	67
Цефепим	0	98,32	119	0,5	1,27	93,63	157	0,06	1,49	98,51	67

**Примечание:** \* – статистически значимые различия при сравнении доли устойчивых (R) изолятов продуцентов NDM с ко-продуцентами NDM+ОХА-48 и продуцентов ОХА-48 с ко-продуцентами NDM+ОХА-48 при  $p < 0,05$ . N – количество изолятов.

Изоляты *K. pneumoniae*, несущие ген биосинтеза аэробактина и не продуцирующие карбапенемазы, считались потенциально вирулентными. Они проявляли более высокий уровень чувствительности к антибиотикам разных классов при сравнении с изолятами *K. pneumoniae*, продуцирующими карбапенемазы различных типов, что соответствует характеристике вирулентного патотипа клебсиелл (Таблица 14). Так, среди изолятов с геном биосинтеза аэробактина более низкая доля устойчивых изолятов наблюдалась к амикацину (38/73%,  $p < 0,05$ ), меропенему (11/78%,  $p < 0,05$ ), цефепиму (60/100%,  $p < 0,05$ ) и цефтазидиму-авибактаму, к которому не было устойчивых изолятов среди потенциально вирулентных *K. pneumoniae* (0/66%,  $p < 0,05$ ). При характеристике изолятов *K. pneumoniae*, имеющих сочетанный патотип – продукция карбапенемаз, гипермукоидность, ген биосинтеза аэробактина – мы наблюдаем сходство фенотипа с изолятами, продуцирующими карбапенемазы всех типов.

Таблица 14. Устойчивость изолятов *K. pneumoniae* разных патотипов к антибактериальным препаратам.

Антибиотик	Изоляты, несущие <i>iucA</i>				Карбапенемаз продуценты				Конвергентные		
	S	R	N	p	S	R	N	p	S	R	N
Азтреонам-авибактам	100	0	26	0,3	89,47	5,26	19	0,2	98,46	1,54	65
Цефтазидим-авибактам	100	0	23	0,00001*	33,33	66,67	15	0,2	43,33	56,67	60
Колистин	92,31	7,69	26	0,5	78,95	21,05	19	0,04*	92,31	7,69	65
Гентамицин	92,31	7,69	26	0,2	68,42	31,58	19	0,05	84,62	15,38	65
Амикацин	61,54	38,46	26	0,001*	26,32	73,68	19	0,4	27,69	72,31	65
Меропенем	84,62	11,54	26	0,004*	15,79	78,95	19	0,001*	36,92	40	65
Триметоприм-сульфаметоксазол	38,46	61,54	26	0,03*	10,53	89,47	19	0,2	18,46	80	65
Цефтазидим	36	64	25	0,05	5,88	94,12	17	0,09	14,52	80,65	62
Ципрофлоксацин	34,62	65,38	26	0,01*	0	100	19	0,04*	13,85	86,15	65
Цефепим	32	60	25	0,03*	0	100	19	0,01*	12,7	79,37	63
Тигециклин	15,38	84,62	26	0,5	31,58	68,42	19	0,06	15,38	84,62	65

**Примечание:** \* – статистически значимые различия при сравнении доли устойчивых (R) изолятов с геном *iucA* с конвергентными изолятами и продуцентов карбапенемаз с конвергентными изолятами при  $p < 0,05$ . N – количество изолятов.

Одним из признаков hvKp по сравнению с cKp, является наличие выраженной капсулы, которая фенотипически проявляется гипермукоидностью изолятов. Результаты стринг-теста показали, что 54% всей коллекции собранных изолятов и 26% изолятов *K. pneumoniae*, имеющих ген биосинтеза азробактина (*iucA*), проявляли гипермукоидный фенотип, что указывает на их потенциальную гипервирулентность (Рисунок 6). При этом различия между группами не являются статистически значимыми ( $p=0,1443$ ), из чего можно сделать вывод об отсутствии взаимосвязи между гипермукоидным фенотипом и наличием генов вирулентности в коллекции изолятов *K. pneumoniae*.

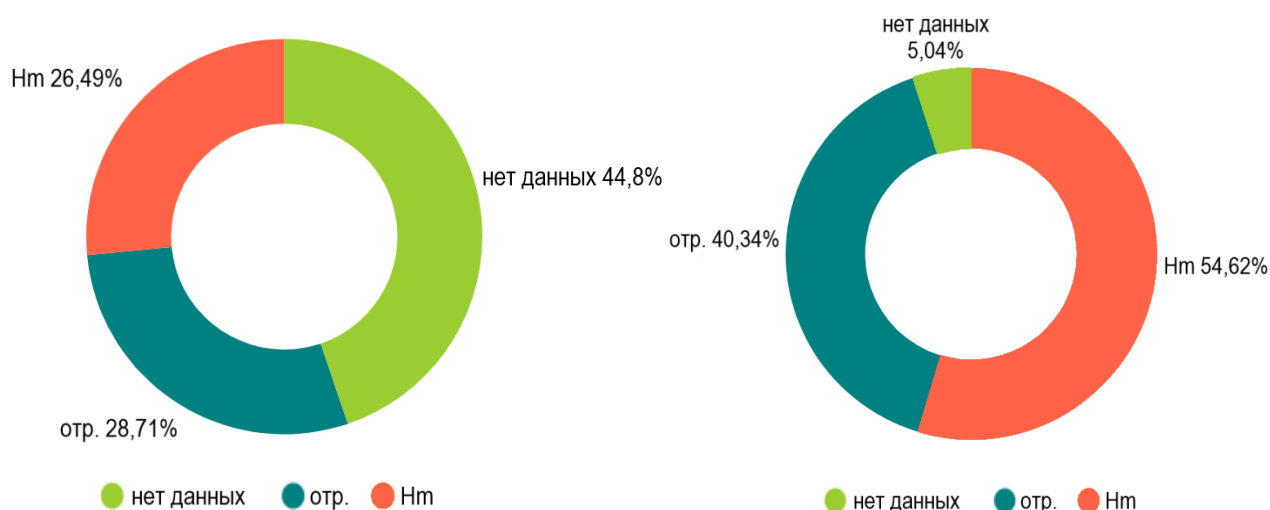


Рисунок 6 – Распределение изолятов *K. pneumoniae* на основании результатов стринг-теста. А – среди всех изолятов собранной коллекции (n=404). В – среди изолятов, имеющих ген *iucA* (n=119)

### 3.3. Результаты полногеномного секвенирования

Всего было отсеквенировано 318 геномов клебсиелл, из которых 286 изолятов секвенировали методом коротких прочтений на платформе Illumina MiSeq, 65 – методом длинных прочтений на платформе ONT GridION. Среди них гибридная сборка была получена для 33 изолятов коллекции, позволяющая определить локализацию генов на отдельных контигах, соответствующих хромосомной или плазмидной ДНК, копияность генов устойчивости к антибиотикам и генов вирулентности, а также типы репликонов плазмид.

Были получены следующие контрольные параметры качества сборок: размер генома составил 5,7 Мб (5,3-6,4 Мб), где самый длинный контиг соответствовала хромосоме (~5,3 Мб); N50, определяющее длину самого короткого контига, для которого более длинные и равные по длине контиги покрывают не менее 50% сборки: 1135 (62-5595) Кб; содержание GC: 56,7% (55,9-57,5%). Несколько геномов (n=15) имело значение нераспознанных азотистых оснований на 100 Кб более нуля и составляло от 0,05 до 16.

Недостатком платформы Illumina является длина считывания, которая ограничена 2x300 п.н. Платформа ONT позволяет получить риды до нескольких Мб, однако характеризуется высоким уровнем ошибок. Гибридная сборка сочетает в себе сборку на основе длинных ридов, улучшенную с помощью высококачественных коротких ридов с платформы Illumina (полировка). При анализе полученных гибридных сборок число контигов (> 1000 п.н.) варьировалось от 3 до 12, которые обеспечивали в среднем 145,96-кратное покрытие и составляли среднее значение N50 – 4,8 Мб. При этом отмечалось меньшее покрытие для длинных контигов и большее покрытие для коротких.

### **3.3.1. Генетические детерминанты антибиотикорезистентности в изолятах *K. pneumoniae***

С помощью молекулярно-генетического типирования было установлено, что изоляты изучаемой коллекции *K. pneumoniae* несли различные аллели приобретенных генов устойчивости в среднем с 13 детерминантами резистентности на изолят к восьми классам антибиотиков (Рисунок 7).

Наиболее представленной группой генов резистентности была группа детерминант, обуславливающих устойчивость к  $\beta$ -лактамам. Среди хромосомных  $\beta$ -лактамаз были обнаружены *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-11.v1</sub>, которыми обладает подавляющее большинство *K. pneumoniae*, а также присутствовали менее распространенные варианты *bla*<sub>SHV-28.v1</sub>, *bla*<sub>SHV-110</sub>, *bla*<sub>SHV-121</sub>, *bla*<sub>SHV-158</sub>. Были обнаружены БЛРС, обуславливающие устойчивость к цефалоспорином расширенного спектра действия и монобактамам – *bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, *bla*<sub>SHV-31.v1</sub>,  $\beta$ -лактамазы с узким спектром активности *bla*<sub>LAP-2</sub>,

*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9.v1</sub>, *bla*<sub>OXA-10</sub>, *bla*<sub>TEM-1D.v1</sub>, *bla*<sub>TEM-105</sub>, *bla*<sub>TEM-135.v1</sub>, *bla*<sub>SCO-1</sub>. В-лактамазы и БЛРС с устойчивостью к ингибиторам β-лактамаз в изучаемой коллекции изолятов *K. pneumoniae* не выявлялись.

Среди генов резистентности к аминогликозидам были обнаружены – *aac(3)-IIa.v1*, *aac(3)-Iid*, *aac(3)-Iie*, *aac(6')-Ian*, *aac(6')-Ib-cr.v2*, *ant(2'')-Ia*, *aph3-Ia.v1*, *aph(3')-VI*, *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Via*, *aph(3')-Ia*, *armA*, *strA.v1*, *strB.v1*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtF*, *aadA*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA16*, *sat-2*. Их механизм устойчивости относится к инактивации молекулы антибиотика, за исключением генов *arm/rmt*, кодирующих 16S рРНК метилтрансферазы, которые вызывают изменение мишени антибиотика. Ферменты, кодируемые семейством генов *aac*, выполняют функцию ацетилирования молекулы антибиотика, *aph* и *str* – фосфорилирования, *aad* – аденилирования.

Несмотря на выявление детерминант устойчивости к аминогликозидам у 98% культур, микробиологически изоляты проявляли вариабельный фенотип к амикацину и гентамицину (66,7% и 35,4% устойчивых, соответственно).

Устойчивость к фторхинолонам реализовывалась двумя плазмидно-кодируемыми механизмами. Среди генов резистентности к фторхинолонам были обнаружены гены *qnrS1*, *qnrB1.v1*, *qnrB1.v2*, *qnrB6*, *qnrB9.2*, *qnrE2*, обуславливающие защиту мишени. Вторым механизмом являлся эффлюксный насос, кодируемый геном *qepA2*. Мутации в ферментах-мишенях фторхинолонов – GyrA (S83Y, S83I, D87N, D87A) и ParC (S80I) – в дополнение, обуславливают резистентность к фторхинолонам. Они кодируют ДНК-топоизомеразы II и IV соответственно, необходимые для репликации и транскрипции ДНК. Данные мутации локализованы на 5'-конце гена, в так называемых областях, определяющих устойчивость к хинолонам. Выявление детерминант резистентности к фторхинолонам у 71% изолятов подтверждается фенотипической устойчивостью 94,8% изолятов к ципрофлоксацину.

Устойчивость к макролидам связана с действием гена *msrE*, кодирующего эффлюксный насос макролидов, генов фосфотрансфераз *mphA* и *mphE*, которые инактивируют молекулу антибиотика, гена *ereA2* кодирующего макролид



эстеразу, и гена *ermB.v1*, кодирующего метилирование рибосом метилтрансферазами. У изолятов изучаемой коллекции *K. pneumoniae* были обнаружены детерминанты устойчивости к хлорамфениколу. Гены *catA1*, *catB3.v2*, *catB4.v1*, *catII.2* кодируют ацетилтрансферазы, модифицирующие молекулы антибиотика, ген *cmlA5* кодирует эффлюксный мембранный транспортер, обеспечивающий выведение антибиотика из клетки.

Были выявлены гены *sul1*, *sul2*, кодирующие ферменты дигидроптероатсинтаз, обуславливающие устойчивость к действию сульфонамидов. Наличием плазмидно-локализованных генов, кодирующих дигидрофолатредуктазы, связано с устойчивостью к триметоприму. Данные ферменты, расщепляющие фолиевую кислоту, в отличие от хромосомного белка, являются менее чувствительными к ингибированию триметопримом. Среди генов резистентности к триметоприму в изучаемой коллекции изолятов *K. pneumoniae* были обнаружены гены *dfrA1.v1*, *dfrA5*, *dfrA12*, *dfrA17*. Выявление детерминант резистентности к сульфонидам и триметоприму у 90 и 84% изолятов соответственно подтверждается проявлением фенотипической устойчивости к комбинации триметоприма/сульфаметоксазола у 84,1% изолятов. Резистентность к тетрациклинам обеспечивалась генами *tet(A).v1*, *tet(D)*, кодирующих эффлюксные насосы.

Среди генов резистентности к рифампицину были обнаружены *arr-2*, *arr-3*, относящиеся к аденозиндифосфатрибозилтрансферазам. У одного изолята, также наблюдалось неточное соответствие аминокислот  $\beta$ -субъединицы РНК-полимеразы, кодируемых геном *rpoB*, мутации в котором ассоциируют с устойчивостью к рифампицину. Генов резистентности к фосфомицину, тигециклину выявлено не было. Несмотря на отсутствие обнаруженных генов устойчивости также и к колистину, выявлены усечения 40-89% регуляторного трансмембранного белка, кодируемого геном *mgrB*. Так, инактивация или подавление действия последнего является причиной резистентности *K. pneumoniae* к колистину. Данные мутации были обнаружены у 6%

отсеквенированных изолятов коллекции, что соответствует большей доле чувствительных штаммов (88,2%) по данным оценки фенотипа.

Выявлены усечения генов мажорных поринов OmpK35 от 6-90% длины аминокислот от стартового кодона и OmpK36 – до 86%. Это является, как правило, результатом мутации, приводящей к сдвигу рамки считывания и появлению преждевременного стоп-кодона, что соответственно обуславливает усечение белка, например, аминокислот, необходимых для встраивания порина во внешнюю мембрану. Были выявлены трансмембранные вставки OmpK36GD (Gly134Asp135) и OmpK36TD (Thr134Asp135) в  $\beta$ -петлю 3 с отрицательно заряженным остатком аспартата, который значительно сужает внутренний канал. Наиболее распространенной мутацией является глицин и аспарагиновая кислота, треонин и аспарагиновая кислота встречается реже, подразумевая менее оптимальную конформацию. Данные точечные мутации ассоциируют с повышением резистентности к карбапенемам и другим антибиотикам, сходным с потерей этого порина. Только 45 изолятов не имели дефектов поринов. Выявлены мутации гена *bla<sub>SHV</sub>* 35Q, 156D, 240K, являющиеся наиболее распространенными и связанными с подавляющим большинством БЛРС SHV-типа.

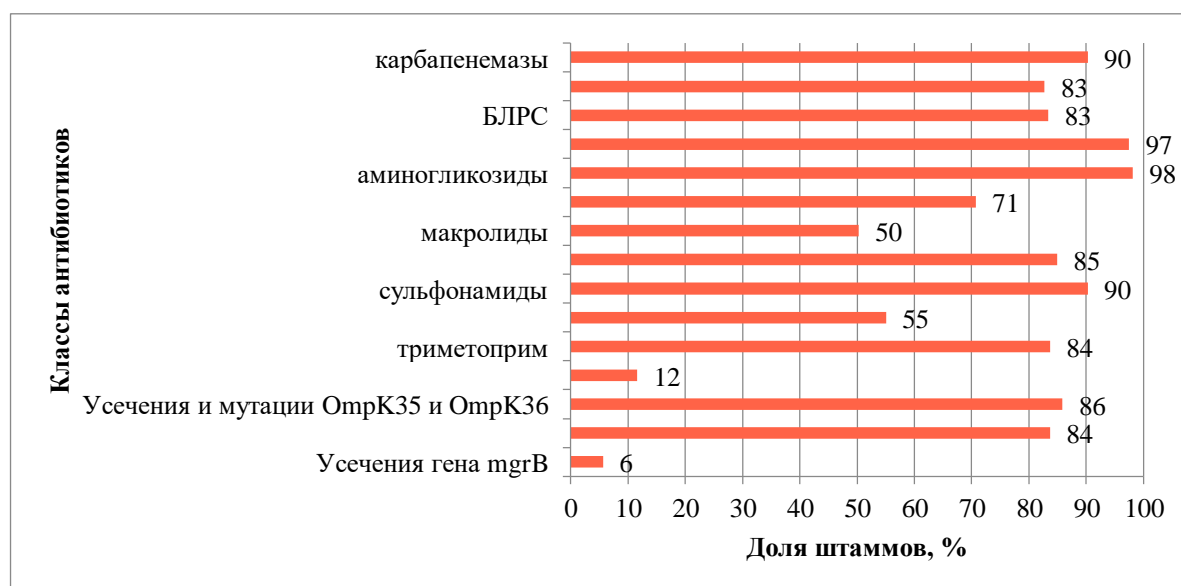


Рисунок 7 – Распространение генов антибиотикорезистентности к различным классам антибиотиков в изучаемых изолятах *K. pneumoniae* (n=318)

Среди карбапенемаз были обнаружены гены  $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{KPC-3}$ ,  $bla_{OXA-48}$ ,  $bla_{OXA-232}$ ,  $bla_{OXA-244}$ ,  $bla_{NDM-1}$ ,  $bla_{NDM-5}$ , которые выявлялись как отдельно, так и сочетанно у изолятов изучаемой коллекции *K. pneumoniae* (Рисунок 8). Наиболее распространенными среди них были монопродукты NDM-1 (26,1%) и OXA-48 (39,6%), а также их ко-продукты (10,4%). В меньшей степени в коллекции были представлены моно- и ко-продукты гена карбапенемазы KPC. Наблюдается соответствие между долей изолятов продуцентов карбапенемаз (90%) и проявлением фенотипической устойчивости к меропенему (71%) и цефалоспорином III-IV поколения (цефтазидим – 94,24%, цефепим – 96%). Однако наблюдаются некоторые колебания из-за наличия у изолятов *K. pneumoniae* разных типов карбапенемаз, а также наличием изолятов, продуцирующих карбапенемазы, но с МПК меропенема  $\leq 8$  мг/л. Фенотип последних, как правило, ассоциирован с однонуклеотидными заменами в промоторной области или другими причинами нарушения экспрессии  $\beta$ -лактамаз.

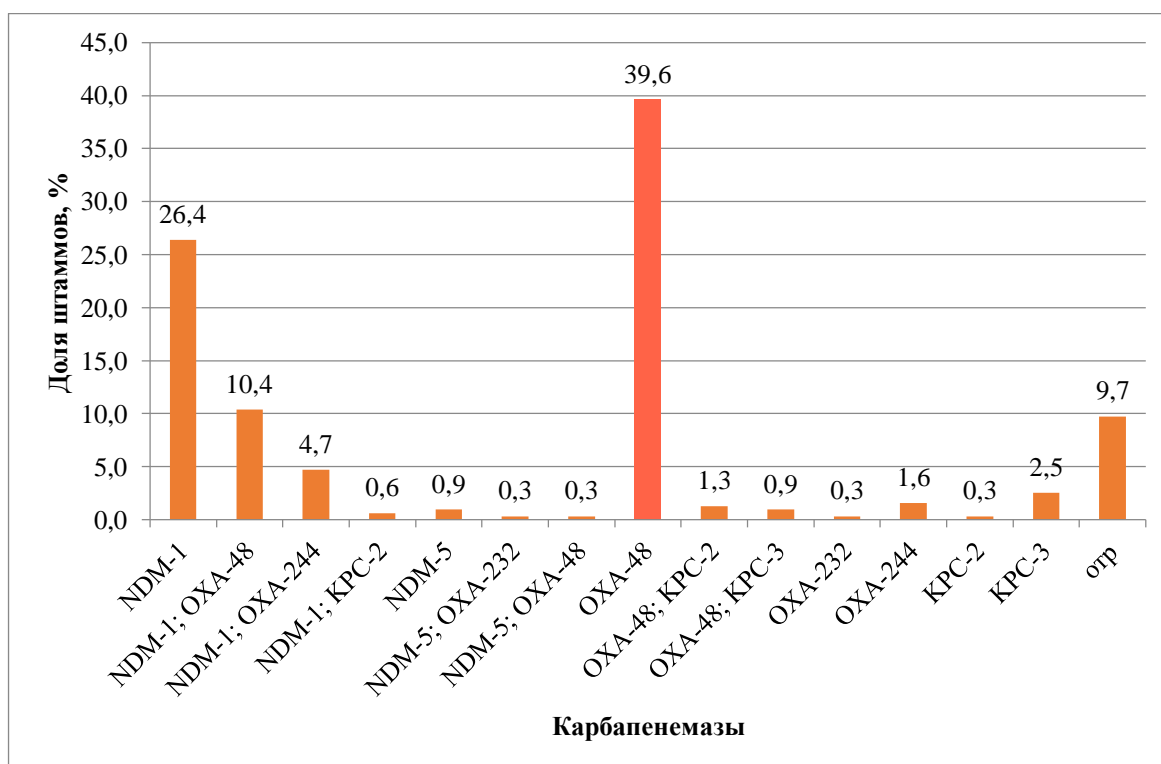


Рисунок 8 – Распространение генов различных типов карбапенемаз в изучаемых изолятах *K. pneumoniae* (n=318)

При сравнении результатов обнаружения генов карбапенемаз двумя методами, ПЦР и WGS, обнаружены незначительные расхождения (Таблица 15). При этом, среди продуцентов карбапенемаз фенотипическая устойчивость к комбинации цефтазидима-авибактама наблюдается у 41,4% изолятов, что согласуется с долей штаммов, несущих МБЛ, по данным WGS (43%).

Таблица 15 – Сравнение распространения генов карбапенемаз среди собранной коллекции изолятов *K. pneumoniae* по данным WGS и ПЦР.

Ген	по WGS	по ПЦР
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	87	96
<i>bla<sub>NDM</sub>+bla<sub>OXA-48</sub></i>	50	54
<i>bla<sub>NDM</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>	2	2
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	126	127
<i>bla<sub>OXA-48</sub>+bla<sub>KPC</sub></i>	7	7
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	9	10
отр	31	22
Всего изолятов с карбапенемазами	287	296

Необходимо отметить, что для ряда приобретенных генов резистентности наблюдалось усечение последовательности до 89% длины аминокислот от стартового кодона, включая гены *aac(6')-Ib-cr.v1*, *aac(6')-Ib'.v1*, *aadA*, *aadA2*, *aph(3')-VIa*, *aph(3')-VI*, *armA*, *rmtF*, *strA.v1*, *strB.v1*, *mphA*, *msrE*, *catB4.v1*, *catA1*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>CTX-M-139</sub>*, *bla<sub>CTX-M-156</sub>*, *bla<sub>TEM-105</sub>*, *bla<sub>LAP-2</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>OXA-9.v1</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>SHV-121</sub>*, *bla<sub>SHV-33</sub>*, *qepA2*, *qnrS1*, *sul2*, *sul1*, *tet(A).v1*. Результатом усечения гена может являться белок с потерей функциональности. В других случаях проявляются эффекты усиления или же отсутствие изменений функциональности белка.

### 3.3.2. Оценка разнообразия вариантов β-лактамаз группы NDM

По результатам анализа гибридных сборок был обнаружен новый вариант МБЛ NDM-типа, NDM-29, в изоляте 1970\_kpn, выделенном в апреле 2018 года из мочи мужчины в специализированном стационаре Санкт-Петербурга. Кластерный анализ аминокислотных последовательностей всех вариантов NDM показал, что NDM-1 в эволюционном плане является наиболее близким к NDM-29 (Рисунок 9). Новый вариант *bla<sub>NDM-29</sub>* отличался от *bla<sub>NDM-1</sub>*

одной аминокислотой (D130N, 388(G→A)). Аналогичные замены присутствуют в NDM-7 и NDM-19.

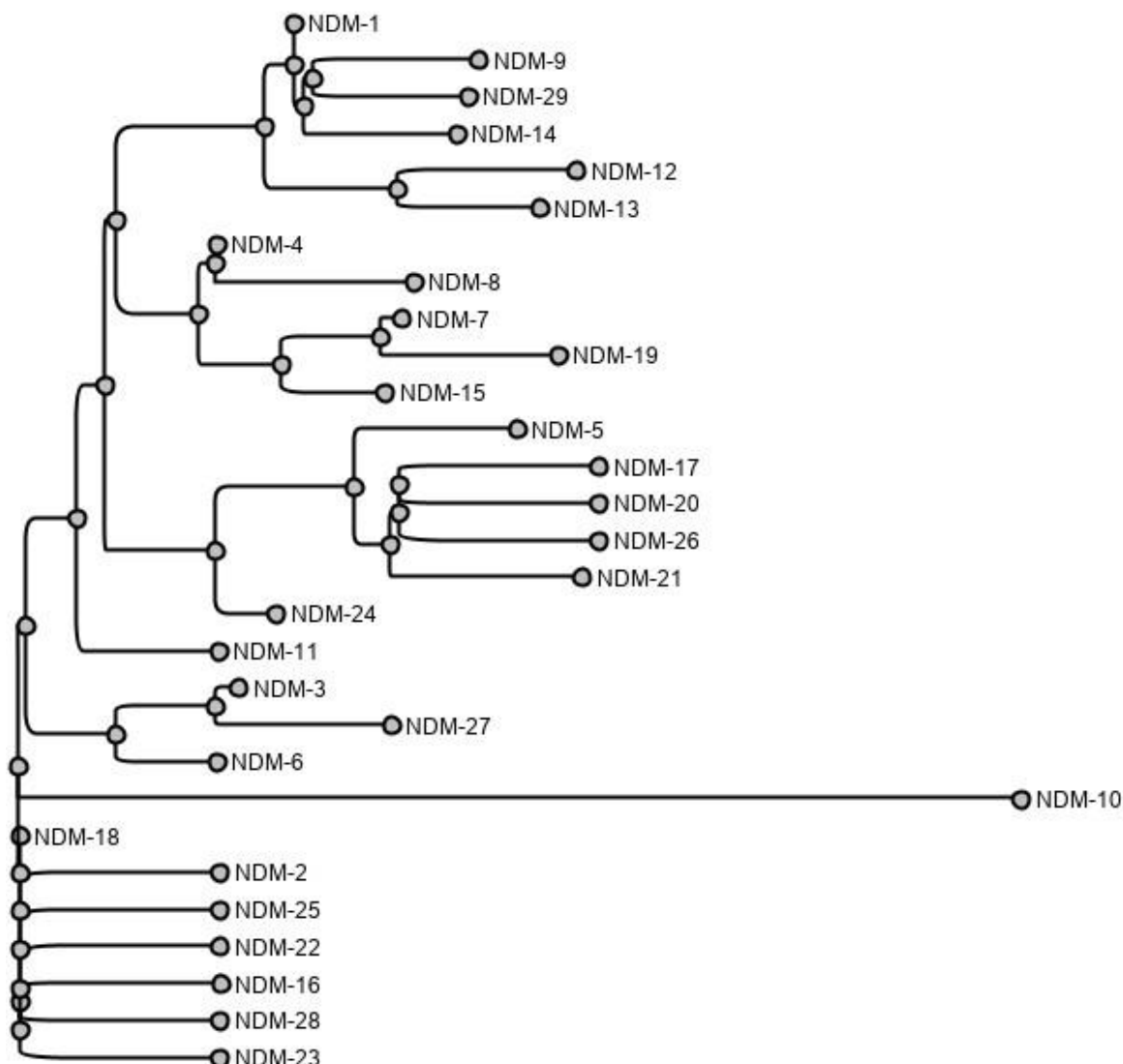


Рисунок 9 – Кластерный анализ 29 вариантов гена *bla*<sub>NDM-like</sub>

На основании последовательностей плазмид *K. pneumoniae* (n=244), содержащих *bla*<sub>NDM</sub> (доступных в генбанке NCBI на момент исследования), вероятность мутации в 388-ом нуклеотиде гена *bla*<sub>NDM</sub> составила 4%. Похожие аминокислоты в позиции 130 присутствовали у ферментов NDM-7 и NDM-19. Однако также наблюдались следующие дополнительные аминокислотные замены: M154L у NDM-7; M154L+A233V у NDM-19. К полному списку всех возможных вариаций аминокислот были добавлены NDM-4 с M154L, двойная мутация M154L+A233V у NDM-15 и NDM-6 с A233V (Таблица 16).

Таблица 16 – Варианты генов  $bla_{NDM}$  с аналогичным набором аминокислот в позициях 130, 154, 233.

Ген	Аминокислотная замена		
$bla_{NDM-1}$	–	–	–
$bla_{NDM-29}$	N130	–	–
$bla_{NDM-14}$	G130		
$bla_{NDM-4}$	–	L154	–
$bla_{NDM-6}$	–	–	V233
$bla_{NDM-8}$	G130	L154	
$bla_{NDM-7}$	N130	L154	–
$bla_{NDM-15}$	–	L154	V233
$bla_{NDM-19}$	N130	L154	V233

Ген  $bla_{NDM-29}$  локализуется на Tn125-подобном транспозоне (Рисунок 19) [159]. На плазмиде  $phvKpST147\_NDM-29$   $bla_{NDM-29}$  в направлении 5' фланкирован последовательностями вставки ISAba125-ISspu2-ISAba125 [161] и в направлении 3' – IS26, приобретая вид IS26-зависимого составного транспозона. Кроме того, ген *aphA6* был частью составного транспозона, изначально состоящего из двух концевых копий ISAba14. Направление 5' гена  $bla_{NDM-29}$ , состоящее из последовательности генов *ble-iso-tat-dct*, было усечено вставкой IS26 в ген *dct*. Последовательности вставки IS26 были обнаружены на разных позициях в генетическом окружении гена  $bla_{NDM}$ , что указывает на повышенную активность и множественные независимые приобретения IS26 [11]. Однако, как часть IS26-зависимого составного транспозона, IS26 играет ключевую роль в мобилизации составных транспозонов между различными плазмидами или хромосомами [159]. Генетическое окружение гена  $bla_{NDM}$  было схоже для высоко идентичных плазмид из Чешской Республики и Великобритании исходной  $phvKpST147\_NDM-29$ . Подробная характеристика плазмид изолятов *K. pneumoniae* представлена в разделе 3.4.2 данного исследования.

### 3.3.3. Функциональный анализ *bla*<sub>NDM-29</sub>

Результаты определения чувствительности к антимикробным препаратам показали, что клинический изолят 1970\_kpn проявлял высокую устойчивость ко всем протестированным карбапенемам, цефалоспоринам, аминогликозидам, фторхинолонам и комбинации пиперациллина-тазобактама, но был чувствителен к азтреонаму (Таблица 17). Результаты теста на чувствительность к противомикробным препаратам изначально предполагали наличие гена МБЛ, что было подтверждено с помощью ПЦР, направленной на детекцию последовательностей NDM-типа.

Таблица 17 – МПК ряда антибиотиков трансформантов и диких штаммов, несущих варианты NDM, в стандартных условиях и условиях с ограничением цинка (50 мкМ ЭДТА). Показаны МПК (мг/л) для клинического изолята 1970\_kpn, *E. coli* XL10-Gold, содержащего *bla*<sub>NDM-1</sub> и *bla*<sub>NDM-29</sub> в составе вектора pJET1.2 и pEGFP-N3, и исходного штамма-реципиента *E. coli* XL10-Gold.

Условие	Стандартные условия							50 мкМ ЭДТА					
	1970_kpn	pJET1.2/NDM-1	pJET1.2/NDM-29	pEGFP-N3/NDM-1	pEGFP-N3/NDM-29	pEGFP-N3	XL10-Gold	1970_kpn	pJET1.2/NDM-1	pJET1.2/NDM-29	pEGFP-N3/NDM-1	pEGFP-N3/NDM-29	pEGFP-N3
Ампициллин	>512	>512	>512	>512	>512	0,25	2	>512	>512	>512	4	4	0,25
Цефотаксим	128	256	128	256	256	<0,125	<0,13	<0,13	0,25	0,25	<0,13	<0,13	<0,125
Цефокситин	>64	>64	>64	>64	>64	-	0,5	2	8	8	8	4	-
Цефтриаксон	256	256	256	256	256	<0,125	<0,13	<0,13	0,25	0,25	<0,13	<0,13	<0,125
Цефтазидим	>256	>256	>256	>256	>256	0,5	1	4	2	4	4	8	0,5
Цефепим	16	64	32	32	32	<0,125	<0,13	0,25	0,25	0,13	0,13	0,13	<0,125
Азтреонам	0,13	0,25	0,13	0,13	<0,06	0,5	0,13	<0,02	0,03	0,03	<0,02	<0,02	0,5
Меропенем	8	8	8	8	8	<0,125	<0,02	0,25	0,13	0,13	0,06	0,13	<0,125
Эртапенем	>32	>32	>32	>32	>32	<0,25	0,06	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,13	<0,25
Биапенем	4	0,5	1	1	0,25	0,03	0,06	0,5	0,06	0,06	0,03	0,03	0,03
Гентамицин	128	<2	<2	64	32	>32	<2	-	-	-	-	-	>32
Амикацин	>256	1	1	1	0,5	1	0,25	-	-	-	-	-	1
Ципрофлоксацин	128	<1	<1	<1	<1	0,25	<1	-	-	-	-	-	0,25
Пиперациллин-тазобактам	>512	512	512	256	512	-	0,5	>512	256	256	0,5	1	-
Полимиксин В	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,25	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,25



Экспрессия  $bla_{NDM-1}$  и  $bla_{NDM-29}$  в *E. coli* XL10-Gold по сравнению с контрольным штаммом приводила к снижению чувствительности к цефалоспорином III и IV поколения, карбапенемам и пиперациллину-тазобактаму. Все трансформанты были чувствительны к азтреонаму. Из-за наличия гена устойчивости к канамицину оба трансформанта pEGFP-N3 проявляли более высокую устойчивость к гентамицину (МПК=32-64 мг/л) по сравнению с трансформантами pJET1.2 (МПК<2 мг/л). МПК трансформантов с геном  $bla_{NDM-1}$ , имели близкие значения к МПК трансформантов, несущих ген  $bla_{NDM-29}$ , в отношении цефалоспоринов III и IV поколений и карбапенемов. В условиях имитации дефицита цинка(II) путем включения хелатора металлов ЭДТА, все исследуемые изоляты показали снижение значений МПК цефалоспоринов широкого спектра действия (с 128-256 до <0,13 мг/л для цефотаксима, с >64 до 4-8 мг/л для цефокситина, с 256 до <0,13 мг/л для цефтриаксона, с >256 до 2-8 мг/л для цефтазидима, с 32-64 до 0,13-0,25 мг/л для цефепима) и карбапенемов (с 8 до 0,06-0,13 мг/л для меропенема, с >32 до <0,13 мг/л для эртапенема, с 0,25-1 до 0,03-0,06 для биапенема). В условиях ограниченного содержания цинка оба трансформанта pJET1.2 демонстрировали более высокий уровень устойчивости к ампициллину (>512 мг/л) по сравнению с трансформантами pEGFP-N3 (4 мг/л), который является селективным маркером устойчивости к ампициллину.

Изменение стабильности фолдинга белка в позиции 130 аминокислотной последовательности ( $\Delta\Delta G_u = -0,3330$ ) является нейтральным по сравнению с NDM-1 (Рисунок 10). Другими словами, данная аминокислотная замена не влияет на функциональность белка, что согласуется с анализом антибиотикочувствительности нового варианта.

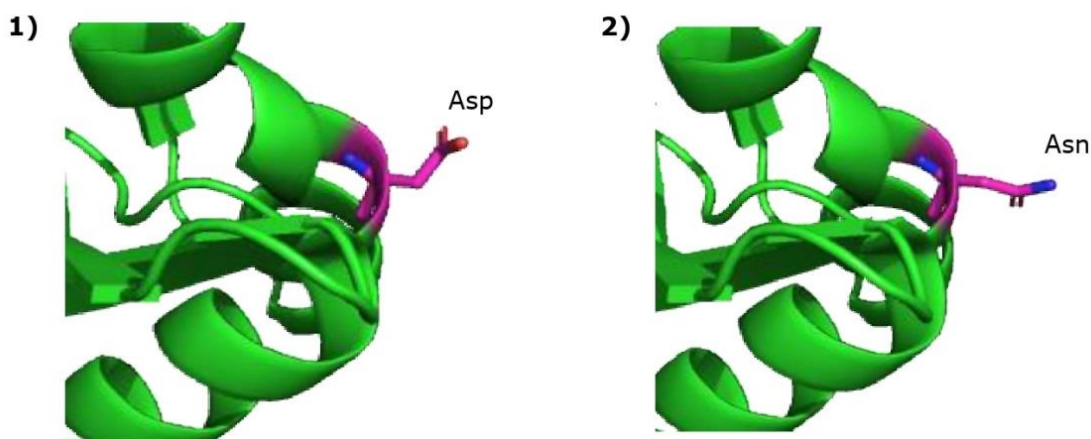


Рисунок 10 – Сравнение структур NDM-1 и NDM-29. (1) Структура NDM-1, где аспарагиновая кислота в положении 130 отображается в виде фиолетовых палочек (номер доступа PDB 5ZR8). (2) Структура NDM-29 с отмеченным аспарагином в положении 130. Атомы кислорода окрашены в красный цвет, а аминогруппы окрашены в синий цвет

По результатам исследования оценка влияния замены D130N на гидролитическую активность по отношению к  $\beta$ -лактамным антибиотикам показала, что трансформанты, несущие  $bla_{NDM-29}$ , проявляют такую же устойчивость к  $\beta$ -лактамам, как и трансформанты, несущие  $bla_{NDM-1}$ . Напротив, для NDM-7 и NDM-4 остаток лейцина в положении 154 (M154L) увеличивает гидролитическую активность по отношению к карбапенемам, а для NDM-4 и NDM-15 – усиливает связывание металлов. A233V, в свою очередь, является не только стабилизирующей заменой, не влияющей на способность связывать цинк, но и, по-видимому, дополнительно повышает активность карбапенемаз в условиях ограниченного содержания цинка [94]. Аминокислотная замена D130N также представлена у NDM-29,7,19.

### 3.3.4. Генетические детерминанты вирулентности в изолятах *K. pneumoniae*

Анализ гибридных сборок показал, что изоляты изучаемой коллекции *K. pneumoniae* несли различные аллели детерминант вирулентности. Все изоляты изучаемой коллекции продуцируют сидерофоры энтеробактерии (биосинтез

энтеробактина – *entABCDEF*, транспорт энтеробактина – *ferABCDG*), фимбрии 1 и 3 типа (*fimABCDEFGHJK* и *mrkABCDEFGHIJ* соответственно), а также предполагаемый фимбриальный шаперон (*yagVWXYZ/escEDCBA*) и токсин внешней мембраны клетки (*ompA*), который опосредует инвазию клеток иммунитета (Рисунок 11). Другие ключевые детерминанты вирулентности, такие как аэробактин, (*iucABCD*, *iutA*), и иерсиниобактин (*ybtAEPQSTUX*, *fyuA*, *irp1,2*), относящиеся к сидерофорам и включающие locus биосинтеза и рецептора, а также гены активации капсулы (*rmpADC*, *rmpA2*), обнаруживались у меньшей доли изолятов *K. pneumoniae*. К другим маркерам вирулентности, характерным для изучаемой коллекции, относился метаболический транспортер (*peg-344*), выявленный у 35% изолятов коллекции, и гены устойчивости к тяжелым металлам – теллуру. При этом детерминанты *terACDEXYZ* были выявлены у 75% штаммов, в то время как *terBW* – у 3 изолятов коллекции.

На основании подхода, используемого в мультилокусном секвенировании-типировании (МЛСТ), по определению locus-специфических типов последовательностей детерминант вирулентности были определены их сиквенс типы. Таким образом, кластер генов биосинтеза аэробактина у всех продуцирующих его изолятов относится к 1 линии и двум AbST с одной и двумя SNP: 1, 1-1LV и 1-2LV (n=140), 63, 63-1LV и 63-2LV (n=112). Гены биосинтеза аэробактина отсутствовали у 20% изолятов (n=65). На сегодняшний день выявлено 100 AbST, относящихся к 5 линиям. При этом данные, полученные в результате ПЦР на ген *iucA*, соответствуют данным WGS с несовпадением по одному изоляту.

Кластер генов биосинтеза иерсиниобактина у продуцирующих его изолятов относился к Ybt 9, 10, 14, 15, 16 линиям и тринадцати YbST: 135-4LV и 135-5LV (n=4), 151, и 151-2LV, и 151-3LV (n=8), 173-2LV и 173-3LV (n=4), 183 (n=16), 184-4LV (n=1), 202-1LV, и 202-2LV, и 202-3LV, и 202-4LV (n=15), 230-1LV (n=2), 277-2LV (n=3), 280 (n=4), 287-4LV (n=1), 294 (n=12), 384 и 384-1LV (n=14), 530-2LV, и 530-3LV, и 530-4LV, и 530-5LV (n=135). На

сегодняшний день выявлено 599 YbST, относящиеся к 28 линиям, локализованных на 22 структурных вариантах ICEKp. Исключение составляет одна линия *ybt* (Ybt4), которая кодируется плазмидой. Усеченный локус биосинтеза иерсиниобактина был обнаружен у 9% изолятов.

Кластер генов регуляторов мукоидного фенотипа у всех продуцирующих его изолятов относился к линии 1, ассоциированной с плазмидой KpVP-1 и трём RmST: 26, 26-1LV и 26-2LV (n=77), 27-1LV (n=2), 39-1LV и 39-2LV (n=7), 61-1LV (n=1). На сегодняшний день выявлено 164 RmST, относящиеся к 4 различным линиям *rmp*, ассоциированным с плазмидами, несущими детерминанты вирулентности, KpVP-1 (*rmp1*), KpVP-2 (*rmp2*), плазмидами, несущими *iuc2A* (*rmp2A*), и ICEKp1 (*rmp3*). Интактные копии всех трех генов (*rmpADC*) несли 88% геномов, таким образом, вероятно, эти изоляты проявляют гипермукоидный фенотип. Интактный *rmpADC* ассоциирован с *iuc*-положительными геномами hvKp. Ген *rmpA2* для 90% продуцирующих его изолятов присутствовал в усеченной форме с сохранением от 7 до 61% длины аминокислот от стартового кодона, что связывают со сдвигом рамки считывания в последовательностях поли-G, которые, как правило, приводят к потере функции белка. Среди изолятов несущих *rmpADC*, а также протестированных на стринг-тест (n=58), у 74% коллекции наблюдалось соответствие генотипа с проявлением гипермукоидного фенотипа.

Кластер генов биосинтеза сальмохелина (*iroBCD*, транспорт сальмохелина – *iroN*), относящийся к наиболее распространенному SmST1 из пяти идентифицированных линий, был обнаружен только в одном изоляте 86. Среди коллекции изолятов *K. pneumoniae* не было выявлено генов биосинтеза колибактина и 30% (n=95) штаммов несли 4/5 (кроме сальмохелина) основных маркеров вирулентности по Russo T.A. и соавт. [128].

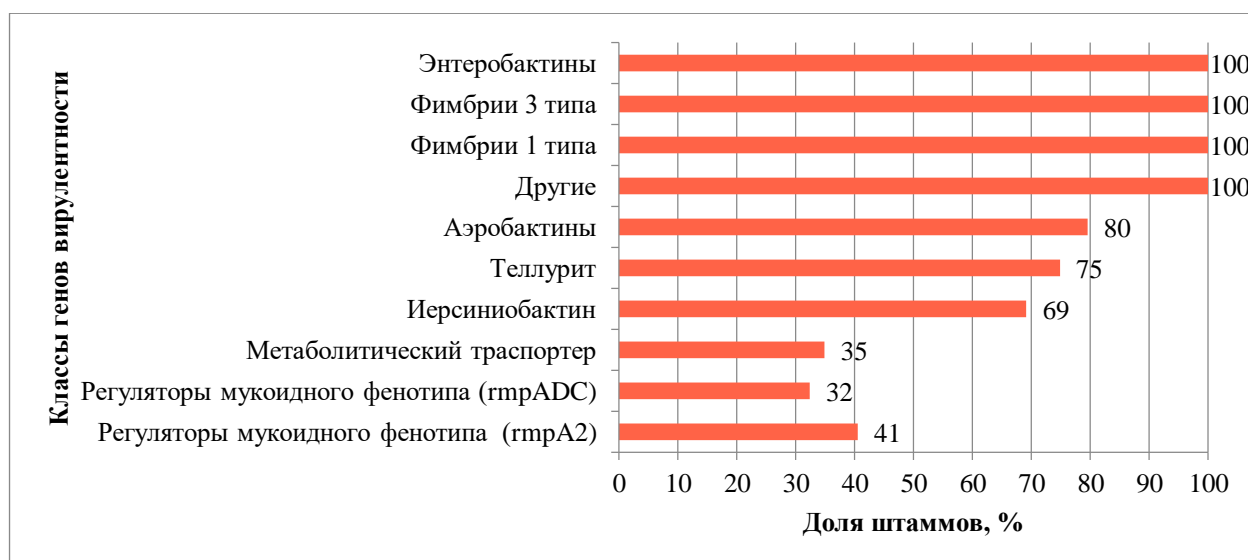


Рисунок 11 – Распространение детерминант, ассоциированных с hv, в изучаемых изолятах *K. pneumoniae* (n=318)

Большинство линий изучаемой коллекции *K. pneumoniae* являются продуцентами юкарбапенемаз, несущими гены биосинтеза аэробактина и IСЕКp-ассоциированные гены иерсиниобаكتина (оценка резистентности – 2, оценка вирулентности – 4). Данное соответствие согласуется с критериями отбора и характеризует изоляты как гипервирулентные (Рисунок 12). Только 3 генетические линии не несли локусов иерсиниобаكتина и аэробактина (ST4023, 870, 11-3LV). Истинно гипервирулентной линией оказался ST86, несущий гены биосинтеза аэробактина, иерсиниобаكتина, сальмохелина, а также регуляторы мукоидного фенотипа (оценка резистентности – 0, оценка вирулентности – 4). ST101 был ассоциирован с наличием устойчивости к колистину за счёт усечений гена *mgrB* (оценка резистентности – 3).

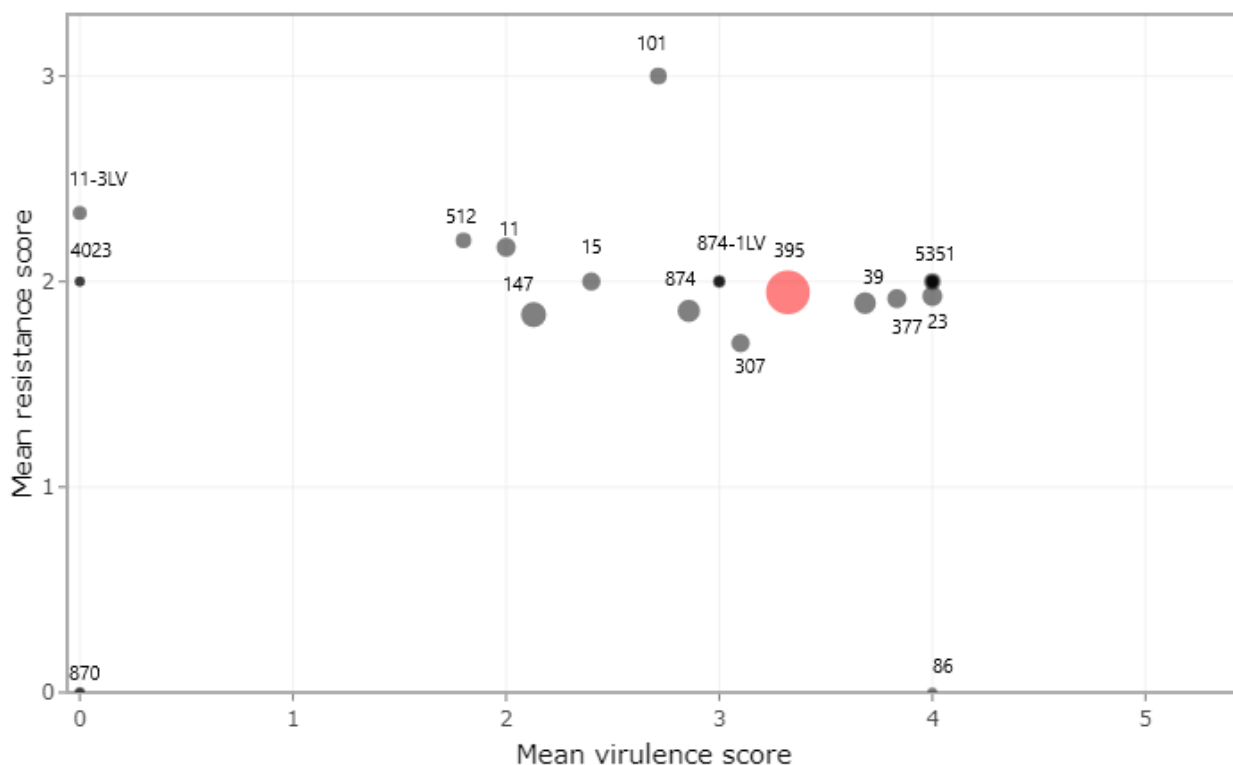


Рисунок 12 – Распределение клональных линий *K. pneumoniae* по средним оценкам резистентности и вирулентности (n=318). Размер кругов соответствует количеству геномов

Данные результаты подтверждают соответствие набора генетических детерминант резистентности и вирулентности на основании их оценок для большинства изолятов коллекции конвергентному патотипу *K. pneumoniae* (оценка вирулентности  $\geq 3$  и оценка устойчивости  $\geq 1$ ).

### 3.4. Анализ молекулярной эпидемиологии изолятов *K. pneumoniae*

Распределение ST свидетельствует о значительном генетическом разнообразии изучаемой коллекции *K. pneumoniae*, циркулирующих в России – 19 различных генетических линий, включающих однолокусные варианты (Рисунок 13). Большинство из представленных сиквенс типов изучаемой коллекции *K. pneumoniae* относились внутрибольничным генетическим линиям ST395, ST147, а также вследствие географического положения России между Европой и Азией, наблюдались международные клоны высокого риска, такие как европейские линии, ассоциированные с MDR-фенотипом ST512, ST11,

ST15, ST307, ST101. Кроме глобально распространенных линий, было выявлено несколько генетически изолированных линий ST39, ST48, ST870, ST874, ST2461, ST336, ST377, ST3551, ST4023, ST5351. Среди обнаруженных генетических линий к гипервирулентным относились ST23, ST86. Распределение оценок вирулентности среди генетических линий коллекции *K. pneumoniae* подтверждает широкое распространение генов вирулентности в популяции безотносительно к определённым эволюционным линиям.

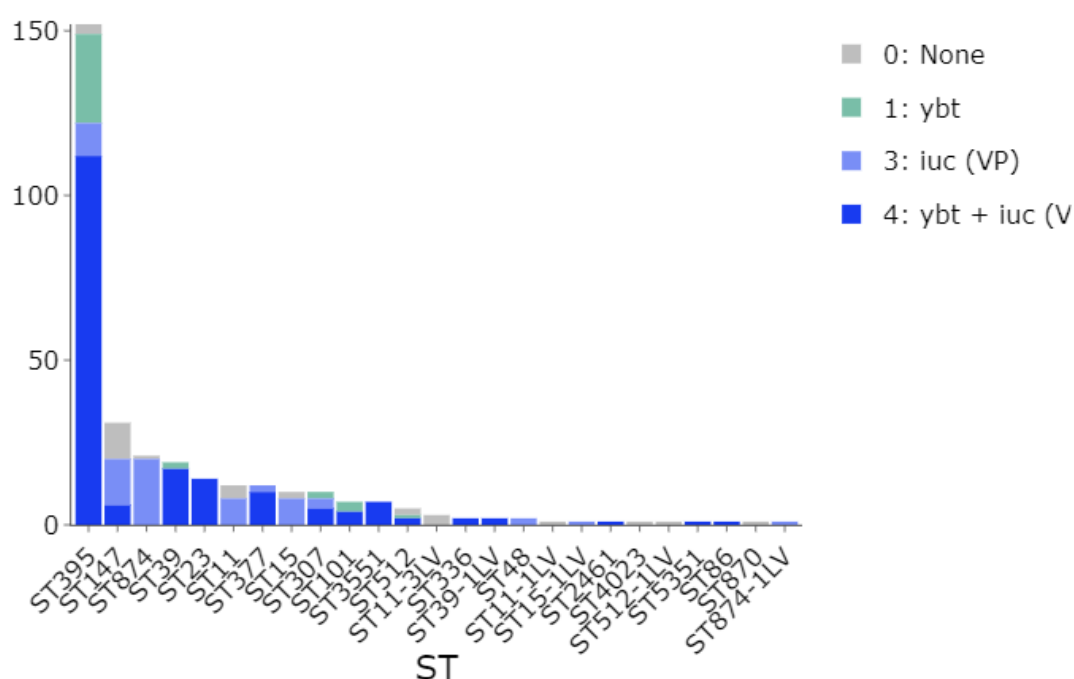


Рисунок 13 – Распределение оценок вирулентности среди генетических линий изучаемой коллекции *K. pneumoniae* (n=318)

Важно отметить, что несмотря на наличие доминирующих серотипов, коллекция характеризуется большим разнообразием. Было выявлено всего 3 O- и 18 K-локусов (Рисунок 14), где последние коррелировали с 18 wzi-аллелями (wzi 2, 19, 23, 24, 62, 64, 77, 83, 95, 105, 137, 141, 151, 154, 160, 173, 222, 452). К наиболее распространенным серотипам коллекции относились KL2/O1/O2v1 (n=52) и KL2/O1 (n=49), которые глобально ассоциируют с hvKp, и KL39/O1v1 (n=31). При этом прослеживается соответствие между генетическими линиями и капсульными типами, так, один K-локус превалировал среди одной генетической линии: ST15/KL19, ST23/KL57, ST11/KL23, ST101/KL17,

ST874/KL45, ST512/KL107, ST336/KL25, ST2461/KL108, ST3551/KL64 (n=7), ST48/KL62, ST4023/KL13, ST377/KL102 (n=11). Отмечены также линии, ассоциированные с двумя основными К-локусами: ST395/KL2 (n=89), ST395/KL39 (n=50); ST147/KL64 (n=13), ST147/KL20 (n=17); ST307/KL102 (n=10), ST377/KL102 (n=11); ST39/KKL2 (n=11), ST39/KL23 (n=7).

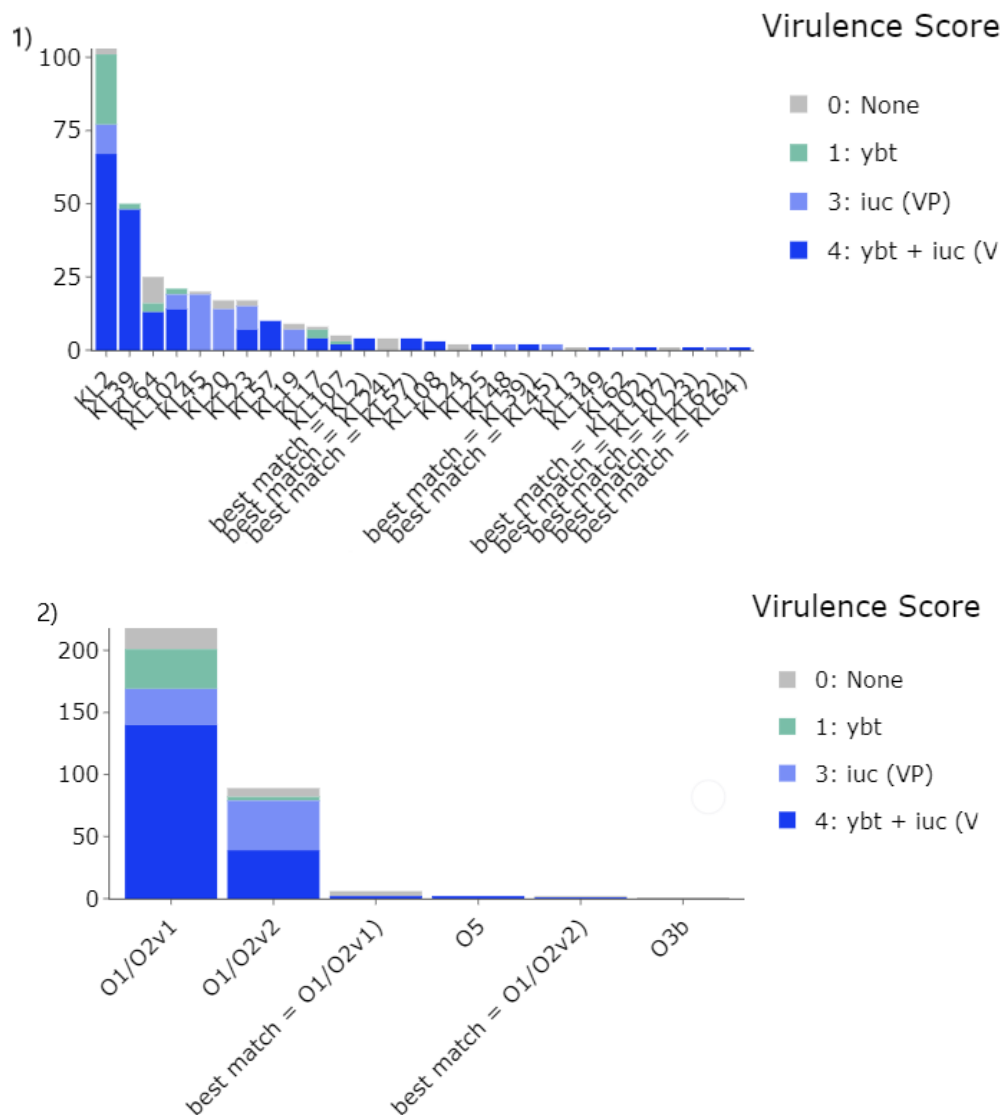


Рисунок 14 – 1) Распределение оценок вирулентности среди различных К-типов *K. pneumoniae*. 2) Распределение оценок вирулентности среди различных О-типов *K. pneumoniae* (n=318)

В соответствии с Рисунком 12, преобладающей по численности группой являлись изоляты, несущие детерминанты аэробактина и иерсиниобактина (n=185), относящиеся к 14 генетическим линиям (Таблица 18). Среди них



доминирующей линией являлась ST395, как с самыми распространенными типами генов карбапенемаз  $bla_{OXA-48}$  и  $bla_{NDM-1}$  вместе с их сочетанным вариантом, так с более редкой комбинацией –  $bla_{NDM-1}+bla_{OXA-244}$ . Для 68 изолятов, относящихся к 10 различным генетическим линиям, была характерна продукция аэробактина, а также моно- или ко-продукция NDM-1 и/или OXA-48/OXA-244. Иерсиниобактин был обнаружен только в 35 изолятах, большинство из которых относилось к ST395, при этом 16 из них продуцировали OXA-48, и пять других были моно-продуцентами OXA-244, OXA-232, NDM-5. Иерсиниобактин и аэробактин отсутствовали у 30 изолятов, относящихся к 11 генетическим линиям, среди которых были единственные обнаруженные продуценты комбинаций KPC-2+NDM-1, а также NDM-5+OXA-232.

На основании данных WGS уточненными критериями отнесения изолятов изучаемой коллекции к CR-hvKp является наличие кластера генов биосинтеза аэробактина, и как минимум одного гена, кодирующего карбапенемазы, несмотря на известный факт проявления резистентности к карбапенемам без генов, кодирующих карбапенемазы. Таким образом, среди отсеквенированной коллекции штаммов *K. pneumoniae* к CR-hvKp относились 239 изолятов.

Таблица 18 – Распределение клональных линий *K. pneumoniae* по наличию детерминант вирулентности и различных типов карбапенемаз.

Гены вирулентности	ST	Кол-во изолятов	Карбапенемазы					
Аэробактин и иерсиниобактин n=185	ST395	113	68 OXA-48	27 NDM-1	9 NDM-1+OXA-48	4 NDM-1+OXA-244	-	
	ST39	17	9 NDM-1	4 KPC-2+OXA-48	2 NDM-1+OXA-48	1 OXA-48	1 NDM-5+OXA-48	
	ST23	14	11 OXA-48	1 KPC-2	1 NDM-1+OXA-48	-	-	
	ST377	10	8 OXA-48	2 NDM-1	-	-	-	
	ST3551	7	7 OXA-48	-	-	-	-	
	ST147	6	2 OXA-244	1 NDM-1+OXA-244	1 NDM-1+OXA-48	1 NDM-1	-	
	ST307	5	2 NDM-1+OXA-48	1 OXA-48	-	-	-	
	ST101	4	2 KPC-3	2 KPC-3+OXA-48	-	-	-	
	ST512	2	1 OXA-48	1 KPC-3+OXA-48	-	-	-	
	ST39-1LV	2	1 NDM-1	1 OXA-48	-	-	-	
	ST336	2	2 OXA-48	-	-	-	-	
	ST5351	1	1 NDM-5	-	-	-	-	
	ST2461	1	1 OXA-48	-	-	-	-	
	ST86	1	-	-	-	-	-	
	Аэробактин n=68	ST874	20	9 NDM-1+OXA-244	7 NDM-1	2 NDM-1+OXA-48	-	-
		ST147	14	14 NDM-1	-	-	-	-
		ST395	9	7 OXA-48	1 NDM-1	1 NDM-1+OXA-244	-	-
ST11		8	8 NDM-1+OXA-48	-	-	-	-	
ST15		8	8 NDM-1	-	-	-	-	
ST307		3	2 NDM-1+OXA-48	-	-	-	-	
ST377		2	1 OXA-244	-	-	-	-	
ST48		2	2 NDM-1	-	-	-	-	
ST874-1LV		1	1 NDM-1	-	-	-	-	
ST15-1LV		1	1 OXA-48	-	-	-	-	
Иерсиниобактин n=35	ST395	27	16 OXA-48	2 OXA-244	2 NDM-5	1 OXA-232	-	
	ST101	3	3 KPC-3	-	-	-	-	
	ST307	2	-	-	-	-	-	
	ST39	2	-	-	-	-	-	
	ST512	1	1 KPC-3	-	-	-	-	
Отсутствуют n=30	ST147	11	4 NDM-1+OXA-48	3 NDM-1	2 KPC-2+NDM-1	-	-	
	ST11	4	2 NDM-1+OXA-48	2 NDM-1	-	-	-	
	ST11-3LV	3	3 NDM-1	-	-	-	-	
	ST395	3	1 NDM-5+OXA-232	-	-	-	-	
	ST15	2	2 NDM-1	-	-	-	-	
	ST512	2	2 KPC-3	-	-	-	-	
	ST11-1LV	1	1 NDM-1	-	-	-	-	
ST4023	1	1 OXA-48	-	-	-	-		

Продолжение таблицы 18

Гены вирулентности	ST	Кол-во изолятов	Карбапенемазы				
Отсутствуют n=30	ST512-1LV	1	-	-	-	-	-
	ST870	1	-	-	-	-	-
	ST874	1	-	-	-	-	-

### 3.4.1. Характеристика плазмидного состава изолятов *K. pneumoniae*

Значительную роль в эволюционном формировании успешных генетических линий занимает адаптивный геном бактериальных культур, в частности обуславливающий перенос детерминант гипервирулентности и резистентности. Таким образом, для изучения эпидемиологии CR-hvKp помимо анализа циркулирующих генетических линий, необходимо провести анализ распространения плазмидных репликонов. На основе базы данных PlasmidFinder был проведен поиск различных репликонов плазмид, выявивший 30 различных вариантов среди всех изолятов изучаемой коллекции *K. pneumoniae* (Рисунок 15). Как и в данном случае, большое разнообразие репликонов плазмид характерно для устойчивых изолятов *K. pneumoniae* – в среднем приходилось 6,2 репликона на изолят (от 1 до 22). Наибольшей представленностью обладал репликон IncHI1B\_1\_pNDM-MAR (n=258), другими распространенными репликонами были репликоны F-типа, в которые входили IncFIB(Mar)\_1\_pNDM-Mar (n=183), IncFIB(K)\_1\_Kpn3 (n=120), IncFII\_1\_pKP91 (n=137), а также репликоны группы IncR\_1 (n=183) и небольшие плазмиды Col-типа (Col440I\_1, n=242; Col440II\_1, n=221; ColRNAI\_1, n=168).

Большинство типов репликонов плазмид несли кластер генов аэробактина (67-100%), иерсиниобаكتина (41-100%) или сочетанно оба кластера (37-100%), а также гены карбапенемаз (84-100%) и БЛРС (70-100%). Обнаружено, что вышеупомянутые детерминанты, как правило, не проявляют строгой ассоциированности с конкретными типами плазмид. Меньшая доля изолятов (8-50%) с типами репликонов IncL/M\_1, IncFIB(pB171)\_1\_pB171, IncFII(Yp)\_1\_Yersenia несли кластер генов аэробактина и иерсиниобаكتина как отдельно, так и сочетанно, а изоляты с типами репликонов ColKP3\_1, IncI1\_1\_Alpha – несли только кластер иерсиниобаكتина. Меньшая доля изолятов (15-36%), относящихся к типам репликонов Col(MG828)\_1, IncL/M\_1 несли гены карбапенемаз, помимо которых 15-50% штаммов с типами репликонов Col156\_1, IncX3\_1, IncN\_1 также несли гены БЛРС.

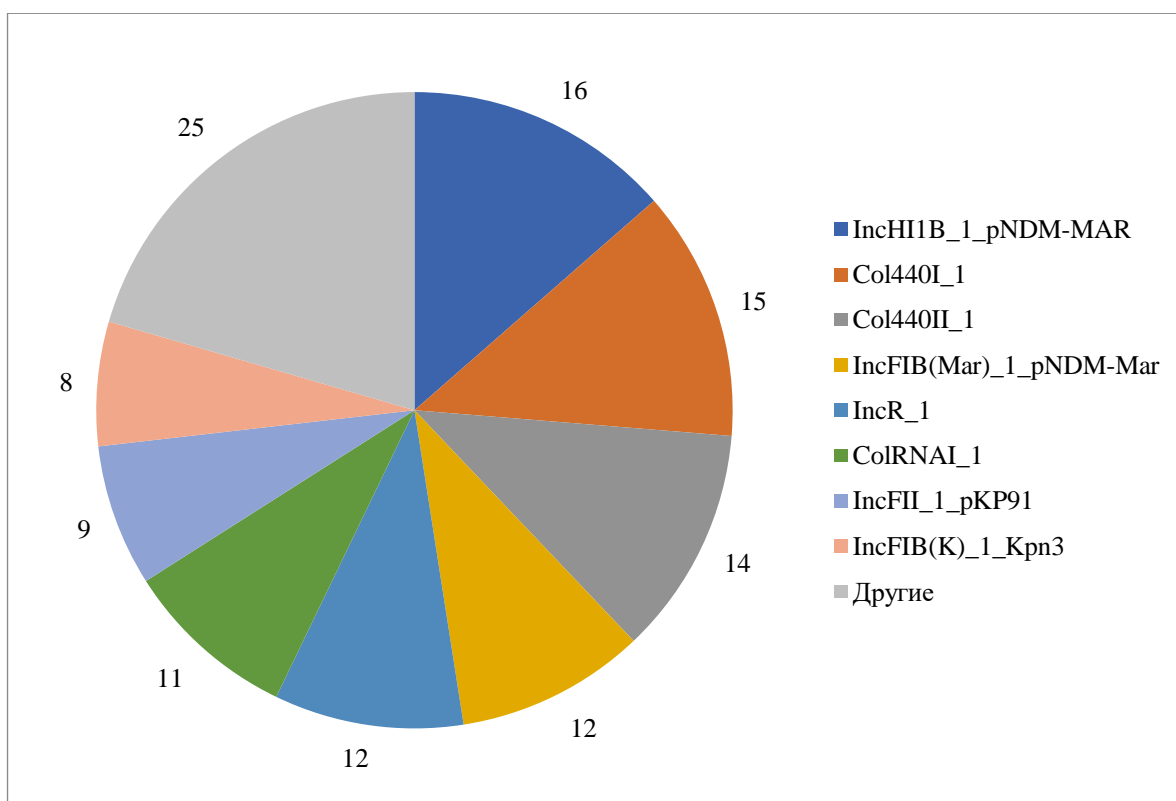


Рисунок 15 – Распространение различных репликонов плазмид изучаемой коллекции изолятов *K. pneumoniae* (n=318)

**Примечание:** К «другим» относились: IncL/M(pOXA-48)\_1\_pOXA-48, IncL/M\_1, IncFIB(pQil)\_1\_pQil, IncL/M(pMU407)\_1\_pMU407, IncFIA(HI1)\_1\_HI1, IncFII(pCRY)\_1\_pCRY, IncFII\_1, IncFIB(pKPHS1)\_1\_pKPHS1, IncFII(pKPX1), IncFIB(pB171)\_1\_pB171, IncFII(Yp)\_1\_Yersenia, IncFII(pRSB107)\_1\_pRSB107, FII(pBK30683)\_1, ColpVC\_1, IncA/C2\_1, Col156\_1, ColKP3\_1, IncN\_1, Col(BS512)\_1, IncQ1\_1, Col(MG828)\_1, IncX3\_1, IncI1\_1\_Alpha.

### 3.4.2. Филогенетический анализ изолятов *K. pneumoniae*

На рисунке 16 представлена филогенетическая структура популяции секвенированной коллекции *K. pneumoniae* на основе SNP-анализа ядерного генома, построенная методом максимального правдоподобия. Для коллекции, циркулирующей на большой географической территории России, от Мурманска до Хабаровска, характерна ярко выраженная клональная структура. Данная филогенетическая структура подтверждает соответствие генетических и капсульных типов. Клональное дерево показывает гетерогенность коллекции, так, разнообразие популяции в отдельном городе может складываться как из 2 распространенных генетических линий, так и состоять из специфических линий для каждого региона. Таким образом, у изолятов из Санкт-Петербурга (n=140)

превалирующими генетическими линиями являются распространенные внутрибольничные линии ST395 (28,12%) и ST147 (9,38%), для Москвы (n=142) доминирующей является линия ST395 (49,61%). Для изолятов, выделенных в других городах, генетические линии определены у 2-4 геномов, на основе чего нельзя сделать статистически достоверный вывод о превалирующих ST.

Помимо повсеместного распространения клебсиелл, несущих одновременно детерминанты вирулентности и гены устойчивости к карбапенемам, наблюдается характерный набор детерминант для каждой ветви. Среди наиболее распространенных генетических линий ST395 можно выделить 9 групп: 3 клады, несущие *bla*<sub>OXA-48</sub>, кластеры аэробактина, иерсиниобаكتина, репликоны плазмид IncFIB(Mar), IncHI1B, где для первой также характерна продукция RmpA, RmpA2, для второй – RmpA2 и ко-продукция NDM; клада, несущая *bla*<sub>OXA-48</sub> и кластер иерсиниобаكتина; клада, несущая *bla*<sub>OXA-48</sub>, кластер аэробактина, и репликоны плазмид IncFIB(Mar), IncHI1B; клада, несущая *bla*<sub>NDM</sub>, кластер аэробактина, иерсиниобаكتина, *rmpA*, *rmpA2*, и репликоны плазмид IncFIB(Mar), IncHI1B; клада, несущая кластер иерсиниобаكتина; 2 клады, несущие *bla*<sub>OXA-48</sub>, кластеры аэробактина, иерсиниобаكتина, и плазмиду IncHI1B. Среди ST147 можно выделить 3 группы, несущие *bla*<sub>NDM</sub> и плазмиду IncHI1B, где для первой также характерна локализация кластера аэробактина, *rmpA*, *rmpA2*, и плазмиды IncFIB(Mar); для второй – ко-продукция OXA-48 и плазмиды IncFIB(K); для третьей – плазмиды IncFIB(K), а также в некоторых случаях ко-продукция KPC. Превалирующей карбапенемазой среди ST395 являлась OXA-48 (57,25%) и NDM (22,9%), среди ST147 – NDM (67,86%) и NDM+OXA-48 (21,43%).

Среди ST11 можно выделить 2 группы: клада, несущая *bla*<sub>NDM</sub> и плазмиду IncFIB(K); клада, ко-продуцирующая OXA-48+NDM, несущая кластер аэробактина, и репликоны плазмид IncFIB(K), IncHI1B. Клада, относящаяся к ST23, несла *bla*<sub>OXA-48</sub>, кластеры аэробактина, иерсиниобаكتина, *rmpA*, *rmpA2*, и плазмиду IncFIB(K). Среди ST39 можно выделить 2 группы, несущие кластеры аэробактина и иерсиниобаكتина: клада, ко-продуцирующая OXA-48+NDM или

ОХА-48+КРС, и несущая репликоны плазмид IncFIB(K), IncHI1B или только последний; клада, несущая *bla*<sub>ОХА-48</sub>, *rmpA*, *rmpA2*, и весь набор распространённых плазмидных репликонов IncFIB(Mar), IncFIB(K), IncHI1B. Клада, относящаяся к ST15, несла *bla*<sub>NDM</sub>, кластеры аэробактина, в некоторых случаях *rmpA* и *rmpA2*, а также весь набор распространённых плазмидных репликонов IncFIB(Mar), IncFIB(K), IncHI1B. Среди ST874 можно выделить 2 группы, несущие кластер аэробактина и весь набор распространённых плазмидных репликонов IncFIB(Mar), IncFIB(K), IncHI1B; клада, продуцирующая NDM, в некоторых случаях ко-продуцирующая ОХА-48, *RmpA* и *RmpA2*; клада, ко-продуцирующая ОХА-48+NDM вместе с *RmpA2*. Клада, относящаяся к ST377, несла *bla*<sub>ОХА-48</sub>, кластеры аэробактина и иерсиниобаكتина, а также весь набор распространённых плазмидных репликонов IncFIB(Mar), IncFIB(K), IncHI1B. Клада, относящаяся к ST307, несла *bla*<sub>ОХА-48</sub>+*bla*<sub>NDM</sub> и кластер аэробактина, в некоторых случаях также иерсиниобаكتина, и весь набор распространённых плазмидных репликонов IncFIB(Mar), IncFIB(K), IncHI1B. Клада, где превалирующей генетической линией являлся ST3551, характеризовалась продукцией ОХА-48, кластера аэробактина и иерсиниобаكتина, а также несла репликоны плазмид IncFIB(Mar), IncHI1B.

Для выявления идентичности плазмид коллекции изолятов *K. pneumoniae* с канонической вирулентной плазмидой было проведено картирование полученных коротких прочтений на референсную последовательность плазмиды pLVPK. Доля покрытия варьировалась от 3-97%, где максимальное значение принадлежало изоляту 86, характеризующемуся длиной плазмиды с детерминантами вирулентности соответствующей референсу (214159 п.н. и 219385 п.н. – pLVPK), которой нес полный набор основных маркеров вирулентности. Картирование 70-90% длины плазмиды pLVPK было характерно для 14% изолятов, которые несли маркер аэробактина и репликон IncFIB(K), а также большинство несли два других распространённых репликона IncFIB(Mar), IncHI1B. Доминирующей генетической линией для данной группы

была ST23, характерная для азитского региона. Наибольшая доля изолятов (63%) давала картирование 50-70% длины референсной плазмиды. Данная группа несла репликон IncHI1B, большинство также характеризовались наличием кластера генов аэробактина, а также доминирующей линией, как и во всей коллекции, являлась ST395. Картирование менее половины длины референсной последовательности (0-50%) было характерно для 37% изолятов коллекции.



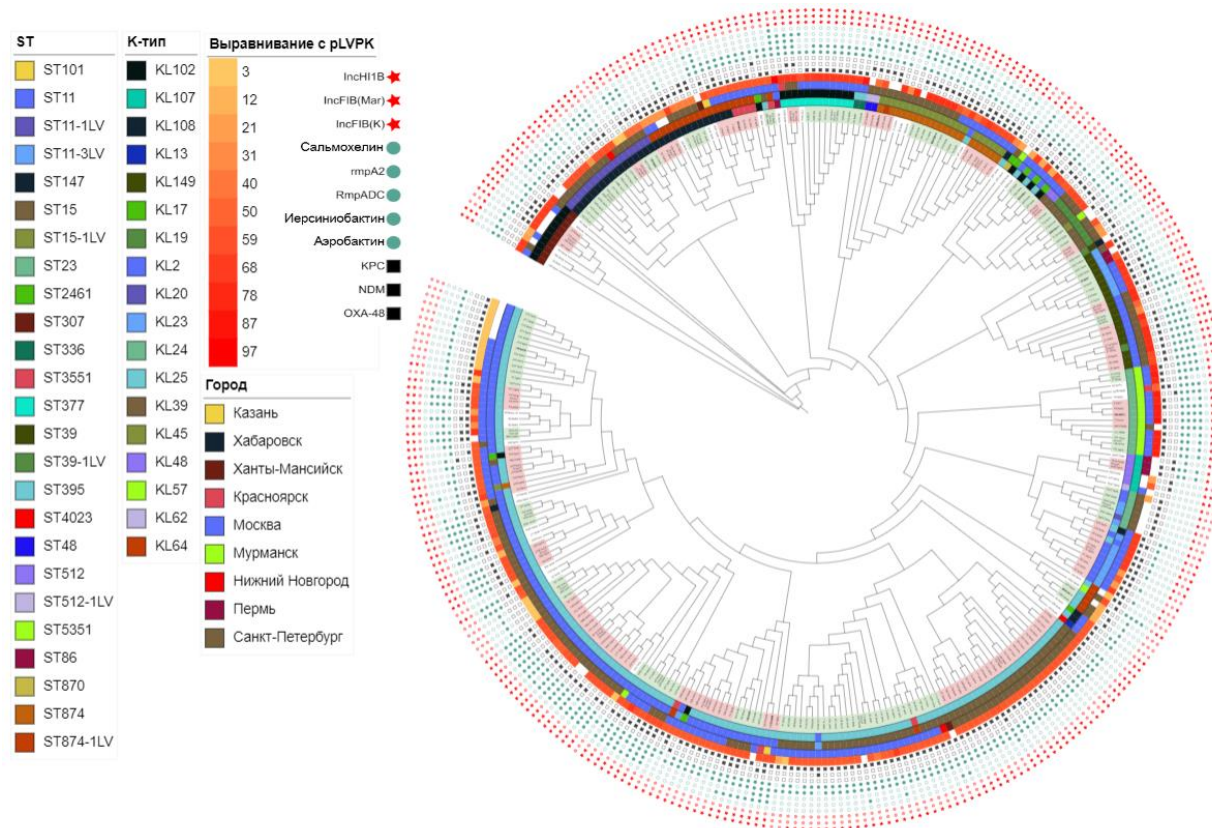


Рисунок 16 – Филогенетическая структура (укоренённая кладограмма) популяции отсеквенированной коллекции *K. pneumoniae* (n=318) на основе SNP-анализа 80259 SNP, построенная методом максимального правдоподобия

**Примечание:** От внутреннего круга к внешнему нанесено разделение по кладам, распределение ST, К-типов, городов выделения, картирование на rLVPK, наличия генов вирулентности (*iucA*, *ybt*, *rmpADC*, *rmpA2*, *iroB*), генов карбапенемаз (*bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*), типов репликонов плазмид (IncFIB(K), IncFIB(Mar), IncHI1B).

### 3.5. Детальная характеристика представителей CR-hvKp

Для описания плазмидного состава и структур, а также локализации детерминант резистентности и вирулентности была создана репрезентативная выборка из 8 стринг-тест положительных и *bla*<sub>NDM</sub>-продуцирующих изолятов на основе изучаемой коллекции *K. pneumoniae* (Таблица 19). Также для сравнения включен изолят 2024\_kpn.

Изоляты *K. pneumoniae* были выделены в рамках рутинного скрининга от восьми пациентов, поступивших в два стационара Санкт-Петербурга: штамм 2512\_kpn – из больницы общего профиля; 8 других – из 6 различных отделений специализированного стационара. Помимо множественных сопутствующих заболеваний основным диагнозом пациентов являлись злокачественные новообразования различной локализации, у одного – травма роговицы. Важно отметить, что пациенту, от которого выделен изолят 2512\_kpn, была проведена операция по трансплантации роговицы от донора, поступившего в другой стационар Санкт-Петербурга. У данного пациента развился эндофтальмит, который привел к потере зрения на один глаз. Большинство изолятов было получено из локусов, не связанных с инвазивными заболеваниями. От одного пациента выделено два изолята (1657\_kpn, 1659\_kpn) с разницей в один день, относящихся к разным клональным линиям (ST395, ST147). Также у единственного вышеупомянутого пациента был описан фасциит. У пациентов, от которых были выделены изоляты 1971\_kpn, 2501\_kpn, 2024\_kpn развивалась печеночная недостаточность. Сахарный диабет был диагностирован у пациентов, у которых были выделены изоляты 1657\_kpn и 1659\_kpn, 1971\_kpn, 2501\_kpn. Инфекции мочеполовой системы были обнаружены у 2 пациентов, от которых были выделены 1970\_kpn и 2471\_kpn.

Таблица 19 – Характеристика изолятов CR-hvKp.

Изолят	Год выделения	Место выделения	ST	К-тип	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Оценка вирулентности	Оценка резистентности	Маркеры hv					Основной диагноз	Исход
								<i>iuc</i>	<i>ybt</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	<i>peg344</i>		
1657_kpn	2017	Спб_1 <sup>1</sup>	395	KL2	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	4	2	+	+	+	+	+	аденокарцинома сигмовидной кишки, рак молочной железы	смерть
1659_kpn	2017	Спб_1	147	KL20	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	3	2							
1971_kpn	2018	Спб_1	395	KL2	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	4	2	+	-	+	+	+	рак поджелудочной железы	без изменений
1970_kpn	2018	Спб_1	147	KL20	<i>bla</i> <sub>NDM-29</sub>	3	2	+	+	+	+	+	рак простаты	улучшение
2024_kpn	2018	Спб_1	395	KL2	-	1	2	+	-	+	+	+	В-клеточная лимфома	без изменений
2471_kpn	2019	Спб_1	874	KL45	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	3	2	+	+	+	-	+	рак тела матки IA ст. pT1aN0M0	без изменений
2501_kpn	2019	Спб_1	15	KL19	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	3	2	+	-	+	+	+	рак прямой кишки cT3N1M0, IV рак тела желудка T2N1M0	улучшение
2512_kpn	2019	Спб_2	395	KL2	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	4	2	+	-	+	+	+	травма роговицы	ухудшение (потеря зрения на левый глаз)
2566_kpn	2019	Спб_1	147	KL20	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	3	2	+	+	+	+	+	фолликулярная лимфома 1-2 IV ст.	улучшение

<sup>1</sup> Спб\_1, 2 – стационары Санкт-Петербурга.

### 3.5.1. Молекулярно-генетическая и фенотипическая характеристика вирулентности изолятов *K. pneumoniae*

На основании МЛСТ три изолята *K. pneumoniae* принадлежали к линии ST147-KL20 (CC147), четыре – к линии ST395-KL2 (CG395), один – к линии ST874-KL45 (CG258) и один – к линии ST15-KL19 (CG15) (Таблица 19).

Отобранные изоляты *K. pneumoniae* были устойчивы ко всем протестированным цефалоспорином (100%) и карбапенемам (меропенем – 44,44%, имипенем – 66,67%), вследствие ко-продукции 5 изолятами СТХ-М-15+ТЕМ-1, моно-продукции 2 изолятами СТХ-М-15, и 2 другими – ТЕМ-1 (Таблица 20). А также 8/9 изолятов продуцировали NDM-1, что объясняет значительную долю устойчивых изолятов в отношении комбинации ингибитор-защищенного цефалоспорином, цефтазидима-авибактама – 88,89%. Все изоляты проявляли резистентный фенотип к фторхинолону из-за наличия плазмидно-локализованного гена *qnrS1*, а также мутаций в ферментах-мишенях фторхинолонов *GyrA* и *ParC* у всех изолятов. Вследствие хромосомной продукции гена *fosA* 88,89% изолятов *K. pneumoniae* были устойчивы к фосфомицину. Большая доля отобранных изолятов была устойчива к триметоприм-сульфаметоксазолу (87,5%) вследствие наличия генов резистентности к сульфонидам – *sul1,2* и триметоприму – *dfrA1,5,12*. Кроме того, они проявляли различную устойчивость к аминогликозидам (амикацин – 62,5% устойчивых изолятов, гентамицин – 100%), что подтверждается наличием от 1-4 генов устойчивости к аминогликозидам (*aac(3)-IId*, *aac(6')-Ib-cr.v2*, *aac(6')-Ib'.v1*, *aadA2*, *armA*, *aph(3')-VI*, *aph3-Ia.v1*). Однако большая доля репрезентативных изолятов проявляла чувствительность к полимиксину (83,33%), тигециклину (57,14%), что подтверждается отсутствием детерминант устойчивости к данным антибиотикам. В дополнение, все изоляты характеризовались чувствительным фенотипом к азтреонаму-авибактаму.

Таблица 20 – Результаты определения чувствительности к антибактериальным препаратам изолятов CR-hvKp, отобранных для детальной характеристики (n=9, МПК, мг/л).

Изоляты №	Антибиотики											
	АМК	СТА	CAZ	GEN	IMI	MER	PB	TGC	SxT	CAZ/ AVI	AZT/ AVI	FOS
1659	4	>256	>256	8	>64	32	1	<0,12	>32	>128	0,25	128
1970	>64	16	256	>64	64	64	<0,12	0,5	1	>128	0,25	128
1657	<2	128	>256	<2	>64	64	0,5	<0,12	>32	128	4	512
1971	>64	256	>256	>64	8	16	<0,12	0,25	>32	>128	1	256
2024	2	>256	>256	<2	4	4	0,25	0,25	>32	8	0,25	128
2501	>64	>128	>128	>128	32	8	>16	4	>128	>64	0,06	>64
2566	>64	>128	>128	<0,5	16	8	1	4	>128	>64	0,03	64
2471	4	>128	>128	32	4	2	0,5	2	>128	>64	1	64
2512	>64	64	>128	<0,5	2	4	<0,5	0,5	<1	>128	1	16

### 3.5.2. Характеристика геномов репрезентативных изолятов

#### *K. pneumoniae*

Мобильный геном выборки изолятов был представлен от одной до четырех плазмид. Анализ последовательностей плазмидома показал наличие крупной гибридной плазмиды (~311-422 Кб), содержащей два типа репликонов IncFIB и IncHI1B, которые несли гены устойчивости к антибиотикам и вирулентности соответственно. У гибридных плазмид phvKpST395\_2024, phvKpST395\_NDM-1\_1657 и phvKpST395\_NDM-1\_2512 обнаруживался дополнительный IncR тип-репликона (Рисунок 17). Наиболее близкими плазмидами из глобальной базы данных NCBI были pKpST383L изолята *K. pneumoniae* KpST383\_NDM\_OXA-48 (номер доступа в генбанке NCBI CP034201.2) и pKpST147B\_virulence (номер доступа в генбанке NCBI CP040726.1) изолята *K. pneumoniae* KpST147B\_SE1\_1\_NDM из двух разных стационаров Лондона [155], а также p51015\_NDM\_1 (номер доступа в генбанке NCBI CP050380.1) изолята *K. pneumoniae* 51015, выделенного в Чехии. Описанные плазмиды из глобальной базы данных относились к такому же коинтегрированному типу репликона (IncFIB/IncHI1B).

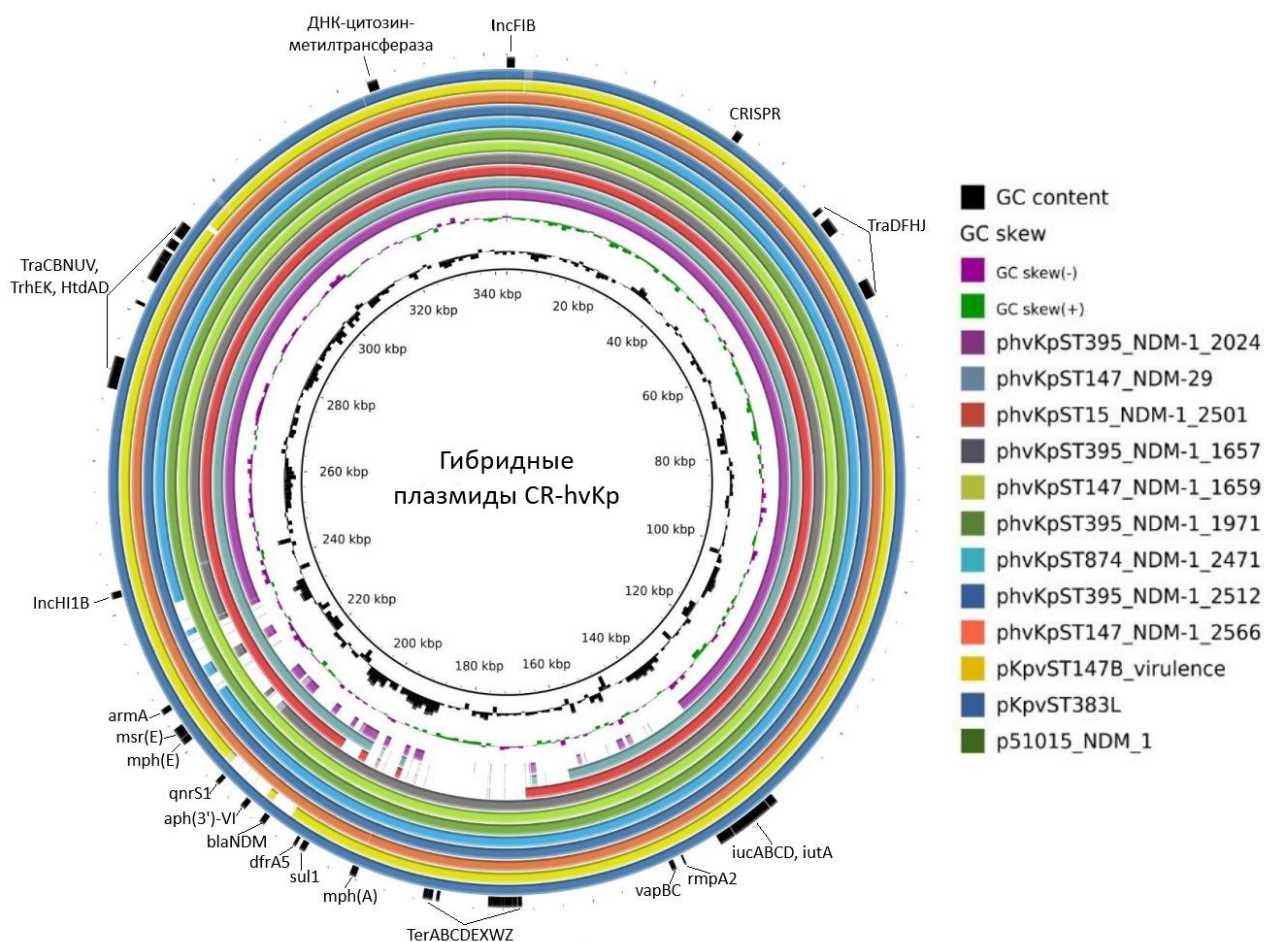


Рисунок 17 – Круговая карта гибридных плазмид *K. pneumoniae*. От внутреннего круга к внешнему расположены последовательности плазмид phvKpST395\_NDM-1\_2024, phvKpST147\_NDM-29, phvKpST15\_NDM-1\_2501, phvKpST395\_NDM-1\_1657, phvKpST147\_NDM-1\_1659, phvKpST395\_NDM-1\_1971 (референс), phvKpST874\_NDM-1\_2471, phvKpST395\_NDM-1\_2512, phvKpST147\_NDM-1\_2566, pKpvST147B\_virulence, pKpvST383L, и p51015\_NDM\_1

**Примечание:** На внутренних кругах отклонения GC состава обозначены темно-зеленым и фиолетовым цветом, GC контент – черным. На внешнем круге отмечены гены устойчивости к антибиотикам, гены вирулентности, трансконъюгации, систем PM, TA и CRISPR локуса.

Некоторые изоляты также несли плазмиды типов репликонов IncFIB/IncFII (2471\_kpn, 2501\_kpn, 51015), IncR (1659\_kpn, 1970\_kpn, 1971\_kpn), IncL (KpvST383\_NDM\_OXA-48) и IncFIB (KpvST147B\_SE1\_1\_NDM). Данные плазмиды локализовали гены устойчивости к тяжелым металлам, которые часто ассоциируют с плазмидами, несущими детерминанты вирулентности, и устойчивости к антибиотикам, в том числе карбапенемазы и БЛРС (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>,

*bla*<sub>TEM-1A</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>). Было обнаружено, что гибридные плазмиды изолятов 1970\_kpn, 2024\_kpn, 2501\_kpn короче (~315 Кб) по сравнению с плазмидами других CR-hvKp в основном из-за отсутствия кластера генов устойчивости к теллуриду.

Было обнаружено, что изоляты CR-hvKp несли от 11-20 генов устойчивости к антибиотикам. Помимо широко распространенных хромосомных генов устойчивости к фторхинолонам (*oqxAB*) и фосфомицину (*fosA*), хромосома штамма KpvST383\_NDM\_OXA-48, выделенного в Великобритании, также несла гены *catA1*, *tet(A)*, *mph(A)*, а хромосома штамма 2501\_kpn – *aac(3)-IId* (Таблица 21). Помимо *bla*<sub>SHV</sub>, который, как правило, локализован на хромосоме *K. pneumoniae*, обнаружены другие гены β-лактамаз. В частности, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> был обнаружен в составе МГЭ ISEcp1-*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, обычно фланкированного IS26 и содержащегося на последовательности производной от Tn2. БЛРС класса А были локализованы на различных МГЭ, содержащихся на гибридных плазмидах (IncFIB/IncHI1B, IncFIB/IncHI1B/IncR, IncFIB/IncFII) или плазмидах, относящихся к типу репликона IncR. Гены *bla*<sub>OXA-9</sub> и *bla*<sub>TEM-1A</sub> входили в состав либо Tn6238-, либо в IS26-зависимых МГЭ, интегрированных в типы плазмид IncR или IncFIB/IncHI1B, или интегроны 1 класса. Ген *bla*<sub>OXA-48</sub> был ассоциирован с инвертированным Tn1999.2 на плазмиде типа IncL, *bla*<sub>OXA-244</sub>, в свою очередь – с IS1R-опосредованным МГЭ. Ген *bla*<sub>OXA-1</sub> вместе с *catB3* и *aac(6')-Ib-cr* был ассоциирован с IS26-опосредованными МГЭ, расположенными на гибридных плазмидах или плазмидах типа IncR. Как правило, таким же способом, *bla*<sub>TEM-1B</sub> были интегрированы в плазмиды типа IncR. Было обнаружено, что все изоляты несли *bla*<sub>NDM-1</sub>, за исключением 2024\_kpn, который не содержит генов МБЛ. У большинства изолятов *bla*<sub>NDM</sub> был интегрирован в плазмиду IncFIB/IncHI1B, в то время как изолят KpvST147B\_SE1\_1\_NDM, выделенный в Великобритании, нёс карбапенемазу *bla*<sub>NDM-1</sub> на плазмиде типа IncFIB. Другие варианты Нью-Дели карбапенемаз на гибридных плазмидах типа IncFIB/IncHI1B наблюдались

у изолята из Великобритании, KpvST383\_NDM\_OXA-48, который нёс *bla*<sub>NDM-5</sub>, и 1970\_kpn – *bla*<sub>NDM-29</sub>.

Ключевыми факторами вирулентности, содержащимися на хромосомах исследованных изолятов *K. pneumoniae*, были липополисахариды (2-кето-3-дезоксид-D-маннооктулозонат-8-фосфатсинтаза [*kds*], часть эндотоксина липида А), гены энтеробактина (сидерофор энтеробактин [*ent*], энтеробактин-связывающий периплазматический белок [*fep*]), пили *E. coli* (*esp*) и фимбрии 1 типа (*fim*). Локус синтеза иерсиниобактина (*ybt*) был обнаружен у половины проанализированных геномов, включая всех представителей ST395. Ген устойчивости к серебру (*silA*) обнаружен на хромосоме изолятов 1971\_kpn, 2512\_kpn, KpvST147B\_SE1\_1\_NDM и KpvST383\_NDM\_OXA-48. В изоляте из Великобритании KpvST147B\_SE1\_1\_NDM локус *esp* входил в состав предполагаемого интегративного и мобилизуемого элемента (IME). У изолята из Чехии, 51015, и 2512\_kpn из данного исследования кластеры генов биосинтеза иерсиниобактина, его рецептора и генов регуляторного белка железа локализовались вместе с локусом системы секреции IV типа (T4SS) на ICE, интегрированном в хромосому.



Таблица 21 – Фенотипические и генотипические характеристики изолятов 1970\_kpn, 1659\_kpn, 1657\_kpn, 1971\_kpn, 2024\_kpn, 2471\_kpn, 2501\_kpn, 2512\_kpn, 2566\_kpn изучаемой коллекции. Изоляты KPVST147B\_SE1\_1\_NDM, KPVST383\_NDM\_OXA-48 из исследования [155] и изолят 51015 из исследования [26].

Изолят	1657_kpn	1659_kpn	1970_kpn	1971_kpn	2024_kpn	2471_kpn	2501_kpn	2512_kpn	2566_kpn	KpvST147B_SE1_1_NDM	KpvST383_NDM_OXA-48	51015
ST	395	147	147	395	395	874	15	395	147	147	383	15
Номер доступа в генбанке NCBI	SRX5381967	SRX5381965	CP066855-CP066858	MW911666	MW911667	MW911668	MW911669	MW911670	MW911671	CP040724-CP040731	CP034200-CP034202	CP050376.1-CP050381.1
К-тип	KL2	KL20	KL20	KL2	KL2	KL45	KL19	KL2	KL20	KL35	KL30	KL24
О-тип	O1v1	O2v1	O2v1	O1v1	O1v1	O1v2	O1/O2v2	O1v1	O2v1	O2v1	O1v2	O1v1
LD <sub>50</sub> , КОЕ	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	-	-	-
МПК меропенема	64	32	8	16	4	4	8	4	8	-	-	-
Хромосомные гены резистентности	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-11</sub></i>	<i>fosA5, oqxAB, bla<sub>SHV-67</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-121</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-28</sub>, aac(3)-IId</i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-182</sub></i>	<i>oqxAB, fosA, bla<sub>SHV-11</sub></i>	<i>fosA5, oqxAB, bla<sub>SHV-67</sub></i>	<i>bla<sub>SHV-26</sub>, cataI, fosA, tet(A), mph(A), oqxAB</i>	<i>fosA5, oqxAB, bla<sub>SHV</sub></i>
Хромосомные CRISPR	-	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (43 спейсера)	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (43 спейсера)	-	-	-	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (43 спейсера)	-	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (43 спейсера)	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (10+9 спейсеров)	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (15 спейсеров)	CRISPR система типа I-E с 1 CRISPR локусом (10+9 спейсеров)
Хромосомные гены вирулентности	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABC EH, ybtAEPQST UX, fyuA, irp1, irp2, kdsA, silA</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimAB CEH, kdsA, silA</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABCEH, kdsA, silA</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimAB CEH, ybtAEPQST UX, fyuA, irp1, irp2, kdsA</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABCEH, kdsA, silR</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimAB CEH, kdsA, silR</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimAB CEH, kdsA, silR</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABC EH, (ybtAEPQST UX, fyuA, irp1, irp2) предполагаемый ICE с T4SS, kdsA</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABCEH, kdsA, silA</i>	<i>kdsA, ybtAEPQST UX, irp1, irp2, fyuA, fimABCEH, (ecpABCDER) предполагаемый IME с T4SS, fepBCDG, entABES</i>	<i>entABES, fepBCDG, ecpABCDER, fimABCEH, kdsA</i>	<i>ecpABCDER, kdsA, (ybtAEPQSTUX, irp1, irp2, fyuA) предполагаемый ICE с T4SS, fimABCEH, ecpABCDER, fepBCDG, entABES, silA</i>

Продолжение таблицы 21

Изолят	1657_kpn	1659_kpn	1970_kpn	1971_kpn	2024_kpn	2471_kpn	2501_kpn	2512_kpn	2566_kpn	KpvST147B_SE1_1_NDM	KpvST383_NDM_OXA-48	51015	
Хромосомные токсин-антитоксिन-системы	-	-	<i>relBE, yfhG-fic, ydaST, higAB, hxlR, vapBC, phd-doc, cptAB, ratAB, oriT (ydcX), ydcY</i>	-	-	-	-	-	-	<i>relBE, yeeVU, higB, ydcY, ratAB, oriT (ydcX), cptAB, ykfIZ, yfhG-fic, phd-doc</i>	-	-	
Хромосомные системы рестрикции-модификации	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	StySKI (I, рестриктаза) M.Sen192II (I, метил-трансфераза), М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза), М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	StySKI (I, restriction enzyme), M.Sen192II (I, метил-трансфераза), М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)	М.Крп3461 8Dcm (II, метил-трансфераза)
Системы рестрикции-модификации плазмид, отличных от гибридных	-	-	-	-	-	FIB/FII: M.EcoJA03 P I (I тип) FIB/FII: M.EcoJA03 PI (I тип)	FIB/FII: M.EcoJA03 P I (I тип) FIB/FII: M.EcoJA03 PI (I тип)	-	-	FIB: S.Kpn1420II (I тип), M.Kpn928I (I тип)	-	-	
Число плазмид	1	3	3	2	4	2	2	1	2	7	2	5	
IncFIB/ IncHIIIB (pNDM-MAR)	-	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mph(A), mph(E), msr(E), armA, aph(3')-VI, qnrS1, sul1, sul2, dfrA5</i>	<i>sul2, armA, msr(E), mph(E), qnrS1, aph(3')-VI, bla<sub>NDM-29</sub>, dfrA5, sul1</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mph(A), mph(E), msr(E), armA, aph(3')-VI, qnrS1, sul1, sul2, dfrA5</i>	-	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mph(A), mph(E), msr(E), aph(3')-VI, qnrS1, sul1, dfrA5</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mph(E), msr(E), armA, aph(3')-VI, qnrS1, sul2</i>	-	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mph(A), mph(E), msr(E), armA, aph(3')-VI, qnrS1, sul1, sul2, dfrA5</i>	<i>sul1, sul2, armA, dfrA5, mph(A), msr(E), mph(E), bla<sub>CTXM-15</sub></i>	<i>bla<sub>NDM-5</sub>, bla<sub>CTXM-15</sub>, qnrS1, aac(6')-Ib, bla<sub>OXA-9</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, catA1, sul1, sul2, armA, dfrA5, aph(3')-Ia, aph(3')-VI, aadA1, mph(A), mph(E), msr(E)</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, qnrS1, dfrA5, sul1, sul2, armA, aph(3')-VI, Ia, aph(3')-VI, mph(A), mph(E), msr(E)</i>	

Продолжение таблицы 21

Изолят	1657_kpn	1659_kpn	1970_kpn	1971_kpn	2024_kpn	2471_kpn	2501_kpn	2512_kpn	2566_kpn	KpvST147B_SE1_1_NDM	KpvST383_NDM_OXA-48	51015
IncFIB/ IncH11B (pNDM-MAR)	-	Гены вирулентности		<i>rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, terABCDEW XYZ, peg-344, pagO, shiF, ydjA, cobW, luxR</i>	<i>iutA, iucABCD, rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, pagO, shiF, ydjA, cobW</i>	<i>rmpA2, iucABCD, iutA, terABCDEW XYZ, peg-344, pagO, shiF, ydjA, cobW, luxR</i>	<i>rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, pag-344, pagO, shiF, ydjA, cobW, luxR</i>	-	<i>rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, terABCDEWX YZ, peg-344, pagO, shiF, ydjA, cobW, luxR</i>	<i>iutA, iucABCD, rmpA, rmpA2, peg-344, terABCDEWX YZ, cobW, luxR, pagO, ydjA, shiF</i>	<i>iutA, iucABCD, rmpA, rmpA2, peg-344, terABCDEWX, cobW, luxR, pagO, ydjA, shiF</i>	<i>iutA, iucABCD, rmpA, rmpA2, peg-344, terABCDEWX YZ, cobW, luxR, pagO, ydjA, shiF</i>
		Гены резистентности		<i>bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, mph(A), aph(3')-VI, qnrS1, sul1, dfrA1, dfrA5, catA1, tet(A)</i>	-	<i>qnrS1, aac(6')-Ib-cr, tet(A), dfrA1, sul1, catA1, catB3, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub></i>	-	-	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, mph(A), mph(E), msr(E), armA, aph(3')-VI, aac(6')-Ib-cr, qnrS1, sul1, sul2, dfrA1, dfrA5, catA1, catB3, tet(A)</i>	-	-	-
IncFIB/IncH11 B/IncR	-	Гены вирулентности		<i>rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, terABCDEW XYZ, peg-344, pagO, shiF, ydjA, cobW</i>	-	<i>iucA, rmpA, peg-344, luxR, shiF</i>	-	-	<i>rmpA, rmpA2, iucABCD, iutA, terABCDEW XYZ, peg-344, pagO, shiF, ydjA, cobW, luxR</i>	-	-	-
		Гены резистентности		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Продолжение таблицы 21

Изолят	1657_kpn	1659_kpn	1970_kpn	1971_kpn	2024_kpn	2471_kpn	2501_kpn	2512_kpn	2566_kpn	KpvST147B_SE1_1_NDM	KpvST383_NDM_OXA-48	51015
Гены резистентности IncFIB типа плазмид	-	-	<i>dfrA5</i>	-	-	-	-	-	-	<i>aac(6')-Ib-cr, bla<sub>OXA-1</sub>, catB3, arr-3, sul1, bla<sub>CTX-M-15</sub>, qnrS1, aph(3')-VI, bla<sub>NDM-1</sub></i>	-	-
Гены резистентности IncR типа плазмид	-	<i>bla<sub>OXA-9</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1A</sub>, aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib, aadA1, qnrS1;</i> детерминанты вирулентности: <i>merACDEP RT</i>	<i>bla<sub>TEM-1</sub>, bla<sub>OXA-9</sub>, aadA, aac(6')-Ib</i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, aac(6')-Ib-cr, qnrS1, sul1, dfrA1, catA1, catB3, tet(A)</i>	-	-	-	-	<i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, qnrS1;</i> детерминанты вирулентности: <i>merACDEPRT</i>	<i>aac(6')-Ib, aadA1, bla<sub>OXA-9</sub>, bla<sub>TEM-1A</sub></i>	-	-
Гены резистентности IncL типа плазмид	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>aph(6)-Id, aph(3')-Ib, aph(3')-VIb, bla<sub>CTX-M-14b</sub>, bla<sub>OXA-48</sub></i>	-
Гены резистентности IncFIB/IncFII типа плазмид	Гены резистентности	-	-	-	-	-	<i>bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, aph(3')-Ia, aac(6')-Ib-cr, catA1, catB3</i>	<i>bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, mph(A), aac(6')-Ib-cr, aadA2, sul1, dfrA12, catB3, tet(A)</i>	-	-	-	-

Продолжение таблицы 21

Изолят	1657_kpn	1659_kpn	1970_kpn	1971_kpn	2024_kpn	2471_kpn	2501_kpn	2512_kpn	2566_kpn	KpvST147B_SE1_1_NDM	KpvST383_NDM_OXA-48	51015
Гены резистентности IncR типа плазмид	Гены вирулентности	<i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>qnrS1</i> ; детерминанты вирулентности: <i>merACDEPRT</i>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> , <i>aadA</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrS1</i> , <i>sul1</i> , <i>dfrA1</i> , <i>catA1</i> , <i>catB3</i> , <i>tet(A)</i>	-	-	<i>arsABCDR</i> , <i>pcoABCDER S</i> , <i>silABCEF GPRS</i>	<i>arsABCDR</i> , <i>pcoABCDER S</i> , <i>silABCEF GPRS</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>qnrS1</i> ; детерминанты вирулентности: <i>merACDEPRT</i>	<i>aac(6')-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub>	-	-
Другие плазмиды	-	ColRNAI	-	-	ColRNAI	-	-	-	-	IncFIB, IncR, IncX4	-	IncFII, ColRNAI

### 3.5.3. Анализ механизма поддержания гибридных плазмид представителей конвергентного патотипа *K. pneumoniae*

Используя базу доменов токсинов из Pfam, интегрированную в SLING, идентифицирована 21 группа токсинов (18 – II типа, 3 – IV типа [CbtA, Cpta, AbiEii]). Антитоксин более восприимчив к деградации протеазами хозяина, чем токсин. Таким образом, если возникает бесплазмидная клетка, антитоксин не восполняется из-за отсутствия плазмиды, что позволяет токсину взаимодействовать с важным внутриклеточным фактором хозяина, вызывая гибель или ограничение роста клетки без плазмиды. ТА были широко распространены во всех изолятах *K. pneumoniae*, в среднем 17 локусов на геном. Домены токсинов GNAT\_acetyltran, HD, HipA, Cpta и Fic локализовались на хромосомах анализируемых изолятов *K. pneumoniae*. Хромосомные ТА системы вызывают обратимую остановку клеточного цикла или запрограммированную гибель клеток в ответ на недостаток питательных веществ или другие неблагоприятные условия. Также были обнаружены различные комбинации доменов токсинов HigB, CcdB, CbtA, ParE, PIN, Gp49, RelE, Polyketide\_cyc2, YdaT, PIN и AbiEii. Не менее важным является ТА система II типа – VarBC, которая обнаруживалась на всех гибридных плазмидах. Кроме того, HigAB (домен PIN) обнаруживался на гибридных плазмидах изолятов 1657\_kpn и 2512\_kpn. PIN, ParE, RelE, Gp49 также наблюдались на разных плазмидах, помимо гибридных, вместе с доменами HicA, NTP\_transf\_2, PemK, YoeB, CbtA, ANT.

Система рестрикции-модификации может способствовать сегрегационной стабильности и обеспечивать защиту от вторжения экзогенной ДНК. Среди генов систем РМ, метилтрансфераза II типа M.Kpn34618Dcm присутствовала на хромосомах всех анализируемых изолятов (Таблица 21). Хромосомы изолятов 1659\_kpn и 2566\_kpn несли рестриктазу StySKI I типа, а 1970\_kpn – метилтрансферазу M.Sen1921I I типа. На гибридных плазмидах всех изолятов, кроме 2024\_kpn, обнаружена ДНК-цитозинметилтрансфераза. При этом

фермент рестрикции аналогичен токсину, а в свою очередь модификация метилазой эквивалентна антитоксину.

Несмотря на распространение плазмид IncF типа или его гибридных представителей среди изучаемой коллекции, которое связывают с отсутствием систем CRISPR-Cas [149], данный локус I-E типа был обнаружен на хромосомах изолятов 1659\_kpn, 1970\_kpn и 2566\_kpn, и 2501\_kpn (Таблица 21). Он состоял из восьми генов оперона Cas (Cas1,2,3,5, Cse1,2,3,4) и повторяющейся последовательности с 43 спейсерами, одинаковыми для разных изолятов, которые не были идентичны собственным гибридным плазмидам. Было выявлено наличие двух CRISPR локусов I-E типа с идентичными повторяющимися последовательностями (10+9 спейсеров) в хромосомах изолятов KpvST147B\_SE1\_1\_NDM и 5105, выделенного в Чехии. Изолят KpvST383\_NDM\_OXA-48, выделенный в Великобритании, содержал локус CRISPR-Cas I-E типа с повторяющейся последовательностью, чередующейся с 15 спейсерами, последний из которых совпадал с соответствующим спейсером CRISPR локуса, содержащего 43 спейсера.

В дополнение, на гибридных плазмидах был обнаружен CRISPR локус с 16 спейсерами (кроме плазмиды phvKpST395\_2024 с 12 спейсерами и плазмиды pKpvST383L с 13 спейсерами от изолята, выделенного в Великобритании), не примыкающий к генам cas. Один спейсер из всех CRISPR локусов гибридных плазмид был идентичен последовательности профага Gifsy-2, расположенной на хромосомах вышеупомянутых изолятов (кроме KpvST147B\_SE1\_1\_NDM, выделенного в Великобритании, и 5105, выделенного в Чехии). Кроме того, гибридные плазмиды несли другой спейсер, который соответствовал гену *traL* конъюгативной плазмиды IncF *K. pneumoniae*. Это обеспечивало барьер для приобретения более чем одной плазмиды IncF типа с генами устойчивости к антибиотикам, что влечёт за собой возможное снижение адаптивности.

### 3.5.4. Характеристика гибридных плазмид представителей конвергентного патотипа *K. pneumoniae*

Гибридные плазмиды типа IncFIB/IncH1B анализируемых изолятов содержали ключевые детерминанты вирулентности, такие как кластер генов биосинтеза аэробактина (*iucABCD*), его рецептор (*iutA*), гены синтеза капсульных полисахаридов (*rmpA*, *rmpA2*), метаболический транспортер (*peg-344*, *pagO*), другие гены, связанные с гипервирулентностью (*cobW*, *luxR*, *shiF* и *udjA*) и гены, кодирующие устойчивость к тяжелым металлам, такие как *terBEDWXZ*. Линейное выравнивание гибридных плазмид, а также описание кластеров генов показано на Рисунках 18 и 19 соответственно. В отличие от остальных изолятов, 2024\_kpn нёс наименьший набор генов вирулентности на гибридной плазмиде IncFIB/IncH1B/IncR. В частности, у него отсутствовали *iucBCD*, *iutA*, *rmpA2*, *pagO* и *udjA*, которые наблюдались у остальных анализируемых изолятов. Кроме того, все гибридные плазмиды содержали гены, кодирующие белки конъюгативного переноса, что свидетельствует о возможности горизонтального переноса плазмид. В дополнение, во всех плазмидах IncFIB/IncFII были обнаружены гены устойчивости к тяжелым металлам, такие как *silABCEFGPRS* (к серебру), *arsABCDR* (к мышьяку) и *pcoABCDERS* (к меди), а также в нескольких плазмидах IncR были обнаружены гены устойчивости к ртути – *merARCTP*.



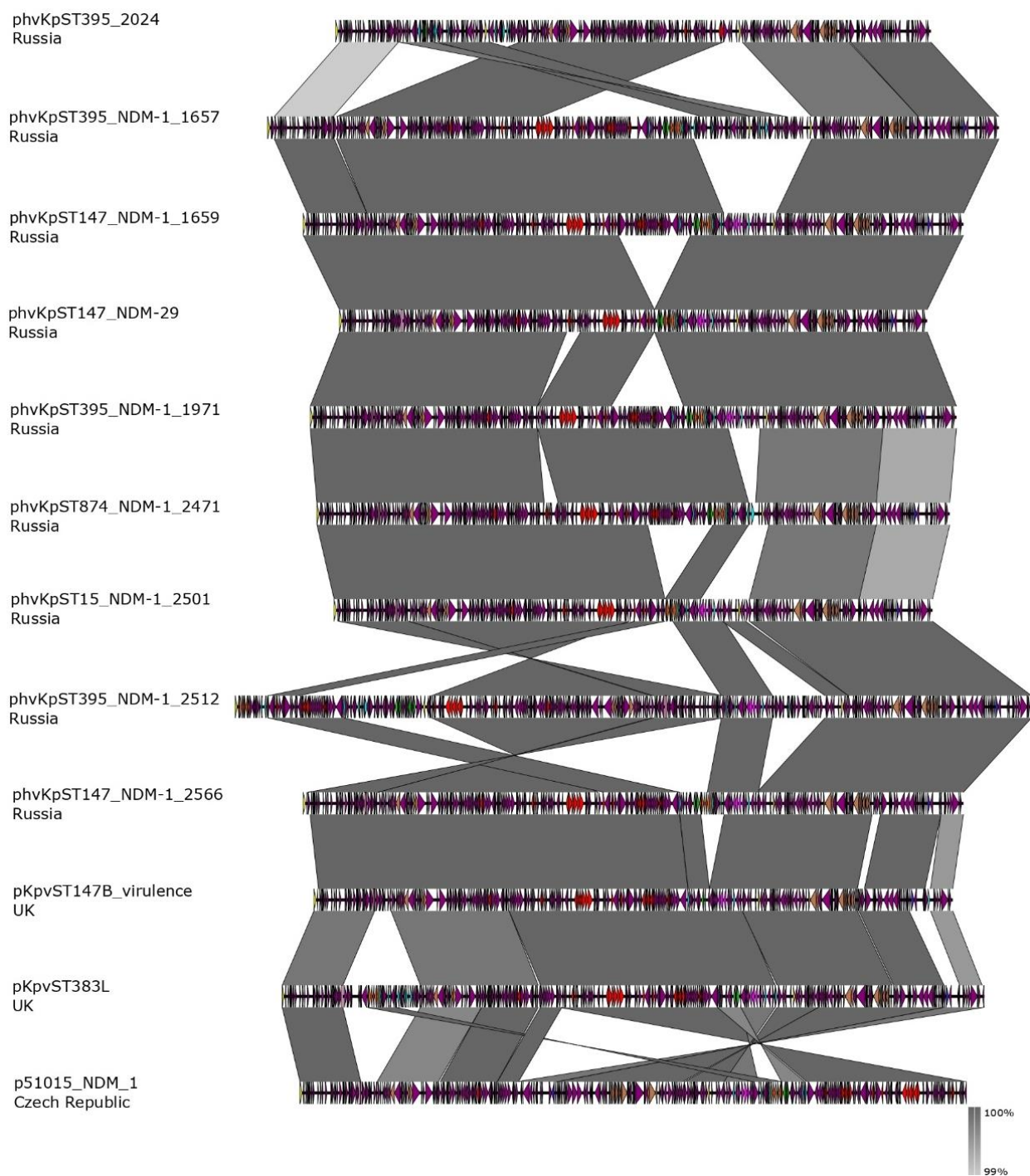


Рисунок 18 – Линейное выравнивание гибридных плазмид phvKpST395\_2024, phvKpST395\_NDM-1\_1657, phvKpST147\_NDM-1\_1659, phvKpST147\_NDM-29, phvKpST395\_NDM-1\_1971, phvKpST874\_NDM-1\_2471, phvKpST15\_NDM-1\_2501, phvKpST395\_NDM-1\_2512, phvKpST147\_NDM-1\_2566, pKpvST147B\_virulence, pKpvST383L, и p51015\_NDM\_1

**Примечание:** Плазмиды показаны, начиная с репликона IncFIB-типа. Идентичные области показаны темно-серым цветом. Цветами обозначены гены:

- ассоциированные с гипервирулентностью (*rmpA*, *rmpA2*, *iucABCD*, *iutA*, *terABCDEWXYZ*, *pagO* – ген белка, защищающего бактерии от фагоцитоза, *cobW* – участвующего в биосинтезе кобаламина, *luxR* – кодирующего регулятор кворум-сенсинга, *shiF* – способствующий переносу лизина, *ydjA* – ген нитроредуктазы) – красными стрелками;
- резистентности (*aph(3')-I*, III, VI – ген аминогликозид-3'-фосфотрансферазы, *qnrS1*, *sul2*, *mph(A)*, *catA1* – ген хлорамфеникол-О-ацетилтрансферазы, *aac(6')-Ib* – ген аминогликозид-N(6')-ацетилтрансферазы, *aadA1* – ген аминогликозид-3"-нуклеотидилтрансферазы, *bla<sub>OXA-1,9,48</sub>* – ген β-лактамаз класса D, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>TEM-1A,B</sub>* – гены β-лактамаз класса A) – голубыми стрелками;
- Tn125-подобного МГЭ – оранжевыми стрелками;
- интегровов 1 класса – зелеными стрелками;
- Tn1548 – сиреневыми стрелками;
- белков инициации репликации – желтыми стрелками;
- кодирующие белки конъюгативного переноса (IncF *traBCDFHJNUV*, IncH1 *trhAEKT*, *orf4*) – коричневыми стрелками;
- гены, связанные с системами РМ – темно-синими стрелками;
- гены, связанные с системами ТА – темно-зелеными стрелками;
- CRISPR локусов – розовыми стрелками;
- другие гены – фиолетовыми стрелками.

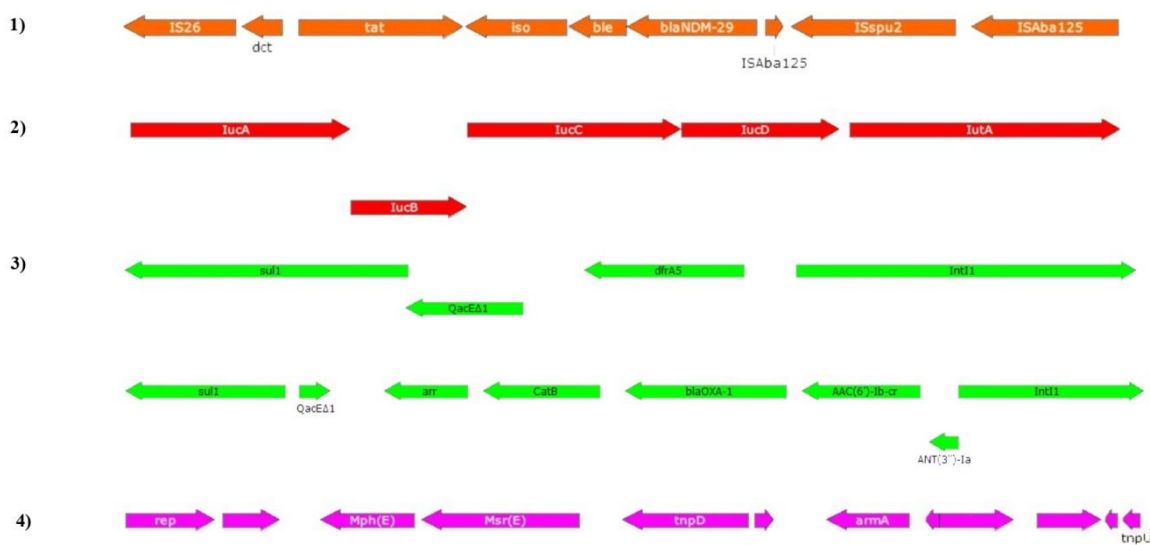


Рисунок 19 – Описание состава Tn-125, Tn1548, интегрона 1 класса и кластера генов вирулентности

**Примечание:** (1) Гены Tn125-подобного МГЭ (*IS26*, *dct*, *tat*, *iso*, *ble*, *bla<sub>NDM</sub>*, *ISAbal25*, *ISpu2*) отмечены оранжевыми стрелками;

(2) Кластер генов аэробактина (*iucABC*, *iucD* – НАДФ-зависимая L-лизин N(6)-монооксигеназа, *iutA*) отмечен красными стрелками;

(3) Гены интегрона 1 класса (*sul1*, *dfrA5*, *arr* – ген рифампицин-АДФ-рибозилтрансферазы, *catB* – ген хлорамфеникол-О-ацетилтрансферазы, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *aac(6')-Ib-cr* – ген аминогликозид-N(6')-ацетилтрансферазы, *ant(3'')-Ia* – ген аминогликозид-3"-нуклеотидилтрансферазы, *int11* – интеграна 1 класса) отмечены зеленым цветом. Ниже изображён интегрон 1 класса плазмиды pKpVST147B\_NDM\_1;

(4) Гены Tn1548 (*rep* – ген инициации репликации, *mph(E)*, *msr(E)* – ген эффлюкса макролидов, *tnpU*, *tnpD* – гены транспозаз, *armA* – ген рНК метилазы).

Исходно мозаичными плазмидами считались структуры, которые состоят из МГЭ, полученных от различных источников, и несут гены, способствующие увеличению адаптивности хозяина. Следовательно, гибридные плазмиды, локализирующие одновременно гены вирулентности и резистентности с большим числом последовательностей вставок в их окружении (IncFIB/IncHII1B, для изолята 2024\_kpn на плазмиде типа IncFIB/IncFII), согласуются с определением мозаичных структур. К ним относятся phvKpST395\_2024, phvKpST395\_NDM-1\_1657, phvKpST147\_NDM-1\_1659, phvKpST147\_NDM-29 (изолят 1970\_kpn), phvKpST395\_NDM-1\_1971, phvKpST874\_NDM-1\_2471, phvKpST15\_NDM-1\_2501, phvKpST395\_NDM-1\_2512, phvKpST147\_NDM-1\_2566, pKpvST147B\_virulence (изолят KPVST147B\_SE1\_1\_NDM из Великобритании), pKpvST383L (изолят KPVST383\_NDM\_OXA-48 из Великобритании), p51015\_NDM\_1 (изолят 51015 из Чехии).

### **3.5.5. Эволюционный путь возникновения гибридных плазмид**

#### ***K. pneumoniae***

Различия вариаций состава и локализации кластера генов вирулентности и МГЭ говорит о различных типах гибридных плазмид среди изучаемой коллекции. На основании выравнивания последовательностей phvKpST147\_NDM-29, phvKpST395\_2024 и pKpvST147B\_virulence в эволюционном процессе формирования типов гибридных плазмид наблюдается разделение на различные ветви (Рисунок 20).

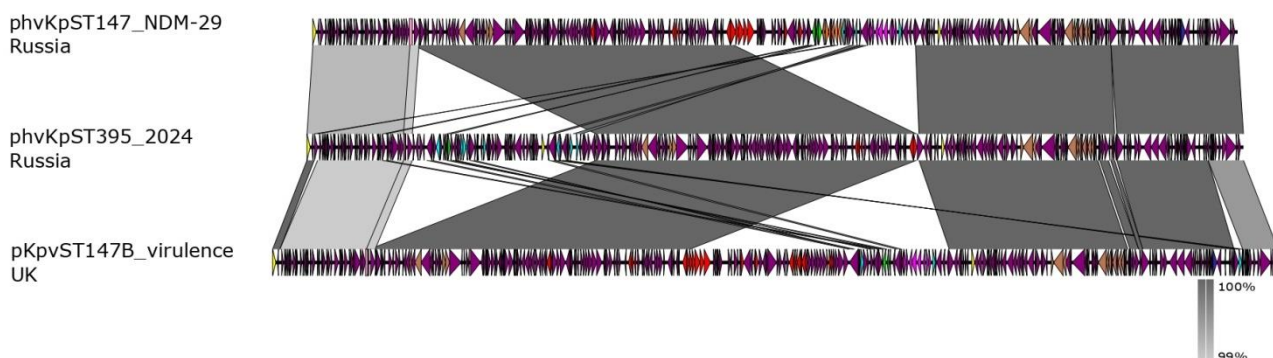


Рисунок 20 – Выравнивание плазмид phvKpST395\_2024, phvKpST147\_NDM-29 и pKpvST147B\_virulence. Обозначения цветов соответствуют рисунку 18

Предполагается существование предшественника плазмиды phvKpST395\_2024 типа репликона IncFIB/IncHI1B с полным кластером детерминант вирулентности (предшественник 1). К возможным эволюционным путям, приводящим к формированию четырёх типов гибридных плазмид, можно отнести следующие (Рисунок 21): предшественник 1 приобретает Tn1648, что приводит к формированию предшественника 2. Далее происходит приобретение (1) Tn-125-подобного МГЭ, что приводит к формированию гибридной плазмиды 1 типа (phvKpST147\_NDM-29, phvKpST395\_NDM-1\_1971, phvKpST15\_NDM-1\_2501) или (2) кластера генов устойчивости к теллуриду, что приводит к формированию гибридной плазмиды 2 типа (pKpvST147B\_virulence у изолята KpvST147B\_SE1\_1\_NDM). Далее происходит (3) приобретение плазмидой 2 типа Tn125-подобного МГЭ из плазмиды IncFIB-типа pKpvST147B\_NDM\_1, что приводит к формированию гибридной плазмиды 3 типа (phvKpST147\_NDM-1\_1659, phvKpST874\_NDM-1\_2471, phvKpST395\_NDM-1\_2512, phvKpST147\_NDM-1\_2566, pKpvST383L, p51015\_NDM\_1). Или же происходит (4) делеция области, содержащей гены, ассоциированные с гипервирулентностью (*iutA*, *iucBCD*, *rmpA2*, *cobW*, *pagO*, *ydjA*), у предшественника 1 и слияние с плазмидой IncR-типа, что приводит к формированию гибридной плазмиды 4 типа (phvKpST395\_2024).

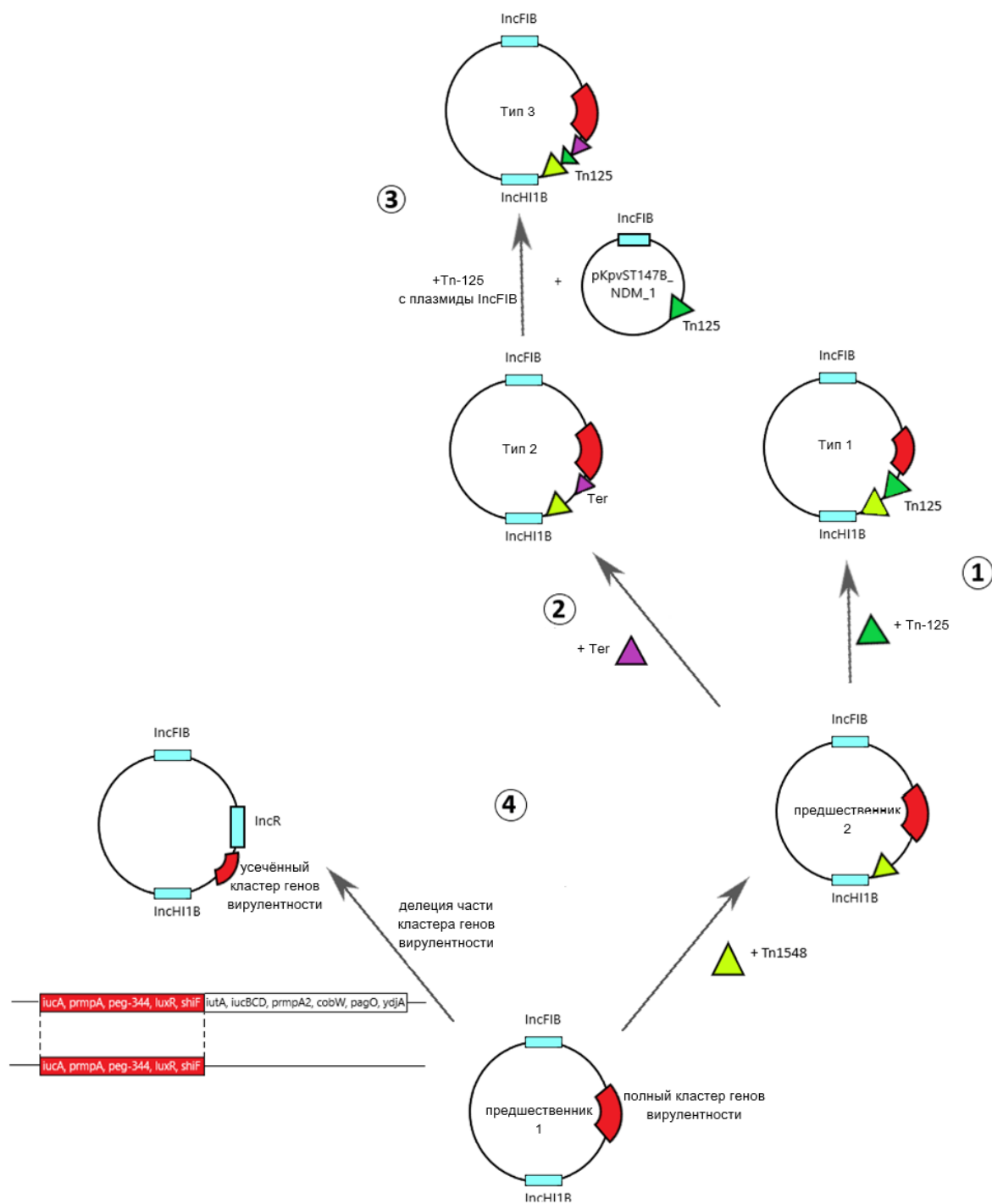


Рисунок 21 – Вероятный эволюционный путь образования 4 различных типов гибридных плазмид. Описание в тексте

Изолят KpvST147B\_SE1\_1\_NDM, выделенный в Великобритании, одновременно нёс плазмиду pKpvST147B\_virulence, содержащую кластер устойчивости к теллуриду, и pKpvST147B\_NDM\_1, локализирующий Tn125-подобный МГЭ (Рисунок 22). Таким образом, можно предположить, что изолят

KpvST147B\_SE1\_1\_NDM является предшественником формирования плазмиды, несущей одновременно детерминанты устойчивости к теллуриду и Tn125-подобный МГЭ.

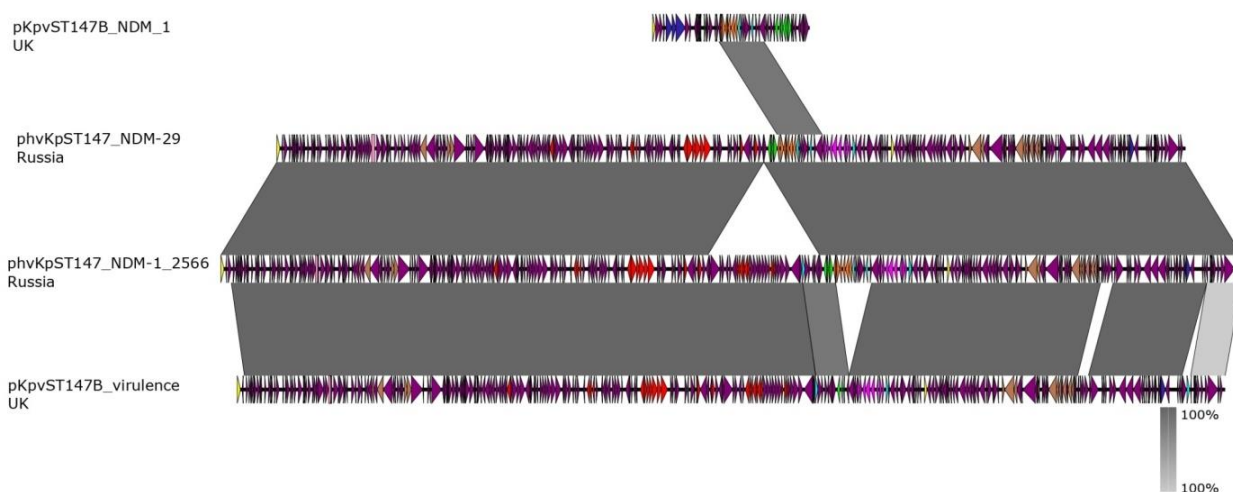


Рисунок 22 – Линейное выравнивание плазмид pKpvST147B\_NDM\_1, pKpvST147B\_virulence (изолята *K. pneumoniae* KpvST147B\_SE1\_1\_NDM, выделенного в Великобритании), phvKpST147\_NDM-29 и phvKpST147\_NDM-1\_2566. Обозначения цветов соответствуют рисунку 18

Для определения глобального механизма формирования гибридных плазмид «английского» типа было представлено линейное выравнивание её последовательности вместе с последовательностью канонической вирулентной плазмиды pLVPK, а также плазмиды pNDM-MAR, несущей кластер генов, отвечающих за конъюгацию и резистентность (Рисунок 23). Гибридная плазида имела покрытие 46% с плазмидой группы pLVPK, и 61% с pNMD-MAR. Исходя из идентичности данных генетических структур можно предположить, что гибридные плазмиды возникли в результате инсерции генов вирулентности в плазмиду с генами резистентности.

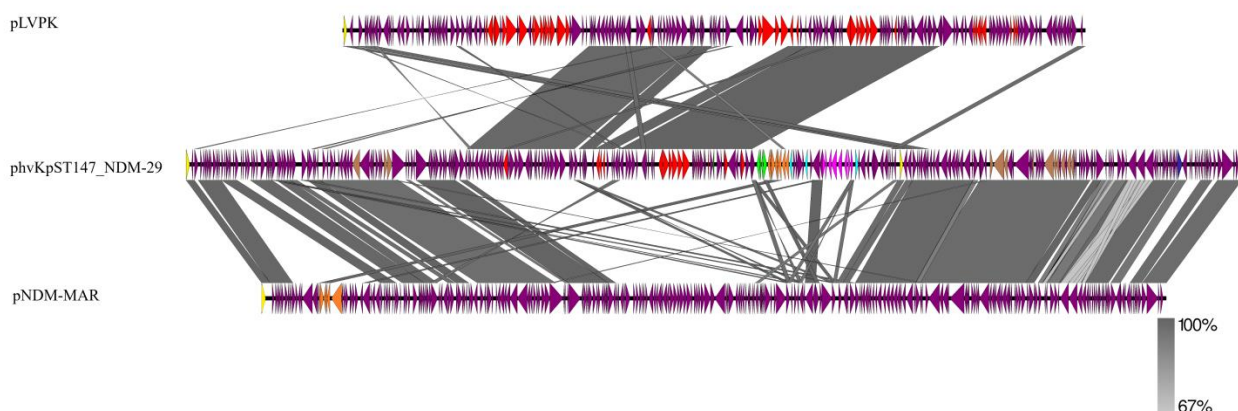


Рисунок 23 – Линейное выравнивание плазмид pLVPK (номер доступа в генбанке NCBI NC\_005249.1), phvKpST147\_NDM-29, pNDM-MAR (номер доступа в генбанке NCBI NC\_016980.1). Обозначения цветов соответствуют рисунку 18

### 3.6. Оценка уровня вирулентности *in vivo* изолятов с различным набором генов вирулентности в септической модели на мышах

Для оценки вирулентности культур на септической модели мышей были отобраны изоляты с различным набором маркеров вирулентности по их количеству (от 0 до 5) и составу, а также принадлежности к гетерогенным генетическим линиям и капсульным типам (Таблица 22). В качестве референса использовали изолят 96\_Kpn, у которого отсутствовали основные маркеры вирулентности и гены карбапенемаз. По результатам экспериментов на инфекционной модели два изолята ST395/KL2 (48, 156), несущие четыре основных маркера вирулентности кроме генов сальмохелина, проявляли минимальный уровень вирулентности ( $LD_{50} = 10^7$  КОЕ). Напротив, изоляты, относящиеся к той же линии ST395/K2 (2512, 1657), с таким же составом маркеров вирулентности проявляли максимальную вирулентность ( $LD_{50} = 10^3$ ,  $10^2$  КОЕ соответственно). Другие изоляты той же линии (1971, 2024), несущие по два разных основных маркера вирулентности проявляли низкий уровень вирулентности ( $LD_{50} = 10^5$  КОЕ). Средним уровнем вирулентности ( $LD_{50} = 10^4$  КОЕ) обладали изоляты линии ST147/K20 (1659, 1970, 2566), несущие 4 основных маркера вирулентности, кроме сальмохелина. Изолят, относящийся к

азиатской генетической линии ST23, с которым изначально связывают hvKp, был авирулентен. Изоляты, несущие только гены биосинтеза аэробактина, и различный набор генов карбапенемаз (7,11), также проявляли максимальную вирулентность. Несмотря на полный набор основных маркеров вирулентности, изолят ST86 проявлял средний уровень вирулентности ( $LD_{50} = 10^5$  КОЕ).

Таблица 22. Молекулярно-генетическая характеристика и значения  $LD_{50}$  для 16 изолятов *K. pneumoniae*.

Изолят	ST	KL	<i>iucA</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	КОЛ-ВО маркеров hv	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i> like	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	$LD_{50}$
86	86	2	+	+	+	+	+	5	–	–	$10^5$
61	23	57	+	+	+	+	–	4	+	–	$>10^7$
48	395	2	+	+	+	+	–	4	+	–	$10^7$
156	395	2	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^7$
1657	395	2	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^2$
2512	395	2	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^3$
1659	147	20	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^4$
2566	147	20	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^4$
1970	147	20	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^4$
2501	15	19	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^4$
2471	874	45	+	+	+	+	–	4	–	+	$10^4$
1971	395	2	+	–	+	–	–	2	–	+	$10^5$
2024	395	2	–	+	–	+	–	2	–	–	$10^5$
7	147	64	+	–	–	–	–	1	+	–	$>10^7$
55	11	23	+	–	–	–	–	1	+	+	$10^7$
96	1662	49	–	–	–	–	–	0	–	–	$>10^7$



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В течение 6 лет в 25 стационарах России наблюдалось распространение потенциально конвергентных, гипервирулентных и CRKp. В Санкт-Петербурге описана циркуляция CR-hvKp, относящиеся к клонам высокого риска, из-за наличия крупных гибридных плазмид, несущих детерминанты вирулентности и гены *bla*<sub>NDM</sub>-типа.

### 4.1. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика антибиотикорезистентности изолятов *K. pneumoniae*

Для изолятов исследуемой коллекции характерен высокий уровень перекрёстной и ассоциированной резистентности. Большая доля изолятов, в соответствии с критериями отбора, оказались продуцентами карбапенемаз трёх групп, имеющих наибольшее значение и распространение: NDM-, OXA-48-, и KPC-типы карбапенемаз. При этом на сегодняшний день можно отметить доминирование продуцентов OXA-48- и NDM-типов. Наблюдается рост доли доминирующих ко-продуцентов NDM+OXA-48, а также увеличение их разнообразия: также выявлены ко-продуценты KPC+OXA-48 и KPC+NDM.

Выявлены особенности эпидемиологии в отношении распространения карбапенемаз на различных географических территориях, подтверждающиеся данными по распределению их продуцентов среди *K. pneumoniae* собранной коллекции. Так, в Москве преобладают продуценты карбапенемаз OXA-48-типа, доля которых существенно больше доли продуцентов NDM, в то время как последние являются доминирующими в Санкт-Петербурге. Доля моно-продуцентов KPC также занимает собственную нишу.

Несмотря на несовершенство системы статистического учета, по данным мониторинга CRKp в стационарах Санкт-Петербурга Медицинского информационно-аналитического центра, в 2016 г. доля продуцентов карбапенемаз составляла около 9,2% [78], в течение следующих двух лет этот

показатель увеличился вдвое (2017 – 19,5%, 2018 – 36,9%). За 10 лет с момента первого описания продуцентов карбапенемаз в Санкт-Петербурге уровень их распространения в стационарах уже достиг почти 40% [6].

Результаты данного исследования подтверждают более высокий уровень чувствительности к антибиотикам разных классов потенциально вирулентных изолятов при сравнении с фенотипом продуцентов карбапенемаз, а также соответствие антибиотикочувствительности последних с изолятами, имеющими сочетанный патотип. В оценке чувствительности изолятов, основную роль играет наличие генов резистентности, в частности определение типа карбапенемаз.

На основании данных WGS у изолятов изучаемой коллекции помимо различных карбапенемаз, были выявлены  $\beta$ -лактамазы с узким спектром активности, хромосомные  $\beta$ -лактамазы, БЛРС, гены резистентности к аминогликозидам, фторхинолонам, а также мутации в ферментах-мишенях фторхинолонов, гены устойчивости к макролидам, хлорамфениколу, сульфонидамидам, триметоприму, рифампицину, усечение трансмембранного белка, инактивация которого является основанием резистентности к колистину, а также обнаружены инсерции в гены мажорных поринов, которые ассоциируют с повышением резистентности к карбапенемам и другим антибиотикам. В целом прослеживается соответствие между генотипом и фенотипом исследуемой коллекции. Данные результаты ещё раз подтверждают пластичность генома нозокомиальных изолятов *K. pneumoniae*.

При оценке результатов можно сделать вывод о низкой эффективности цефалоспоринов III-IV поколений, карбапенемов, хинолонов, триметоприма/сульфаметоксазола в отношении исследуемой коллекции изолятов *K. pneumoniae*. Относительно эффективными остается меропенем в отношении изолятов с МПК  $\leq 8$  мкг/мл, аминогликозиды в отношении изолятов с МПК  $\leq 8$  мкг/мл для амикацина, 2 мкг/мл для гентамицина, полимиксины, тигециклин. Принципиальным в определении эффективности комбинации цефтазидима-авибактама является дифференцирование продуцентов СБЛ от

МБЛ. Для этиотропной терапии инфекций, вызванных карбапенем-устойчивыми патогенами, применение азтреонама-авибактама или, в клиническом исполнении, цефтазидима-авибактама в сочетании с азтреонамом также представляется перспективным. В дополнение, на смену приходит новый зарегистрированный в России в 2021 г. карбапенемный антибиотик биапенем. Теоретически, ограничение использования  $\beta$ -лактамов в терапии могло бы привести к снижению уровня резистентности к ним. Однако  $\beta$ -лактамные антибиотики являются основной группой антибактериальных препаратов, используемых в стационарах, следствием чего оказывается потенцирование экспрессии генов устойчивости в результате постоянного селективного прессинга.

С тех пор, как первый NDM с Индийским происхождением был описан в 2009 году, до момента написания работы было идентифицировано 28 вариантов МБЛ NDM-типа. Молекулярный анализ, представленный в настоящем исследовании, выявил новый вариант МБЛ NDM-типа, NDM-29, в изоляте 1970\_kpn *K. pneumoniae*, выделенном в апреле 2018 года из мочи мужчины в специализированном стационаре Санкт-Петербурга. На основании данных WGS была определена локализация  $bla_{NDM-29}$  в составе Tn125-подобного транспозона, который в свою очередь располагался на гибридной плазмиде размером 311 Кб,  $phvKpST147_{NDM-29}$ . Новый фермент отличается от наиболее близкого по аминокислотной последовательности фермента, NDM-1, одной аминокислотной заменой (D130N). Она локализуется вне активного центра фермента, несмотря на её близкое расположение, а также не является аминокислотным остатком, который связывается с ионами цинка (His120, His122, His189, His250, Cys208 и Asp124) [46].

Несмотря на то, что по результатам, полученным в данной работе, по сравнению с NDM-1, аминокислотная замена D130N не давала существенных эволюционных преимуществ NDM-29, у других ферментов, несущих данную замену, описано повышение резистентности к карбапенемам и нечувствительность к дефициту цинка [19]. Аминокислотная замена D130N

предполагает формирование отдельной ветви в эволюции ферментов NDM, которая, как правило, направлена на повышение устойчивости к антимикробным препаратам. С другой стороны, эволюционные пути могут не приводить к образованию резистентных линий ферментов, а вместо этого быть результатом случайной мутации. В таком случае нельзя точно определить, была ли мутация в 130 положении этапом эволюционного процесса или независимым событием.

#### **4.2. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика вирулентности изолятов *K. pneumoniae***

У всех изолятов изучаемой коллекции обнаружены гены, кодирующие сидерофоры энтеробактины, фимбрии 1 и 3 типа, предполагаемый фимбриальный шаперон и токсин внешней мембраны клетки OmpA. При этом большинство изолятов коллекции несли сидерофоры аэробактины, ICEKp-ассоциированные гены иерсиниобактина, и гены устойчивости к теллуриту. В дополнение, у 32%-40% коллекции был выявлен метаболический транспортер (*peg-344*), гены регуляторов мукоидного фенотипа. При этом *rmpA2* в большинстве случаев присутствовал в нефункциональной (усечённой) форме.

По результатам исследования было выявлено отсутствие взаимосвязи между гипермукоидным фенотипом и наличием генов аэробактина (*iucA*), а также положительный стринг-тест не являлся достоверным признаком в отношении наличия функционирующих генов регуляторов мукоидного фенотипа в коллекции изолятов *K. pneumoniae*.

Изолят, несущий наибольший набор основных детерминант вирулентности, включая сальмохелин, считающийся истинно вирулентным на основании оценок резистентности и вирулентности, *in vivo* проявлял средний уровень вирулентности. Другие изоляты различных генетических линий, кодирующие меньший набор детерминант вирулентности различного состава, включая гены биосинтеза аэробактина, иерсиниобактина, регулятора мукоидного фенотипа, проявляли переменную вирулентность (от  $10^2$ - $10^7$  КОЕ). Результаты, полученные в данном исследовании, не подтверждают

гипотезу об увеличении уровня вирулентности *in vivo* с увеличением количества основных детерминант вирулентности [77]. Несоответствие набора генов вирулентности и фактического значения в септической модели, поднимает вопрос о корректности маркеров, предложенных Russo T.A. и соавт. в 2018 году [128]. Возможной причиной является использование небольшой коллекции филогенетических групп клебсиелл с ярко выраженными признаками hv, а также проявление гипервирулентности различной степени у разных генетических линий. Вследствие чего, на сегодняшний день нельзя точно определить факторы влияющие на эффективность реализации вирулентности.

По результатам сравнения данных, полученных после полногеномного секвенирования и результатам ПЦР на ген биосинтеза аэробактина и трёх основных карбапенемаз, можно сделать вывод об эффективности используемых систем ПЦР детекции.

Глобальное распространение признаков, ассоциированных с гипервирулентным патотипом также подтверждается картированием генома ( $\geq 50\%$  покрытия) у 78% изолятов коллекции *K. pneumoniae* на каноническую вирулентную плазмиду pLVPK. Картирование крупных гибридных плазмид в среднем на 52% длины канонической вирулентной плазмиды pLVPK иллюстрирует их гибридную структуру.

#### 4.3. Особенности эпидемиологии CR-hvKp

Среди изучаемой коллекции изолятов наблюдается 19 генетических линий, как правило, соответствующих капсульным типам. Популяция *K. pneumoniae*, циркулирующая на большой географической территории России, от Мурманска до Хабаровска, характеризуется ярко выраженной гетерогенностью. Это объясняется консервативностью ядерного генома *K. pneumoniae*, вследствие чего эволюция происходит за счёт простых нуклеотидных замен и, реже, рекомбинационных событий. Россия территориально находится между Европой и Азией, на основании чего среди всех генетических линий наблюдаются международные клоны высокого риска,

такие как европейские линии, ассоциированные с MDR фенотипом (ST395, 147, 307, 15), и азиатские линии (ST23, 11). Гетерогенность коллекции проиллюстрирована широким разнообразием генетических линий, а также серотипов, циркулирующих в различных регионах России. Доминирующим серотипом являлся KL2/O1, который ассоциируют с hvKp. С одной стороны регистрируется увеличение разнообразия генетических линий. С другой, среди широкого спектра линий не было выявлено ST258 и 340, с которыми связано массовое распространение в Санкт-Петербурге продуцентов KPC и NDM соответственно, в связи с чем предполагается вытеснение сиквенс типов, циркулирующих в начале прошлого десятилетия, новыми.

Среди популяции *K. pneumoniae* выявлено широкое распространение как генов резистентности среди азиатских генетических линий, так и основных генов вирулентности, которые описаны Russo T.A. и соавт. [128] в 2018 году в качестве маркеров, с высокой специфичностью связанных с гипервирулентным патотипом, у генетических линий, для которых характерен исключительно MDR фенотип. Превалирующей группой изучаемой коллекции являются карбапенем продуцирующие изоляты, несущие гены биосинтеза аэробактина и иерсиниобакина. В частности, преобладали ST395/KL2 продуценты NDM, ST395/KL39 продуценты OXA-48.

Распространение маркеров гипервирулентности среди CRKp, циркулирующих в России (81%), в 9 раз превышает распространение в Швейцарии (9%) [51], и сравнимо с распространением во время вспышки в Италии (94%) [96] и Германии (84%) [54].

В связи с тем, что основные факторы вирулентности, обуславливающие гипервирулентный патотип, кодируются генами, локализованными на плазмидах, выявление, идентификация и анализ генетического разнообразия МГЭ является необходимым условием для сдерживания этих возникающих угроз. Характеристика плазмидных репликонов основывается на группах несовместимости. Среди коллекции изолятов *K.pneumoniae* к наиболее распространенным репликонам относились IncFIB(K), IncFIB(Mar),

IncFIB(pQil), IncHI1B, IncFII-pKP91, IncR, ассоциированные с плазмидами, несущими детерминанты вирулентности, по литературе [152]. Так, pK2044-подобная каноническая плазида (KPVP-1), несущая детерминанты вирулентности, почти всегда содержит репликон IncFIB(K). Фактически, плазида IncFIB(K) широко распространена среди изолятов *Klebsiella* spp., и обнаружено, что большинство плазмид IncFIB(K) несут гены резистентности [14]. Однако по результатам данного исследования чёткая корреляция генов карбапенемаз и маркеров биосинтеза аэробактина и иерсиниобаكتина с конкретными типами плазмид не обнаружена. Другим важным выводом является присутствие почти у каждого изолята (81%), несущего основные детерминанты вирулентности, репликона IncFIB, включая IncFIB(K), IncFIB(Mar) и IncFIB(pQil), IncFIB(pKPHS1). Данный факт предполагает, вероятно, решающую роль репликона IncFIB, в формировании и репликации плазмиды с маркерами вирулентности.

На основании работы [143] большинство изолятов из базы данных NCBI, согласующихся с характеристикой CR-hvKp (локус аэробактина, сальмохелина, гены карбапенемаз), относились к кластеру С. К данному кластеру также относили большинство изолятов генетических линий 395 и 147, выделенных в России. Среди репликонов плазмид кластера С, несущих локус аэробактина, выявляли плазмиды типа IncFIB(pNDM-Mar)+IncHI1B(pNDM-MAR), а также плазмиды, несущие один тип репликона IncHI1B(pNDM-MAR).

В исследовании [143] была проанализирована историческая коллекция изолятов Мюррея, собранная в период между 1920 и 1949 годами. В результате обнаружено, что плазмидные репликоны IncFIB(K), IncFII\_1\_pKP91 и IncHI1B(pNDM-MAR), которые встречались как минимум одинажды в коллекции прошлого века, были обнаружены у более чем 240 изолятов секвенированной коллекции *K. pneumoniae*. Таким образом, совпадающие типы плазмид, выявленные как в современной, так и в исторической коллекциях *K. pneumoniae* говорят о стабильной циркуляции данных типов плазмид, а также низкой скорости мутаций в последовательностях репликона.

Учитывая широко распространенную множественную лекарственную устойчивость, различные типы плазмид ассоциировались с различными генами резистентности. Однако, в соответствии с литературой [143], на данной коллекции отмечалось закономерное наличие *bla*<sub>NDM-1</sub> репликациями типа IncA/C, а также известная связь *bla*<sub>OXA-48</sub> с IncL/M, и *bla*<sub>OXA-232</sub> – с ColKP3.

#### 4.4. Гибридные плазмиды CR-hvKp

Анализ гибридных сборок 9 стринг-тест положительных и NDM-продуцирующих изолятов CR-hvKp (один из них не продуцировал NDM), показал, что все изоляты содержали крупные гибридные плазмиды одновременно несущие гены карбапенемаз и hv. Плазмиды, несущие детерминанты вирулентности, обычно локализуют несколько репликонов [152], что согласуется с обнаружением 2 типов гибридных плазмид, содержащих мультирепликоны: IncFIB(Mar)/IncHI1B и IncFIB(Mar)/IncHI1B/IncR. Гибридные плазмиды анализируемых изолятов, помимо ключевых детерминант вирулентности и устойчивости к нескольким классам антибиотиков, содержали гены, кодирующие белки конъюгативного переноса. К высоко идентичным плаздам из глобальной базы данных относились гибридные плазмиды IncFIB(Mar) /IncHI1B из Великобритании и Чешской Республики.

Крупные плазмиды с низким числом копий подвергаются риску элиминации во время клеточного деления из-за высокой биологической цены сопротивления, которая возникает при их приобретении. Для стабильного наследования, а также эффективного горизонтального переноса подобных МГЭ клетка кодируют механизмы поддержания плазмид. Помимо типов несовместимости к ним относятся, во-первых, ТА-системы, имеющие широкое распространение среди коллекции *K. pneumoniae*. ТА система II типа – VarBC обнаруживалась на всех гибридных плаздах. Она играет важную роль в патогенезе бактерий [66], что согласуется с функцией ТА-систем в поддержании плазмид посредством постсегрегационного киллинга. Токсин VarC, содержащий на N-конце (домен PIN) белок PilT необходимый для сокращения пилей, действует как рибонуклеаза, расщепляющая молекулы РНК,



тем самым снижая скорость трансляции. Ген *varB* кодирует соответствующий антитоксин. В свою очередь, токсин HigB представляет собой мРНК-эндорибонуклеазу, которая ингибирует пролиферацию клеток, тогда как антитоксин HigA возобновляет клеточный рост.

Во-вторых, к механизмам поддержания плазмид относятся система CRISPR-cas. Плазмидные системы CRISPR-Cas предотвращают приобретение дополнительных плазмид за счет кодирования специфических спейсеров, тем самым снижая общий генетический груз для бактерии-хозяина. Локус CRISPR, не примыкающий к генам *cas*, был обнаружен на гибридных плазмидах коллекции. Данная функция поддержания иллюстрируется наличием спейсера, соответствующего гену *traL* конъюгативной плазмиды IncF *K. pneumoniae*. Большинство плазмид, которые несут спейсеры идентичные фрагментам плазмид, представляют собой плазмиды с мультирепликоном IncFIB/IncHI1B [65]. Таким образом, вероятная роль системы CRISPR-Cas на гибридных плазмидах заключается не только в предотвращении проникновения чужеродных плазмид в клетку, но также в опосредовании гомологичной рекомбинации, которая приводит к объединению детерминант резистентности и вирулентности на одном векторе [65]. Изолированные CRISPR-локусы представляют интерес как с функциональной, так и с эволюционной точек зрения. На основании одного из эволюционных путей изолированных CRISPR локусов [138] можно предположить утрату *cas* генов на гибридных плазмидах. Так, наблюдается высокая идентичность повторяющихся последовательностей CRISPR-Cas близкородственных геномов. В дополнение, прослеживается отсутствие МГЭ в генетическом окружении локусов. Остается дискуссионным вопрос, является ли изолированный CRISPR локус функциональным. Однако известно, что он может использовать адаптационные и эффекторные модули полных систем CRISPR-Cas того же генома. Кроме того необходим более детальный анализ изолятов с изолированными CRISPR-локусами, не распознающими плазмиды IncF-типа как чужеродную ДНК.

В-третьих, системы РМ вносят вклад в стабильность плазмид. Метилтрансфераза, кодируемая плазмидой, модифицирует ДНК хозяина и, таким образом, предотвращает ее от расщепления эндонуклеазой рестрикции. Потеря плазмиды влечет за собой появление неметилированных участков в хромосоме, внесение в эти участки двухцепочечных разрывов эндонуклеазой и последующую деградацию во время роста клеток. Гибридные плазмиды всех изолятов, кроме 2024\_kpn, несли ДНК-цитозинметилтрансферазу.

Среди проанализированной коллекции, у одного пациента наблюдался эндофтальмит, что является типичной клинической картиной для инфекции, вызванной hvKp. Выделенный изолят CR-hvKp нёс гибридную плазмиду с маркерами резистентности и вирулентности, характеризовался высокой летальной дозой *in vivo*  $10^3$  КОЕ, имел K2 капсульный тип, и являлся продуцентом NDM-1.

#### **4.5. Распространение и механизм возникновения гибридных плазмид *K. pneumoniae***

Распространение описанных гибридных плазмид обусловлено наличием генов, отвечающих за конъюгативный перенос. Таким образом, проанализированные изоляты CR-hvKp относились к 5 различным генетическим линиям и были обнаружены на разных географических территориях, что свидетельствует о конвергенции генов устойчивости и вирулентности в составе трансмиссивных плазмид. Плазмиды с мозаичной структурой, объединяющие патотипы устойчивости к антибиотикам и гипервирулентности в одном векторе, являются кратчайшим путем, ведущим к эволюционному успеху этих супербактерий.

Несмотря на высокую идентичность проанализированных гибридных плазмид, для каждой генетической линии *K. pneumoniae* был характерен определенный мобилом. Данный факт указывает на IS-опосредованную передачу МГЭ, которая приводит к формированию посредством рекомбинации подобных гибридных плазмид с высокой генетической пластичностью. Данные, полученные в этой работе, продемонстрировали, что гибридные плазмиды

возникли в результате приобретения локуса с детерминантами гипервирулентности плазмидой с детерминантами резистентности.

Подобный механизм формирования гибридной плазмиды, несущей детерминанты вирулентности и резистентности был показан в работе, где наблюдалась передача вирулентных плазмид путем образования коинтеграта с конъюгативной плазмидой у *K. variicola*. Авторами была идентифицирована конъюгативная плазида, несущая детерминанты вирулентности (280 Кб), которая образовалась путем интеграции фрагмента 100 Кб плазмиды pLVPK в конъюгативную плазмиду IncFIB [171].

Более того, вызывает беспокойство формирование новых генетических линий CR-hv других видов на основе клебсиелльных плазмид, в частности описанный нами случай вероятного приобретения *E. coli* гибридной плазмиды от *K. pneumoniae* и появление стабильных клинических линий.

## Заключение

На сегодняшний день наблюдается рост числа конвергентных изолятов *K. pneumoniae*, несущих гибридные плазмиды, кодирующие одновременно детерминанты устойчивости к карбапенемам и hv, что является серьезной проблемой для здравоохранения. Тем не менее не всё, что обладает признаками конвергентного патотипа, демонстрирует таковой в септической модели на мышцах. Фенотипическое проявление конвергентных линий представлено различными вариантами выраженности как вирулентности, так и микробной резистентности. Истинно конвергентные изоляты могут вызывать инфекции, трудно поддающиеся лечению у здоровых людей, с высоким уровнем летальности.

Распространение CR-hvKp на большой территории Российской Федерации связано с гетерогенностью популяции *K. pneumoniae*, а также различными механизмами формирования конвергентного патотипа. Раньше для большинства генетических линий наблюдалось поддержание специфических плазмид, перемежающееся неизбежными рекомбинациями и/или делециями генов, на протяжении десятилетий клональной экспансии. Однако у данной коллекции наблюдается распространение различных типов репликонов среди гетерогенной популяции *K. pneumoniae* с вариациями плазмидного состава внутри одной генетической линии. Вследствие чего можно говорить о том, что распространение плазмид, несущих детерминанты резистентности и вирулентности, вероятно, преобладает над клональным распространением. На основе спектра эволюционных линий *K. pneumoniae*, локализирующих гибридные плазмиды, можно сделать вывод об осуществлении параллельных процессов формирования CR-hvKp. Обнаружение структурно сходных плазмид в географически удаленных регионах позволяет предположить, что фактическое распространение гибридных плазмид, несущих гены вирулентности и устойчивости, намного шире, чем предполагалось.

Вопрос о причинах расширения географических ниш вместе с увеличением разнообразия клональных групп *K. pneumoniae*, несущих

гибридные плазмиды, остаётся открытым. Вероятным сценарием распространения плазмиды является её обмен среди локально циркулирующих генетических линий или вытеснение ST, имеющих широкое распространение в предыдущее десятилетие, новыми линиями. Тем не менее первичным фактором широкой циркуляции крупных плазмид с детерминантами резистентности и вирулентности стал упущенный момент импорта на территорию России. В связи с чем, крайне важно отслеживать распространение гибридных плазмид и проводить мониторинг их эпидемиологии. При осуществлении только общих сравнений геномов случаи передачи плазмид могут остаться незамеченными, вследствие быстрых эволюционных перестроек свойственным этим генетическим конструкциям.

Несмотря на выявление высоковирулентных клебсиелл, на сегодняшний день нет чёткой корреляции между маркерами вирулентности и проявлением гипервирулентного фенотипа. Определение комбинации генетических детерминант, влияющей на способность клетки вызывать бурную инфекцию, характерную для hvKp является приоритетной задачей. Для её решения необходимо установление соответствия между клиническими, микробиологическими и молекулярно-генетическими особенностями инфекций, вызванных истинно конвергентными изолятами *K. pneumoniae*. Возможность определения набора генетических маркеров, для дифференциации клебсиелл проявляющих высокую вирулентность во многом зависит от кооперации клиники и лаборатории.

## Выводы

1. На территории Российской Федерации выявлено распространение генетических линий *K. pneumoniae*, проявляющих одновременно свойства гипервирулентности и множественной антимикробной резистентности (конвергентный патотип). Более половины изученных изолятов относятся к генетической линии ST395, которая включает две сублинии с различными капсульным серотипами: KL2 и KL39. Для сублинии KL2 характерно наличие генов *bla*<sub>NDM</sub>-типа, а для сублинии KL39 – *bla*<sub>OXA-48</sub>-типа.

2. У 78% изолятов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы, выявлены маркеры вирулентности, ассоциированные с фрагментом, составляющим более 50% от длины канонической вирулентной плазмиды pLVPK.

3. Анализ полных геномов репрезентативных изолятов *K. pneumoniae* отдельных генетических линий ST395, ST147, ST15, ST874 показал распространение близких по нуклеотидной последовательности гибридных плазмид, на которых одновременно локализованы гены карбапенемаз и гены вирулентности.

4. Гибридные плазмиды несут локусы CRISPR, не примыкающие к генам *cas*; токсин-антитоксиновые системы II типа – *VarBC*; и системы рестрикции-модификации – ДНК-цитозинметилтрансфераза, что может способствовать их поддержанию и распространению.

## Практические рекомендации

В стационарах необходимо проводить мониторинг инвазивных форм клебсиеллёзных инфекций, а также внутрибольничной среды в помещениях, где оказывается помощь пациентам с инвазивными инфекциями. Практическим микробиологическим лабораториям целесообразно внедрять стринг-тест как фенотипический маркер для подтверждения гипервирулентного патотипа *K. pneumoniae*. При положительном стринг-тесте следует проводить молекулярную детекцию основных генов резистентности и вирулентности.

В лабораторной практике для выявления генов карбапенемаз рекомендовано проведение ПЦР на три гена *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*.

В процессе эпидемиологического надзора по распространению CR-hvKp целесообразно проводить анализ плазмидного состава с углубленным изучением репликонов плазмид, который может служить основой для разработки мер по сдерживанию распространения клонов высокого риска.

Для оценки эпидемиологической ситуации и обоснования мероприятий по своевременному сдерживанию распространения *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа в медицинских учреждениях рекомендовано выявлять, с одной стороны, клинические особенности характерные для hvKp (первичный абсцесс печени, абсцессы головного мозга, другие абсцессы любой локализации, бактериемия с множественными очагами инфекции), с другой – проводить скрининг на бессимптомное носительство CR-hvKp (выявление гипермукоидного фенотипа, карбапенемаз, маркеров hv). Своевременная изоляция пациентов, дезинфекции медицинского персонала, контактирующего с носителями, дезинфекции боксов также будут способствовать сдерживанию распространения *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа.

## Список используемых сокращений и обозначений

АМК – Amikacin (Амикацин)

АТСС – American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур)

AZT/AVI – Aztreonam-avibactam (Азтреонам-авибактам)

CAESAR – Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (Сеть эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам в Центральной Азии и Европе)

CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database (База данных генов устойчивости к антибиотикам)

CAZ – Ceftazidime (Цефтазидим)

CAZ/AVI – Ceftazidime-avibactam (Цефтазидима-авибактам)

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Центр по контролю и профилактике заболеваний)

CG – Clonal group (Клональная группа)

CHINET – China antimicrobial surveillance network (Китайская сеть наблюдения за противомикробными препаратами)

cKp – Classical *K. pneumoniae* (Классические *K. pneumoniae*)

CLSI – Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute)

cps – Capsule synthesis loci (Локус синтеза полисахаридной капсулы)

CR-hvKp – Carbapenem-resistant hypervirulent *K. pneumoniae* (Карбапенем-устойчивая гипервирулентная *K. pneumoniae*)

CRISPR – Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)

CRKp – Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Карбапенем-устойчивая *K. pneumoniae*)

СТА – Cefotaxime (Цефотаксим)



EARS-Net – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Европейская сеть эпиднадзора за устойчивостью к противомикробным препаратам)

ESKAPE – бактерии, чаще всего развивающих устойчивость к антибиотикам: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, и *Enterobacter* spp.

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA – Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)

FOS – Fosfomycin (Фосфомицин)

GEN – Gentamicin (Гентамицин)

hv – Hypervirulent (Гипервирулентный)

hvKp – Hypervirulent *K. pneumoniae* (Гипервирулентная *K. pneumoniae*)

I – Susceptible, increased exposure (Чувствительный при увеличенной экспозиции)

ICE – Integrative conjugative element (Интегративно-конъюгативный элемент)

IDSA – Infectious Diseases Society of America (Американского общества инфекционных болезней)

IME – Integrative mobilizable element (Интегративно-мобилизуемый элемент)

IMI – Imipenem (Имипенем)

Inc – Incompatibility type (Тип несовместимости)

KL – Capsule locus (Капсульный локус)

KPC – *K. pneumoniae* carbapenemase (Карбапенемаза *K. pneumoniae*)

LB – Lysogeny broth (Лизогенный бульон)

LD<sub>50</sub> – Median lethal dose (Полулетальная доза)

MDR – Multidrugresistant (Множественнорезистентный)

MDR-CG – Multidrugresistant clonal group (Множественнорезистентные клональные группы)

MDR-hvKp – Multidrugresistant hypervirulent *K. pneumoniae* (Множественнорезистентная гипервирулентная *K. pneumoniae*)

MDR-Kp – Multidrugresistant *K. pneumoniae* (Множественнорезистентная *K. pneumoniae*)

MER – Meropenem (Меропенем)

NCBI – National Center for Biotechnology Information (Национального центра биотехнологической информации)

NDM – New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (Нью-Дели металло- $\beta$ -лактамаза)

NTE – non-Tn4401 genetic element (мобильные элементы, отличные от Tn4401)

OXA – Oxacillinase (Оксацилиназа)

ONT – Oxford Nanopore Technologies

PB – Polymyxin B (Полимиксин В)

R – Resistant (Резистентный)

S – Susceptible (Чувствительный)

SARS-CoV-2 – Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (Коронавирусная инфекция COVID-19)

SDS – Sodium dodecyl sulfate (Додецилсульфат натрия)

SNP – Single nucleotide polymorphism

ST – Sequence type (Сиквенс-тип)

SxT – Trimethoprim-sulfamethoxazole (Триметоприм/сульфатомексазол)

T4SS – Type IV secretion systems (Системы секреции IV типа)

T6SS – Type VI secretion systems (Система секреции VI типа)

TGC – Tigecycline (Тигециклин)

WGS – Whole genome sequencing (Полногеномное секвенирование)

XDR – Extensively drug-resistant (Экстремально резистентные)

БАЛ – Бронхоальвеолярный лаваж

БЛРС –  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ДМСО – Диметилсульфоксид

ЛПС – Липополисахарид

МБЛ – Металло- $\beta$ -лактамазы

МГЭ – Мобильный генетический элемент

МЛСТ – Мультилокусное секвенирование-типирование (Multilocus Sequence Typing)

МПК – Минимальная ингибирующая концентрация

НАГ – N-ацетилглюкозаминовая кислота

НАМ – N-ацетилмураминовая кислота

ОРИТ отделение реанимации и интенсивной терапии

ПСБ – Пенициллин-связывающий белок

ПЦР – Полимеразная цепная реакция

РМ – Системы рестрикции-модификации

СБЛ – Сериновые- $\beta$ -лактамазы

ТА – Токсин-антитоксиновая система

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2797025

**Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемый в качестве тест-культуры при детекции гена NDM методом полимеразной цепной реакции для точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиелёзных инфекций**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное учреждение "Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства" (RU)*

Авторы: *Чулкова Полина Сергеевна (RU), Агеевец Ирина Владимировна (RU), Авдеева Алиса Александровна (RU), Сулян Офелия Спартаковна (RU), Лихолетова Дарья Вадимовна (RU), Агеевец Владимир Андреевич (RU), Лебедева Мария Сергеевна (RU), Гостев Владимир Валерьевич (RU), Сопова Юлия Викторовна (RU), Сидоренко Сергей Владимирович (RU)*

Заявка № 2022120911

Приоритет изобретения **29 июля 2022 г.**

Дата государственной регистрации  
в Государственном реестре изобретений  
Российской Федерации **30 мая 2023 г.**

Срок действия исключительного права  
на изобретение истекает **29 июля 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*Ю.С. Зубов*



## Выписка из протокола № 150

Заседания Локального Этического Комитета  
Федерального государственного бюджетного учреждения «Детский научно-клинический  
центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства» России  
от «04» октября 2021 года

Заседание состоялось в зале Ученого Совета института. Время проведения 11.00

Председатель - Скрипченко Н.В. - зам. директора по научной работе ФГБУ ДНКЦИБ  
ФМБА России, д.м.н., профессор

Секретарь –Голева О.В. - с.н.с. НИО вирусологии и молекулярно-биологических методов  
исследования ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.б.н.

Зам. председателя - Фридман И.В. - с.н.с. НИО вакцинопрофилактики и поствакцинальной  
патологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, к.м.н.

Члены комитета:

Гузева В.И. - д.м.н. профессор ГОУ ДПО СПб ГПМА

Карасев В.В. - зам. главного врача по лечебной работе ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России,  
к.м.н.

Константинова Ю.Е. - м.н.с. НИО вакцинопрофилактики и поствакцинальной патологии  
ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России

Бурдина С.А. – юристконсульт ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России

Мухин П.А.- протоиерей, настоятель Смольного собора.

### Повестка дня:

1. Принять к рассмотрению и провести этическую экспертизу диссертационной работы очного аспиранта научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Чулковой П.С. на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика конвергентных гипервирулентных и карбапенем устойчивых *K. pneumoniae*», представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности–микробиология.

**СЛУШАЛИ:**

**ПО ПЕРВОМУ ВОПРОСУ:**

Слушали Скрипченко Н.В. с информацией об актуальности планируемого исследования, цели, задачах, объекте и методах исследования. Комиссией изучены поданные на рассмотрение документы, обсуждены этические правила и нормы при работе с пациентами и заборе биологического материала. Предполагается определить фенотипические и молекулярно-генетические характеристики, а также данные о распространении конвергентных фенотипов *K. Pneumoniae* в стационарах Санкт-Петербурга. Будет собрана коллекция изолятов *K. Pneumonia*, проведена оценка антибиотикочувствительности, детекция генов карбапенемаз, полногеномное секвенирование штаммов. Работа планируется к выполнению на период с 2021 по 2024 год.

**Прилагаемые документы:**

1. Протокол исследования
2. Аннотация НИР
3. Форма добровольного информированного согласия

**Постановили:** одобрить выполнение диссертационной работы очного аспиранта научно-исследовательского отдела медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России Чулковой П.С. на тему: «Молекулярно-генетическая характеристика конвергентных гипервирулентных и карбапенем устойчивых *K. pneumoniae*», представляемую на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности–микробиология.

Голосовали «за» - единогласно.

Председатель ЛЭК



Н.В. Скрипченко

Секретарь ЛЭК



О.В. Голева

## Список использованной литературы

1. Агеевец В. А. Молекулярная характеристика продуцентов карбапенемаз семейства Enterobacteriaceae, выделенных в Санкт-Петербурге: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Агеевец В. А. – М., 2016. – С. 137.
2. Агеевец В. А. Первое обнаружение металло-бета-лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре в России / Агеевец В. А., Партина И. В., Лисицына Е. С., [и др.] // Медицинский академический журнал. – 2012. – Т. 12. – С. 43-45.
3. Гончаров А. Е. Характеристика гипервирулентных мультиантибиотикорезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* у стационарных пациентов с тяжелым течением COVID-19 / Гончаров А. Е., Азаров Д. В., Мохов А. С., [и др.] // Инфекционные болезни. – 2022. – Т. 20. – С. 33-40.
4. Лев А. И. Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03 / Лев А. И. – М., 2018. – С. 182.
5. Решедько Г. К. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России / Решедько Г. К., Рябкова Е. Л., Кречикова О. И., [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2008. – Т. 10. – С. 96-112.
6. Сидоренко С. "Klebsiella pneumoniae: растущая угроза общественному здоровью" (2021, Санкт-Петербург). Российско-Китайский Конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XXIV Кашкинские чтения), 9-11 июня 2021 г. – 2021. – С. 40.
7. Бактериальный и вирусный биоинформатический ресурсный центр BV-BRC [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.patricbrc.org/>
8. Инструмент для выявления коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами CRISPRFinder [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/>

9. Инструмент поиска основного локального выравнивания BLAST [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
10. Скрипт для выполнения нуклеотидного выравнивания Riddikulus [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://github.com/dariader/Riddikulus>
11. Acman M. Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene bla<sub>NDM</sub> / M. Acman, R. Wang, L. van Dorp, [et al.] // *Nat Commun.* – 2022. – V. 13, № 1. – P. 1-13.
12. Ageevets V. A. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia / V. A. Ageevets, I. V. Partina, E. S. Lisitsyna, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2014. – V. 44, № 2. – P. 152-155.
13. Ageevets V. A. Comparative Activity of Carbapenem Antibiotics Against Gram-Negative Carbapenemase Producers of Different Groups / V. A. Ageevets, O. S. Sulian, A. A. Avdeeva, [et al.] // *Antibiotic and chemotherapy.* – 2022. – V. 67, № 1-2. – P. 9-15.
14. Agyepong N. Genomic characterization of multidrug-resistant ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Ghanaian teaching hospital / N. Agyepong, U. Govinden, A. Owusu-Ofori, [et al.] // *Int J Infect Dis.* – 2019. – V. 85. – P. 117-123.
15. Ahmed M. Emergence of Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Coharboring a bla(NDM-1)-Carrying Virulent Plasmid and a bla(KPC-2)-Carrying Plasmid in an Egyptian Hospital / M. Ahmed, Y. Yang, Y. Yang, [et al.] // *mSphere.* – 2021. – V. 6, № 3. – P. 1-6.
16. Alikhan N. F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons / N. F. Alikhan, N. K. Petty, N. L. Ben Zakour, S. A. Beatson // *BMC Genomics.* – 2011. – V. 12. – P. 1-10.
17. Aminov R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future / R. I. Aminov // *Front Microbiol.* – 2010. – V. 1. – P. 134.
18. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis / Antimicrobial Resistance Collaborators // *Lancet.* – 2022. – V. 399, № 10325. – P. 629-655.



19. Bahr G. Clinical Evolution of New Delhi Metallo-beta-Lactamase (NDM) Optimizes Resistance under Zn(II) Deprivation / G. Bahr, L. Vitor-Horen, C. R. Bethel, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2018. – V. 62, № 1. – P. 1-10.
20. Bankevich A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, [et al.] // *J Comput Biol.* – 2012. – V. 19, № 5. – P. 455-477.
21. Barbosa V. A. A. Insights into *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system transcriptional regulation / V. A. A. Barbosa, L. M. S. Lery // *BMC Genomics.* – 2019. – V. 20, № 1. – P. 1-12.
22. Bernardini A. The intrinsic resistome of *Klebsiella pneumoniae* / A. Bernardini, T. Cuesta, A. Tomas, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2019. – V. 53, № 1. – P. 29-33.
23. Bush K. Interplay between  $\beta$ -lactamases and new  $\beta$ -lactamase inhibitors / K. Bush, P. A. Bradford // *Nat Rev Microbiol.* – 2019. – V. 17, № 5. – P. 295-306.
24. CDC. Tracking CRE in the United States [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/trackingcre.html>
25. Choby J. E. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives / J. E. Choby, J. Howard-Anderson, D. S. Weiss // *J Intern Med.* – 2020. – V. 287, № 3. – P. 283-300.
26. Chudejova K. Genetic Plurality of OXA/NDM-Encoding Features Characterized From Enterobacterales Recovered From Czech Hospitals / K. Chudejova, L. Kraftova, V. Mattioni Marchetti, [et al.] // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 1-9.
27. Croucher N. J. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins / N. J. Croucher, A. J. Page, T. R. Connor, [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43, № 3. – P. e15.
28. Cubero M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 clinical isolates form robust biofilms at the air-liquid interface / M. Cubero, S. Marti, M. A. Dominguez, [et al.] // *PLoS One.* – 2019. – V. 14, № 9. – P. 1-11.
29. Di Pilato V. Resistome and virulome accretion in an NDM-1-producing ST147 sublineage of *Klebsiella pneumoniae* associated with an outbreak in Tuscany, Italy: a

- genotypic and phenotypic characterisation / V. Di Pilato, L. Henrici De Angelis, N. Aiezza, [et al.] // *Lancet Microbe*. – 2022. – V. 3, № 3. – P. e224-e234.
30. Dong D. Characterization of a NDM-1- Encoding Plasmid pHFK418-NDM From a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Harboring Two Novel Transposons, Tn6624 and Tn6625 / D. Dong, M. Li, Z. Liu, [et al.] // *Front Microbiol*. – 2019. – V. 10. – P. 1-10.
31. Dong N. Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / N. Dong, D. Lin, R. Zhang, [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2018. – V. 73, № 12. – P. 3317-3321.
32. Dong N. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance / N. Dong, X. Yang, E. W. Chan, [et al.] // *EBioMedicine*. – 2022. – V. 79. – P. 1-11.
33. Dortet L. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria / L. Dortet, L. Poirel, P. Nordmann // *Biomed Res Int*. – 2014. – V. 2014. – P. 1-12.
34. Du F. L. Prevalence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Co-Harboring blaKPC-Carrying Plasmid and pLVPK-Like Virulence Plasmid in Bloodstream Infections / F. L. Du, Q. S. Huang, D. D. Wei, [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2020. – V. 10. – P. 1-8.
35. Dulyayangkul P. Mutation of *kvrA* Causes OmpK35 and OmpK36 Porin Downregulation and Reduced Meropenem-Vaborbactam Susceptibility in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* / P. Dulyayangkul, W. A. K. Wan Nur Ismah, E. J. A. Douglas, M. B. Avison // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2020. – V. 64, № 7. – P. 1-8.
36. ECDC. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Emergence-of-hypervirulent-Klebsiella-pneumoniae-ST23-carrying-carbapenemase-genes.pdf>
37. Edward E. A. Whole Genome Characterization of the High-Risk Clone ST383 *Klebsiella pneumoniae* with a Simultaneous Carriage of bla(CTX-M-14) on IncL/M Plasmid and bla(CTX-M-15) on Convergent IncHI1B/IncFIB Plasmid from Egypt /

- E. A. Edward, N. M. Mohamed, A. S. Zakaria // *Microorganisms*. – 2022. – V. 10, № 6. – P. 1-16.
38. Eger E. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 420 with a Chromosomally Inserted Virulence Plasmid / E. Eger, S. E. Heiden, K. Becker, [et al.] // *Int J Mol Sci*. – 2021. – V. 22, № 17. – P. 1-14.
39. El-Badawy M. F. The First Egyptian Report Showing the Co-Existence of bla NDM-25, bla OXA-23, bla OXA-181, and bla GES-1 Among Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Clinical Isolates Genotyped by BOX-PCR / M. F. El-Badawy, S. W. El-Far, S. S. Althobaiti, [et al.] // *Infect Drug Resist*. – 2020. – V. 13. – P. 1237-1250.
40. Fajardo A. The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens / A. Fajardo, N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, [et al.] // *PLoS One*. – 2008. – V. 3, № 2. – P. 1-6.
41. Folkman L. EASE-MM: Sequence-Based Prediction of Mutation-Induced Stability Changes with Feature-Based Multiple Models / L. Folkman, B. Stantic, A. Sattar, Y. Zhou // *J Mol Biol*. – 2016. – V. 428, № 6. – P. 1394-1405.
42. Ford P. J. Evolutionary mapping of the SHV beta-lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the *Klebsiella pneumoniae* chromosome / P. J. Ford, M. B. Avison // *J Antimicrob Chemother*. – 2004. – V. 54, № 1. – P. 69-75.
43. Fung C. P. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess / C. P. Fung, Y. T. Lin, J. C. Lin, [et al.] // *Emerg Infect Dis*. – 2012. – V. 18, № 8. – P. 1322-1325.
44. GBD Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 / GBD Antimicrobial Resistance Collaborators // *Lancet*. – 2022. – V. 400, № 10369. – P. 2221-2248.
45. Gorrie C. L. Antimicrobial-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carriage and Infection in Specialized Geriatric Care Wards Linked to Acquisition in the Referring Hospital / C. L. Gorrie, M. Mirceta, R. R. Wick, [et al.] // *Clin Infect Dis*. – 2018. – V. 67, № 2. – P. 161-170.

46. Green V. L. Structure of New Delhi metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1) / V. L. Green, A. Verma, R. J. Owens, [et al.] // *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* – 2011. – V. 67, № Pt 10. – P. 1160-1164.
47. Gu D. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study / D. Gu, N. Dong, Z. Zheng, [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2018. – V. 18, № 1. – P. 37-46.
48. Guh A. Y. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013 / A. Y. Guh, S. N. Bulens, Y. Mu, [et al.] // *JAMA.* – 2015. – V. 314, № 14. – P. 1479-1487.
49. Hadano Y. String test / Y. Hadano // *BMJ Case Rep.* – 2013. – V. 2013. – P. 1.
50. Haidar G. Mutations in bla(KPC-3) That Confer Ceftazidime-Avibactam Resistance Encode Novel KPC-3 Variants That Function as Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases / G. Haidar, C. J. Clancy, R. K. Shields, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2017. – V. 61, № 5. – P. 1.
51. Hallal Ferreira Raro O. Emergence of Carbapenemase-Producing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Switzerland / O. Hallal Ferreira Raro, P. Nordmann, M. Dominguez Pino, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2023. – V. 67, № 3. – P. 1-11.
52. Hao G. Identification of The Role of O-antigen of Nonmucooid *Klebsiella pneumoniae* During Bacteriophage NJS1 Infection / G. Hao, Y. Jia, C. Yuan, [et al.] // *Preprint.* – 2020. – V. 1. – P. 1-12.
53. He F. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* / F. He, Y. Fu, Q. Chen, [et al.] // *PLoS One.* – 2015. – V. 10, № 3. – P. e0119064.
54. Heiden S. E. A *Klebsiella pneumoniae* ST307 outbreak clone from Germany demonstrates features of extensive drug resistance, hypermucoviscosity, and enhanced iron acquisition / S. E. Heiden, N. O. Hubner, J. A. Bohnert, [et al.] // *Genome Med.* – 2020. – V. 12, № 1. – P. 1-15.

55. Heinz E. Caribbean multi-centre study of *Klebsiella pneumoniae*: whole-genome sequencing, antimicrobial resistance and virulence factors / E. Heinz, R. Brindle, A. Morgan-McCalla, [et al.] // *Microb Genom.* – 2019. – V. 5, № 5. – P. 1-12.
56. Hendrickx A. P. A. BlaOXA-48-like genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands / A. P. A. Hendrickx, F. Landman, A. de Haan, [et al.] // *Microb Genom.* – 2021. – V. 7, № 5. – P. 1-14.
57. Henson S. P. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* invasive infections over a decade at Kilifi County Hospital in Kenya / S. P. Henson, C. J. Boinett, M. J. Ellington, [et al.] // *Int J Med Microbiol.* – 2017. – V. 307, № 7. – P. 422-429.
58. Holt K. E. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health / K. E. Holt, H. Wertheim, R. N. Zadoks, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2015. – V. 112, № 27. – P. E3574-3581.
59. Horesh G. SLING: a tool to search for linked genes in bacterial datasets / G. Horesh, A. Harms, C. Fino, [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46, № 21. – P. 1-10.
60. Hu X. Aspiration-related pulmonary syndromes / X. Hu, J. S. Lee, P. T. Pianosi, J. H. Ryu // *Chest.* – 2015. – V. 147, № 3. – P. 815-823.
61. Huang X. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver / X. Huang, X. Li, H. An, [et al.] // *PLoS Pathog.* – 2022. – V. 18, № 8. – P. 1-32.
62. Huy T. X. N. Overcoming *Klebsiella pneumoniae* antibiotic resistance: new insights into mechanisms and drug discovery / T. X. N. Huy // *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences.* – 2024. – V. 13, № 1. – P. 13.
63. Jana B. The secondary resistome of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* / B. Jana, A. K. Cain, W. T. Doerrler, [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – P. 1-10.
64. Jones R. N. Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum

- beta-lactamase in Europe / R. N. Jones, M. A. Pfaller, M. S. Group // *Clin Microbiol Infect.* – 2003. – V. 9, № 7. – P. 708-712.
65. Kamruzzaman M. CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae* / M. Kamruzzaman, J. R. Iredell // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 1-13.
66. Kang S. M. Structural and Functional Study of the *Klebsiella pneumoniae* VapBC Toxin-Antitoxin System, Including the Development of an Inhibitor That Activates VapC / S. M. Kang, C. Jin, D. H. Kim, [et al.] // *J Med Chem.* – 2020. – V. 63, № 22. – P. 13669-13679.
67. Khaertynov K. S. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis / K. S. Khaertynov, V. A. Anokhin, A. A. Rizvanov, [et al.] // *Front Med (Lausanne).* – 2018. – V. 5. – P. 1-9.
68. Kochan T. J. Genomic surveillance for multidrug-resistant or hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* among United States bloodstream isolates / T. J. Kochan, S. H. Nozick, R. L. Medernach, [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2022. – V. 22, № 1. – P. 1-21.
69. Kong H. Clinical and microbiological characteristics of pyogenic liver abscess in a tertiary hospital in East China / H. Kong, F. Yu, W. Zhang, X. Li // *Medicine (Baltimore).* – 2017. – V. 96, № 37. – P. e8050.
70. Ku Y. H. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance / Y. H. Ku, Y. C. Chuang, C. C. Chen, [et al.] // *Sci Rep.* – 2017. – V. 7, № 1. – P. 1-10.
71. Kuzina E. S. High-Molecular-Weight Plasmids Carrying Carbapenemase Genes bla(NDM-1), bla(KPC-2), and bla(OXA-48) Coexisting in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains of ST39 / E. S. Kuzina, A. A. Kislichkina, A. A. Sizova, [et al.] // *Microorganisms.* – 2023. – V. 11, № 2. – P. 1-16.
72. Lai Y. C. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan / Y. C. Lai, A. C. Lin, M. K. Chiang, [et al.] // *PLoS One.* – 2014. – V. 9, № 5. – P. 1-9.

73. Lam M. M. C. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex / M. M. C. Lam, R. R. Wick, S. C. Watts, [et al.] // *Nat Commun.* – 2021. – V. 12, № 1. – P. 1-16.
74. Lam M. M. C. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations / M. M. C. Lam, R. R. Wick, K. L. Wyres, [et al.] // *Microb Genom.* – 2018. – V. 4, № 9. – P. 1-14.
75. Lam M. M. C. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination / M. M. C. Lam, K. L. Wyres, S. Duchene, [et al.] // *Nat Commun.* – 2018. – V. 9, № 1. – P. 1-10.
76. Lam M. M. C. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* / M. M. C. Lam, K. L. Wyres, L. M. Judd, [et al.] // *Genome Med.* – 2018. – V. 10, № 1. – P. 1-15.
77. Lazareva I. The emergence of hypervirulent blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital / I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2020. – V. 85. – P. 1-6.
78. Lazareva I. V. Prevalence and Antibiotic Resistance of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Saint Petersburg and Some Other Regions of the Russian Federation / I. V. Lazareva, V. A. Ageevets, T. A. Ershova, [et al.] // *Antibiot Khimioter.* – 2016. – V. 61, № 11-12. – P. 28-38.
79. Lee C. R. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods / C. R. Lee, J. H. Lee, K. S. Park, [et al.] // *Front Microbiol.* – 2016. – V. 7. – P. 1-30.
80. Lee T. D. Rapid Detection of KPC, NDM, and OXA-48-Like Carbapenemases by Real-Time PCR from Rectal Swab Surveillance Samples / T. D. Lee, K. Adie, A. McNabb, [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2015. – V. 53, № 8. – P. 2731-2733.
81. Lev A. I. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles / A. I. Lev,

- E. I. Astashkin, A. A. Kislichkina, [et al.] // *Pathog Glob Health*. – 2018. – V. 112, № 3. – P. 142-151.
82. Li R. Emergence of a novel conjugative hybrid virulence multidrug-resistant plasmid in extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 / R. Li, J. Cheng, H. Dong, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents*. – 2020. – V. 55, № 6. – P. 1-7.
83. Li Y. Characteristics of antibiotic resistance mechanisms and genes of *Klebsiella pneumoniae* / Y. Li, S. Kumar, L. Zhang, [et al.] // *Open Med (Wars)*. – 2023. – V. 18, № 1. – P. 20230707.
84. Li Y. Mechanisms of Antibiotic Resistance and Developments in Therapeutic Strategies to Combat *Klebsiella pneumoniae* Infection / Y. Li, S. Kumar, L. Zhang // *Infect Drug Resist*. – 2024. – V. 17. – P. 1107-1119.
85. Li Y. Convergence of carbapenem resistance and hypervirulence leads to high mortality in patients with postoperative *Klebsiella pneumoniae* meningitis / Y. Li, D. Hu, X. Ma, [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist*. – 2021. – V. 27. – P. 95-100.
86. Liakopoulos A. A Review of SHV Extended-Spectrum beta-Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous / A. Liakopoulos, D. Mevius, D. Ceccarelli // *Front Microbiol*. – 2016. – V. 7. – P. 1-27.
87. Lin Z. W. Characteristics of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Does Low Expression of *rmpA* Contribute to the Absence of Hypervirulence? / Z. W. Lin, J. X. Zheng, B. Bai, [et al.] // *Front Microbiol*. – 2020. – V. 11. – P. 1-11.
88. Liu B. T. Characteristics of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Ready-to-Eat Vegetables in China / B. T. Liu, X. Y. Zhang, S. W. Wan, [et al.] // *Front Microbiol*. – 2018. – V. 9. – P. 1-12.
89. Liu C. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China, 2016-20 / C. Liu, N. Dong, E. W. C. Chan, [et al.] // *Lancet Infect Dis*. – 2022. – V. 22, № 2. – P. 167-168.
90. Liu C. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor / C. Liu, J. Guo // *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. – 2019. – V. 18, № 1. – P. 1-11.



91. Liu D. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI) carried by a new integrative and conjugative element (ICE) in a multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain SCs11 / D. Liu, Y. Yang, J. Gu, [et al.] // *Vet Microbiol.* – 2019. – V. 239. – P. 1-28.
92. Liu Y. C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis / Y. C. Liu, D. L. Cheng, C. L. Lin // *Arch Intern Med.* – 1986. – V. 146, № 10. – P. 1913-1916.
93. Lorenzin G. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy / G. Lorenzin, F. Gona, S. Battaglia, [et al.] // *J Glob Antimicrob Resist.* – 2022. – V. 28. – P. 146-150.
94. Mancini S. Detection of NDM-19, a novel variant of the New Delhi metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity under zinc-limited conditions, in Switzerland / S. Mancini, P. M. Keller, M. Greiner, [et al.] // *Diagn Microbiol Infect Dis.* – 2019. – V. 95, № 3. – P. 1-3.
95. Mandell L. A. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults / L. A. Mandell, R. G. Wunderink, A. Anzueto, [et al.] // *Clin Infect Dis.* – 2007. – V. 44 Suppl 2. – P. S27-72.
96. Martin M. J. Anatomy of an extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Tuscany, Italy / M. J. Martin, B. W. Corey, F. Sannio, [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – V. 118, № 48. – P. 1-8.
97. Martinez-Martinez L. Quinolone resistance from a transferable plasmid / L. Martinez-Martinez, A. Pascual, G. A. Jacoby // *Lancet.* – 1998. – V. 351, № 9105. – P. 797-799.
98. Meatherall B. L. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia / B. L. Meatherall, D. Gregson, T. Ross, [et al.] // *Am J Med.* – 2009. – V. 122, № 9. – P. 866-873.
99. Mike L. A. A systematic analysis of hypermucoviscosity and capsule reveals distinct and overlapping genes that impact *Klebsiella pneumoniae* fitness / L. A.

- Mike, A. J. Stark, V. S. Forsyth, [et al.] // PLoS Pathog. – 2021. – V. 17, № 3. – P. 1-31.
100. Mironenko O. V. The issue of nosocomial infection caused by *Klebsiella pneumoniae* blaNDM-type / O. V. Mironenko, V. V. Selnitseva, L. A. Soprun, [et al.] // Vestnik of Saint Petersburg University. Medicine. – 2020. – V. 15, № 2. – P. 124-133.
101. Mishra S. K. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices / S. K. Mishra, P. Basukala, O. Basukala, [et al.] // Curr Microbiol. – 2015. – V. 70, № 1. – P. 128-134.
102. Munoz-Price L. S. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases / L. S. Munoz-Price, L. Poirel, R. A. Bonomo, [et al.] // Lancet Infect Dis. – 2013. – V. 13, № 9. – P. 785-796.
103. Musicha P. Genomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates from Malawi reveals acquisition of multiple ESBL determinants across diverse lineages / P. Musicha, C. L. Msefula, A. E. Mather, [et al.] // J Antimicrob Chemother. – 2019. – V. 74, № 5. – P. 1223-1232.
104. Nassif X. Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor / X. Nassif, J. M. Fournier, J. Arondel, P. J. Sansonetti // Infect Immun. – 1989. – V. 57, № 2. – P. 546-552.
105. Nassif X. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae* / X. Nassif, N. Honore, T. Vasselon, [et al.] // Mol Microbiol. – 1989. – V. 3, № 10. – P. 1349-1359.
106. Nassif X. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin / X. Nassif, P. J. Sansonetti // Infect Immun. – 1986. – V. 54, № 3. – P. 603-608.
107. NCBI. NCBI Reference gene catalog [Электронный ресурс] Режим доступа: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene\\_family:\(blaNDM\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#gene_family:(blaNDM))
108. Nordmann P. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! / P. Nordmann, L. Dortet, L. Poirel // Trends Mol Med. – 2012. – V. 18, № 5. – P. 263-272.

109. Okomo U. Aetiology of invasive bacterial infection and antimicrobial resistance in neonates in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis in line with the STROBE-NI reporting guidelines / U. Okomo, E. N. K. Akpalu, K. Le Doare, [et al.] // *Lancet Infect Dis.* – 2019. – V. 19, № 11. – P. 1219-1234.
110. Paczosa M. K. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense / M. K. Paczosa, J. Meccas // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2016. – V. 80, № 3. – P. 629-661.
111. Pandey N. *Beta Lactam Antibiotics*: / Pandey N. - Treasure Island (FL): 2022. – P. 1-7.
112. Papakonstantinou I. Risk factors for tracheobronchial acquisition of resistant Gram-negative bacterial pathogens in mechanically ventilated ICU patients / I. Papakonstantinou, E. Angelopoulos, I. Baraboutis, [et al.] // *J Chemother.* – 2015. – V. 27, № 5. – P. 283-289.
113. Park S.-H. Genetic Distribution of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Seoul Korea, 2018~2020 / S.-H. Park, S.-H. Park, J.-S. Kim, [et al.] // *jbv.* – 2022. – V. 52, № 1. – P. 28-38.
114. Park Y. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates / Y. Park, Q. Choi, G. C. Kwon, S. H. Koo // *J Clin Lab Anal.* – 2020. – V. 34, № 12. – P. 1-9.
115. Patro L. P. P. K-PAM: a unified platform to distinguish *Klebsiella* species K- and O-antigen types, model antigen structures and identify hypervirulent strains / L. P. P. Patro, K. U. Sudhakar, T. Rathinavelan // *Sci Rep.* – 2020. – V. 10, № 1. – P. 1-14.
116. Perrotta F. Successful Treatment of *Klebsiella pneumoniae* NDM Sepsis and Intestinal Decolonization with Ceftazidime/Avibactam Plus Aztreonam Combination in a Patient with TTP Complicated by SARSCoV-2 Nosocomial Infection / F. Perrotta, M. P. Perrini // *Medicina (Kaunas).* – 2021. – V. 57, № 5. – P. 1-7.
117. Pitout J. D. D. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases / J. D. D. Pitout, G. Peirano, M. M. Kock, [et al.] // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. – V. 33, № 1. – P. 1-48.

118. Podschun R. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors / R. Podschun, U. Ullmann // *Clin Microbiol Rev.* – 1998. – V. 11, № 4. – P. 589-603.
119. Poirel L. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae* / L. Poirel, C. Héritier, V. Tolün, P. Nordmann // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2004. – V. 48, № 1. – P. 15-22.
120. Rammaert B. *Klebsiella pneumoniae* related community-acquired acute lower respiratory infections in Cambodia: clinical characteristics and treatment / B. Rammaert, S. Goyet, J. Beaute, [et al.] // *BMC Infect Dis.* – 2012. – V. 12. – P. 1-2.
121. Reed L. J. M., H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints / L. J. M. Reed, H. // *American Journal of Epidemiology.* – 1938. – V. 27, № 3. – P. 493-497.
122. Rolain J. M. Emergence of antibiotic resistance: need for a new paradigm / J. M. Rolain, R. Canton, G. Cornaglia // *Clin Microbiol Infect.* – 2012. – V. 18, № 7. – P. 615-616.
123. Rolbiecki D. Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent *Klebsiella* spp. in wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees / D. Rolbiecki, M. Harnisz, E. Korzeniewska, [et al.] // *Int J Hyg Environ Health.* – 2021. – V. 237. – P. 1-13.
124. Rosen D. A. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract / D. A. Rosen, J. S. Pinkner, J. N. Walker, [et al.] // *Infect Immun.* – 2008. – V. 76, № 7. – P. 3346-3356.
125. Roupas A. R factor-mediated and chromosomal resistance to ampicillin in *Escherichia coli* / A. Roupas, J. S. Pitton // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1974. – V. 5, № 2. – P. 186-191.
126. Russo T. A. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae* / T. A. Russo, R. Olson, C. T. Fang, [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 2018. – V. 56, № 9. – P. 1.

127. Russo T. A. The *Galleria mellonella* Infection Model Does Not Accurately Differentiate between Hypervirulent and Classical *Klebsiella pneumoniae* / T. A. Russo, U. MacDonald // *mSphere*. – 2020. – V. 5, № 1. – P. 1-7.
128. Russo T. A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / T. A. Russo, C. M. Marr // *Clin Microbiol Rev*. – 2019. – V. 32, № 3. – P. 1-42.
129. Russo T. A. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo / T. A. Russo, R. Olson, U. MacDonald, [et al.] // *Infect Immun*. – 2015. – V. 83, № 8. – P. 3325-3333.
130. Russo T. A. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* / T. A. Russo, R. Olson, U. Macdonald, [et al.] // *Infect Immun*. – 2014. – V. 82, № 6. – P. 2356-2367.
131. Saiman L. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit. Introduction / L. Saiman // *Semin Perinatol*. – 2002. – V. 26, № 5. – P. 313-314.
132. Sands K. Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries / K. Sands, M. J. Carvalho, E. Portal, [et al.] // *Nat Microbiol*. – 2021. – V. 6, № 4. – P. 512-523.
133. Selden R. Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir / R. Selden, S. Lee, W. L. Wang, [et al.] // *Ann Intern Med*. – 1971. – V. 74, № 5. – P. 657-664.
134. Shaidullina E. Antimicrobial Resistance and Genomic Characterization of OXA-48- and CTX-M-15-Co-Producing Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 Recovered from Nosocomial Outbreak / E. Shaidullina, A. Shelenkov, Y. Yanushevich, [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2020. – V. 9, № 12. – P. 1-9.
135. Shankar C. Hybrid Plasmids Encoding Antimicrobial Resistance and Virulence Traits Among Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST2096 in India / C. Shankar, K. Vasudevan, J. J. Jacob, [et al.] // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2022. – V. 12. – P. 1-13.

136. Shelenkov A. Whole-Genome Sequencing Revealed the Fusion Plasmids Capable of Transmission and Acquisition of Both Antimicrobial Resistance and Hypervirulence Determinants in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates / A. Shelenkov, Y. Mikhaylova, S. Voskanyan, [et al.] // *Microorganisms*. – 2023. – V. 11, № 5. – P. 1-17.
137. Shelenkov A. Molecular Typing, Characterization of Antimicrobial Resistance, Virulence Profiling and Analysis of Whole-Genome Sequence of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Isolates / A. Shelenkov, Y. Mikhaylova, Y. Yanushevich, [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2020. – V. 9, № 5. – P. 1-15.
138. Shmakov S. A. CRISPR Arrays Away from cas Genes / S. A. Shmakov, I. Utkina, Y. I. Wolf, [et al.] // *CRISPR J*. – 2020. – V. 3, № 6. – P. 535-549.
139. Shon A. S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A. S. Shon, R. P. Bajwa, T. A. Russo // *Virulence*. – 2013. – V. 4, № 2. – P. 107-118.
140. Siguier P. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences / P. Siguier, J. Perochon, L. Lestrade, [et al.] // *Nucleic Acids Res. – Database issue*. – 2006. – V. 34, № Database issue. – P. D32-36.
141. Sohrabi M. Emergence of K1 ST23 and K2 ST65 hypervirulent *klebsiella pneumoniae* as true pathogens with specific virulence genes in cryptogenic pyogenic liver abscesses Shiraz Iran / M. Sohrabi, M. Alizade Naini, A. Rasekhi, [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol*. – 2022. – V. 12. – P. 1-14.
142. Song J. H. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia amongst adults in the Asia-Pacific region / J. H. Song, V. Thamlikitkul, P. R. Hsueh // *Int J Antimicrob Agents*. – 2011. – V. 38, № 2. – P. 108-117.
143. Spadar A. Large-scale genomic analysis of global *Klebsiella pneumoniae* plasmids reveals multiple simultaneous clusters of carbapenem-resistant hypervirulent strains / A. Spadar, J. Perdigo, S. Campino, T. G. Clark // *Genome Med*. – 2023. – V. 15, № 1. – P. 1-12.
144. Starkova P. Emergence of Hybrid Resistance and Virulence Plasmids Harboring New Delhi Metallo-beta-Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia / P. Starkova,

- I. Lazareva, A. Avdeeva, [et al.] // *Antibiotics (Basel)*. – 2021. – V. 10, № 6. – P. 1-14.
145. Struve C. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence / C. Struve, M. Bojer, K. A. Krogfelt // *Infect Immun*. – 2008. – V. 76, № 9. – P. 4055-4065.
146. Sullivan M. J. Easyfig: a genome comparison visualizer / M. J. Sullivan, N. K. Petty, S. A. Beatson // *Bioinformatics*. – 2011. – V. 27, № 7. – P. 1009-1010.
147. Surgers L. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France / L. Surgers, A. Boyd, P. M. Girard, [et al.] // *Emerg Infect Dis*. – 2016. – V. 22, № 9. – P. 1687-1688.
148. Tang M. Epidemiological Characteristics and Formation Mechanisms of Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / M. Tang, X. Kong, J. Hao, J. Liu // *Front Microbiol*. – 2020. – V. 11. – P. 1-10.
149. Tang Y. Absence of the type I-E CRISPR-Cas system in *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 is associated with dissemination of IncF epidemic resistance plasmids in this clonal complex / Y. Tang, P. Fu, Y. Zhou, [et al.] // *J Antimicrob Chemother*. – 2020. – V. 75, № 4. – P. 890-895.
150. Tavoschi L. Prolonged outbreak of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacterales (NDM-CRE), Tuscany, Italy, 2018 to 2019 / L. Tavoschi, S. Forni, A. Porretta, [et al.] // *Euro Surveill*. – 2020. – V. 25, № 6. – P. 1-7.
151. Teramoto S. Update on the pathogenesis and management of pneumonia in the elderly-roles of aspiration pneumonia / S. Teramoto, K. Yoshida, N. Hizawa // *Respir Investig*. – 2015. – V. 53, № 5. – P. 178-184.
152. Tian D. Genetic diversity and evolution of the virulence plasmids encoding aerobactin and salmochelin in *Klebsiella pneumoniae* / D. Tian, M. Wang, Y. Zhou, [et al.] // *Virulence*. – 2021. – V. 12, № 1. – P. 1323-1333.

153. Treangen T. J. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes / T. J. Treangen, B. D. Ondov, S. Koren, A. M. Phillippy // *Genome Biol.* – 2014. – V. 15, № 11. – P. 1-15.
154. Tsay R. W. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection / R. W. Tsay, L. K. Siu, C. P. Fung, F. Y. Chang // *Arch Intern Med.* – 2002. – V. 162, № 9. – P. 1021-1027.
155. Turton J. Hybrid Resistance and Virulence Plasmids in "High-Risk" Clones of *Klebsiella pneumoniae*, Including Those Carrying bla(NDM-5) / J. Turton, F. Davies, J. Turton, [et al.] // *Microorganisms.* – 2019. – V. 7, № 9. – P. 1-11.
156. Vasilyev I. Y. Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Found Persisting Silently in Infant Gut Microbiota / I. Y. Vasilyev, I. V. Nikolaeva, M. N. Siniagina, [et al.] // *Int J Microbiol.* – 2020. – V. 2020. – P. 1-6.
157. Venkitapathi S. Conserved FimK Truncation Coincides with Increased Expression of Type 3 Fimbriae and Cultured Bladder Epithelial Cell Association in *Klebsiella quasipneumoniae* / S. Venkitapathi, Y. H. Wijesundara, S. A. Cornelius, [et al.] // *J Bacteriol.* – 2022. – V. 10.1128/jb.00172-22 №. – P. 1-16.
158. Vivas R. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option / R. Vivas, S. S. Dolabella, A. A. T. Barbosa, S. Jain // *Rev Soc Bras Med Trop.* – 2020. – V. 53. – P. 1-8.
159. Weber R. E. IS26-Mediated Transfer of bla (NDM-1) as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital / R. E. Weber, M. Pietsch, A. Fruhauf, [et al.] // *Front Microbiol.* – 2019. – V. 10. – P. 1-14.
160. Wu H. Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae* / H. Wu, D. Li, H. Zhou, [et al.] // *Microb Pathog.* – 2017. – V. 104. – P. 254-262.



161. Wu W. NDM Metallo-beta-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings / W. Wu, Y. Feng, G. Tang, [et al.] // *Clin Microbiol Rev.* – 2019. – V. 32, № 2. – P. 1-45.
162. Wyres K. L. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* / K. L. Wyres, M. M. C. Lam, K. E. Holt // *Nat Rev Microbiol.* – 2020. – V. 18, № 6. – P. 344-359.
163. Wyres K. L. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia / K. L. Wyres, T. N. T. Nguyen, M. M. C. Lam, [et al.] // *Genome Med.* – 2020. – V. 12, № 1. – P. 1-16.
164. Wyres K. L. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data / K. L. Wyres, R. R. Wick, C. Gorrie, [et al.] // *Microb Genom.* – 2016. – V. 2, № 12. – P. 1-15.
165. Xiang T. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Carrying blaNDM-1 Gene and the Genetic Environment of blaNDM-1 / T. Xiang, C. Chen, J. Wen, [et al.] // *Frontiers in Microbiology.* – 2020. – V. 11. – P. 1-9.
166. Xie M. Conjugation of Virulence Plasmid in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains through Formation of a Fusion Plasmid / M. Xie, K. Chen, L. Ye, [et al.] // *Adv Biosyst.* – 2020. – V. 4, № 4. – P. e1900239.
167. Xie M. Clinical evolution of ST11 carbapenem resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / M. Xie, X. Yang, Q. Xu, [et al.] // *Commun Biol.* – 2021. – V. 4, № 1. – P. 1-9.
168. Xu Q. Efflux pumps AcrAB and OqxAB contribute to nitrofurantoin resistance in an uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate / Q. Xu, J. Jiang, Z. Zhu, [et al.] // *Int J Antimicrob Agents.* – 2019. – V. 54, № 2. – P. 223-227.
169. Xu Y. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / Y. Xu, J. Zhang, M. Wang, [et al.] // *Genome Med.* – 2021. – V. 13, № 1. – P. 1-15.
170. Yang X. Transmission of pLVPK-like virulence plasmid in *Klebsiella pneumoniae* mediated by an Inc11 conjugative helper plasmid / X. Yang, M. Xie, Q. Xu, [et al.] // *iScience.* – 2022. – V. 25, № 6. – P. 104428.

171. Yang X. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae* / X. Yang, E. Wai-Chi Chan, R. Zhang, S. Chen // *Nat Microbiol.* – 2019. – V. 4, № 12. – P. 2039-2043.
172. Yigit H. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* / H. Yigit, A. M. Queenan, G. J. Anderson, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2001. – V. 45, № 4. – P. 1151-1161.
173. Yong D. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India / D. Yong, M. A. Toleman, C. G. Giske, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – V. 53, № 12. – P. 5046-54.
174. Yu V. L. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections / V. L. Yu, D. S. Hansen, W. C. Ko, [et al.] // *Emerg Infect Dis.* – 2007. – V. 13, № 7. – P. 986-993.
175. Zhang Y. High Prevalence of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Infection in China: Geographic Distribution, Clinical Characteristics, and Antimicrobial Resistance / Y. Zhang, C. Zhao, Q. Wang, [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2016. – V. 60, № 10. – P. 6115-6120.
176. Zhao J. Convergence of MCR-8.2 and Chromosome-Mediated Resistance to Colistin and Tigecycline in an NDM-5-Producing ST656 *Klebsiella pneumoniae* Isolate From a Lung Transplant Patient in China / J. Zhao, Z. Li, Y. Zhang, [et al.] // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2022. – V. 12. – P. 1-10.
177. Zhu J. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / J. Zhu, T. Wang, L. Chen, H. Du // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 1-14.