

Анализ плазмид комплекса *Klebsiella pneumoniae*, несущих кластер генов синтеза аэробактина, представленных в международных базах данных

В. В. ШАПОВАЛОВА¹, П. С. ЧУЛКОВА², *В. А. АГЕЕВЕЦ²

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» (ФГБУ «ЦСП») ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» (ФГБУ «ДНКЦИБ») ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Analysis of Plasmids of the *Klebsiella pneumoniae* Complex Carrying a Cluster of Aerobactin Synthesis Genes as Presented in International Databases

VLERIYA V. SHAPOVALOVA¹, POLINA S. CHULKOVA², *VLADIMIR A. AGEEVETS²

¹ Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia

Резюме

Введение. На данный момент принято выделять два патотипа *Klebsiella pneumoniae* — классические и гипervирулентные, обладающие способностью вызывать внебольничные инфекции у здоровых людей. Показано, что увеличение вирулентности связано с приобретением дополнительного генетического материала — плазмиды, несущей кластер генов аэробактина. **Цель.** Оценить распространённость данных вирулентных плазмид в мире и в России и выявить ключевые генетические особенности. **Материал и методы.** Последовательности плазмид были выгружены из баз данных PLSDb и BV-BRC, аннотированы программами Abricate и Kleborate, кластерный анализ проведён программой mge-cluster, филогенетический анализ программой Parsnp. **Результаты.** Было проанализировано 296 последовательностей плазмид, выделенных из 23 стран из клинических изолятов *K. pneumoniae* в период с 2006 г. по 2021 г. с пиковым значением в 2019 г., более половины плазмид — из Китая. Было идентифицировано более 30 сиквенса типов, среди которых преобладали ST11 и ST23. Гены репликонов группы IncFIB были выявлены почти во всех исследуемых плаزمиде. Преобладающим типом аэробактина в исследуемых последовательностях был первый, также были выявлены последовательности с *iuc3* и *iuc5*. Гены синтеза сальмохелина были выявлены только в 37,1% последовательностей, кластер йерсиниобактина был идентифицирован на двух плазмиде из Китая. 32,1% плазмид несли гены устойчивости, из которых 7,4% — гены бета-лактамаз расширенного спектра и в 5% были выявлены гены карбапенемаз. Было получено 9 кластеров последовательностей, почти все плазмиде из России были отнесены к одному кластеру и были NDM-позитивными. Вместе с плазмиде из других европейских стран (Великобритания, Норвегия, Чехия) они образовали отдельную ветку на филогенетическом дереве. **Заключение.** Вирулентные плазмиде, несущие кластер генов синтеза аэробактина, имеют глобальное распространение, почти треть из них несут также гены устойчивости к антибиотикам.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; гипervирулентность; плазмиде; множественная резистентность; эпидемиология

Для цитирования: Шаповалова В. В., Чулкова П. С., Агеевец В. А. Анализ плазмид комплекса *Klebsiella pneumoniae*, несущих кластер генов синтеза аэробактина, представленных в международных базах данных. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68: 7–8: 17–26. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-17-26>.

Abstract

Background. Currently, it is customary to distinguish two pathotypes of *Klebsiella pneumoniae* — classical and hypervirulent, which have the ability to cause community-acquired infections in healthy people. It has been shown that an increase in virulence is associated with the acquisition of additional genetic material — a plasmid carrying a cluster of aerobactin genes. **Aim.** To assess the prevalence of the aforementioned virulent plasmids around the globe and in Russia in particular, as well as to identify their key genetic features. **Materials and methods.** Plasmid sequences were downloaded from PLSDb and BV-BRC databases, annotated with the Abricate and Kleborate programs; cluster analysis was performed using the mge-cluster program, and phylogenetic analysis was performed using the Parsnp program. **Results.** 296 plasmid sequences isolated from 23 countries from clinical isolates of *K. pneumoniae* between 2006 and 2021 with a peak in 2019 were analyzed, with more than half of the plasmids coming from China. More than 30 sequence types were identified, among which ST11 and ST23 were predominant. Replicon genes of the IncFIB group were identified in almost all plasmids studied. The pre-

© Коллектив авторов, 2023

*Адрес для корреспонденции: ул. Профессора Попова, д. 9, ФГБУ «ДНКЦИБ», Санкт-Петербург, Россия, 197022.
E-mail: ageevets@list.ru

© Team of Authors, 2023

*Correspondence to: 9 Professora Popova str., Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases, St. Petersburg, 197022 Russia. E-mail: ageevets@list.ru

dominant type of aerobactin in the studied sequences was the first type (*iuc1*); sequences with *iuc3* and *iuc5* were also identified. Salmochelin synthesis genes were identified in only 37.1% of sequences; the yersiniabactin cluster was identified in two plasmids from China. 32.1% of plasmids carried resistance genes, of which 7.4% carried extended-spectrum beta-lactamase genes and 5% contained carbapenemase genes. Nine clusters of sequences were obtained; almost all plasmids from Russia were assigned to one cluster and were NDM-positive. Together with plasmids from other European countries (Great Britain, Norway, Czech Republic), they formed a separate branch on the phylogenetic tree. **Conclusion.** Virulent plasmids carrying the aerobactin synthesis gene cluster are distributed globally, and almost a third of them also carry antibiotic resistance genes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; hypervirulence; plasmids; multidrug resistance; epidemiology.

For citation: Shapovalova V. V., Chulkova P. S., Ageevets V. A. Analysis of plasmids of the *Klebsiella pneumoniae* complex carrying a cluster of aerobactin synthesis genes as presented in international databases. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68: 7–8: 17–26. <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2023-68-7-8-17-26>.

Введение

По расчётным данным *Klebsiella pneumoniae* занимает 4-е место среди причин смерти от инфекционных болезней, так в 2019 г. в мире этот патоген вызвал около 800 000 летальных исходов [1]. В течение многих лет значение клебсиелл в патологии человека определялось, в основном, их ролью в этиологии инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи преимущественно у пациентов с коморбидностью [2]. Лечение этих инфекций осложнялось высокой частотой множественной антимикробной резистентности, в том числе и к карбапенемам, вызванной распространением карбапенемаз [3]. Среди множества известных карбапенемаз глобальное распространение и, соответственно, значение получили плазмидные ферменты KPC-, NDM-, OXA-48-типов [4]. В Российской Федерации доминируют карбапенемазы NDM-OXA-48-типов [5–7]. Благоприятным фактором, ограничивающим бремя клебсиеллёзных инфекций, можно считать то, что большинство клебсиелл — возбудителей нозокомиальных инфекций различной локализации, при высокой частоте множественной устойчивости характеризуются невысокой вирулентностью.

Однако в 1986 г. в Тихоокеанском регионе у условно-здоровых людей были описаны случаи тяжёлых внебольничных инфекций со специфической клинической картиной (абсцессы печени и другой локализации, эндофтальмиты), вызванных *K. pneumoniae* [8]. В последующем такие инфекции начали описывать и в других регионах [9–11]. Высокая вирулентность таких клебсиелл была подтверждена экспериментально, при сепсисе мышей их полуметалетальная доза составила 10^2 КОЕ, в то время как для доминирующих клебсиелл это значение 10^6 КОЕ и более [12]. Полностью причины повышенной вирулентности в настоящее время не определены. Повышенную вирулентность проявляют клебсиеллы серотипов K1, K2 и некоторых других [12, 13]. Также достаточно убедительно доказана роль ряда плазмидных генов, включая гены, ответственные за биосинтез и транспорт сидерофоров

аэробактина (*iucABCD* и *iutA*) и салмохелина (*iro*), а также регуляторов экспрессии капсульного полисахарида (*rmpA* и *rmpA2*) и транспортёра *peg-344* с неизвестной функцией [14–17]. Эти гены локализованы на плаزمиде типа pLVPK (224 152 п. н.) [18] и pK2044 (219 385 п. н.) [19].

Клебсиеллы, обладающие низким уровнем вирулентности, принято обозначать как классический патотип (classical *Klebsiella pneumoniae* — cKp), представители этого патотипа могут проявлять множественную антимикробную резистентность [2, 20]. Клебсиеллы, обладающие высокой вирулентностью, обозначают как гипервирулентный патотип (hyper virulent *Klebsiella pneumoniae* — hvKp), представители этого патотипа, как правило, сохраняют чувствительность к антимикробным препаратам. Долгое время считалось, что эти патотипы существуют относительно независимо.

Тем не менее в 2018 г. во время вспышки нозокомиальных инфекций были обнаружены гипервирулентные клебсиеллы, обладавшие также множественной антимикробной резистентностью благодаря продукции карбапенемазы KPC-типа [21]. Таким образом, произошла конвергенция свойств множественной резистентности и гипервирулентности, а новый вариант клебсиелл стали относить к конвергентному патотипу [2]. Клебсиеллы этого патотипа чаще всего обозначают как CRhvKp (carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*). После первого описания CRhvKp в Китае, этот патотип стал необычайно быстро распространяться в других географических регионах [22], в том числе и в России [23–26].

Формирование конвергентного патотипа может быть результатом приобретения изолятом, несущим плазмиду либо резистентности, либо вирулентности дополнительной плазмиды с другими свойствами. Тот факт, что обнаружить конвергентные изоляты долгое время не удавалось объясняют отсутствием у крупных плазмид вирулентности (pLVPK и сходных) генетического аппарата, обеспечивающего конъюгативный перенос. Теоретически появление клебсиелл, ко-

торые одновременно сочетали бы множественную резистентность с гипервирулентностью также считалось маловероятным событием из-за большого генетического груза приобретённых генов, определяющих оба свойства, что должно было негативно повлиять на адаптивность. Однако в настоящее время показано, что мобилизация крупных плазмид вирулентности возможна, это происходит в результате достаточно сложных и редких генетических событий [27], частота которых по непонятным причинам в последнее время, судя по всему, возрастает. Более того, есть основания полагать, что мобилизация генов вирулентности и их импорт в *sKp* происходит чаще, чем импорт генов резистентности в *hVkp* изоляты [28]. Возможно, это связано с тем, что увеличенная капсула *hVkp* изолятов препятствует эффективной конъюгации. Относительно недавно стало понятным, что возникновение конвергентного патотипа может быть результатом формирования крупных (гибридных) плазмид, несущих одновременно гены устойчивости к карбапенемам и гены гипервирулентности [25, 26, 29–32]. В состав таких плазмид обычно входит относительно постоянный набор генов вирулентности, свойственный каноническим плазмидам *rLVPK* и *rK2044*, а также гены различных карбапенемаз. Механизм формирования гибридных плазмид детально не изучен.

Очевидно, что формирование и распространение среди клебсиелл вирулентности и антимикробной резистентности определяется двумя процессами: горизонтальным переносом генов в составе подвижных генетических элементов и распространением генетических линий. В недавней работе было проанализировано около 13 000 публично доступных геномов *K. pneumoniae* с точки зрения распространения репликонов плазмид, а также генов резистентности и вирулентности [28]. Авторам удалось выделить девять кластеров репликонов плазмид из *CRKp*, *hVkp* и *CRhVkp* изолятов, оценить их географическое распространение, связь с сиквенс-типами и наличием генов вирулентности и резистентности.

В данной работе проведён анализ всех доступных в международных базах данных последовательностей плазмид, с помощью нескольких биоинформатических подходов с целью описания сформировавшегося разнообразия генетических платформ, которые несут кластер биосинтеза аэробактина *iuc*, как наиболее значимого маркера гипервирулентности, изучена глобальная популяция, а также выявлены генетические особенности плазмид, обнаруженных ранее на территории Российской Федерации.

Материал и методы

Уникальные последовательности плазмид с геном *iucA* были выгружены из баз данных PLSDb v.2021_06_23_v2 [33] и BV-BRC 3.30.5 [34] по состоянию на 01.11.2022. Была проведена фильтрация хромосомных и неполных плазмидных последовательностей. Были включены последовательности только из изолятов комплекса *Klebsiella* spp. Репликоны плазмид вирулентности, факторы вирулентности и гены устойчивости к антибиотикам были идентифицированы с помощью ABricate [35] и Kleborate [36] с базами данных PlasmidFinder [37], BIGSDB [38], Resfinder [39], используя минимальное покрытие 60% и минимальную идентичность 90%. Кластерный анализ был выполнен с помощью инструмента mge-cluster [40]. Филогенетический анализ проведён с помощью программы Parsnp [41], иллюстрация дерева выполнена с использованием программы iTol [42]. Типирование генома было проведено по схеме MLST [38,43].

Результаты

Общая характеристика плазмид. В анализ было включено 296 последовательностей плазмид различных длин (70586–479335 п.н.; медиана, 218036 п. н.) из 23 стран (рис. 1, а).

Более половины (53%) проанализированных плазмид были выделены в Китае. В Южной Корее, Индии и России выделено по 10–20 плазмид, страна выделения для 33 плазмид не известна. Большинство плазмид было выделено в период с 2006 г. по 2021 г. с пиковым значением в 2019 г. (рис. 1, б). По одной плазмиде выделено в 1911 и 1950/1955 гг., что вероятно, обусловлено анализом исторических коллекций. 76,4% исследуемых плазмид были обнаружены у клинических изолятов, 5,4% — от объектов животноводства и диких животных (корова, индейка, кролик, свинья, олень, дикий як), 1,68% последовательностей получены из образцов окружающей среды. У 16,6% не был указан источник выделения.

Почти все плазмиды были выделены из *K. pneumoniae*, за исключением двух плазмид из *Klebsiella quasipneumoniae* (CP031258, NZ_CP066174.1), двух плазмид — из *Klebsiella variicola* (CP032356, NZ_CP027063.3) и одной плазмиды — из *Klebsiella aerogenes* (NZ_LR134257.1, дата выделения 1950 г.), *Klebsiella ozaenae* (CP073286.1), *Klebsiella* sp. P1927 (CP073378). Было идентифицировано более 30 сиквенс-типов, среди которых преобладали ST11 и ST23, относящиеся к «азиатским».

Кластеры плазмид. Была выполнена кластеризация плазмидных последовательностей и в общей сложности было получено девять кластеров (рис. 2, таблица).

Кластер 8 оказался самым значительным, в него вошло 50 плазмид, выделенных из *K. pneumoniae* (доминирующим сиквенс-типом был ST23), *K. aerogenes* и *K. ozaenae*, в период с 2006 по 2021 г., а также одна плазмиды из исторической коллекции 1950 г.. Плазмиды были выделены в восьми странах. В Азиатском регионе было вы-

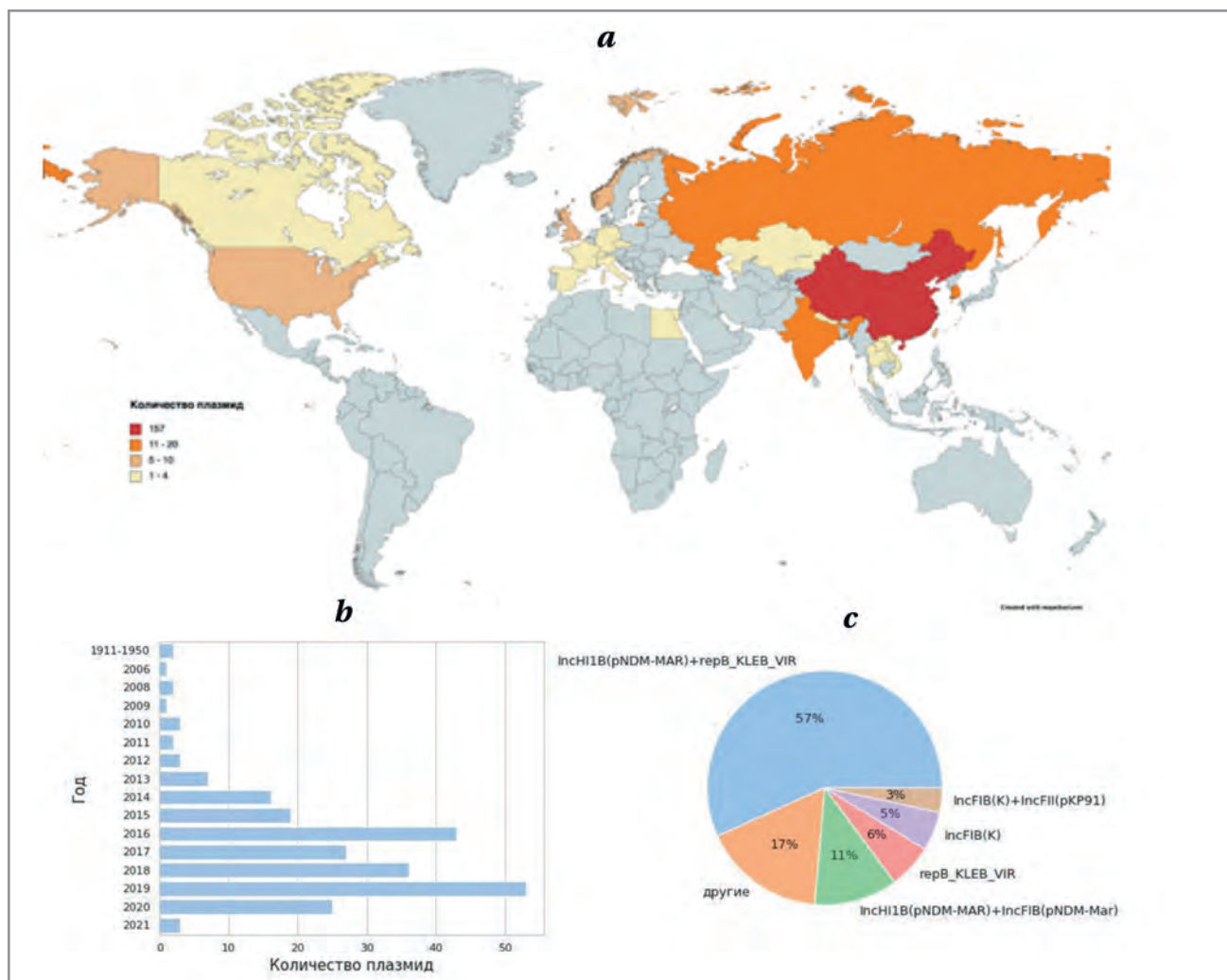


Рис. 1. Характеристика плазмид, включённых в исследование.

a — распределение плазмид по странам выделения; *b* — распределение плазмид по годам выделения; *c* — типы выявленных репликонов.

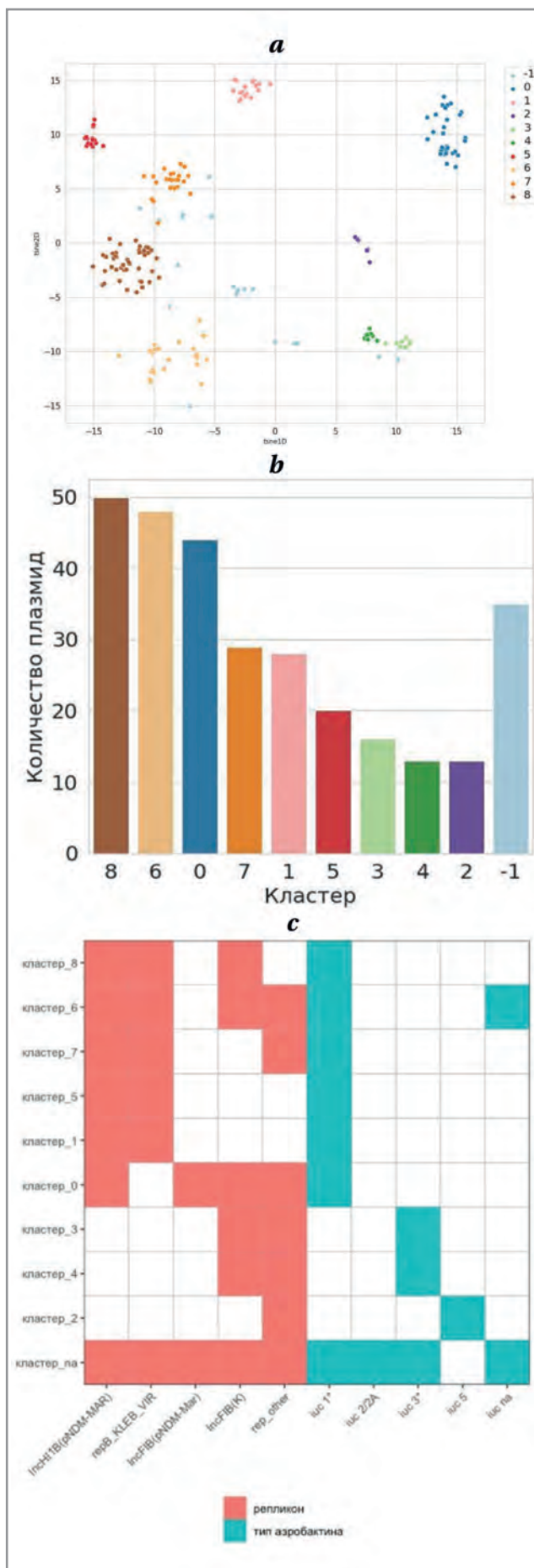
Fig. 1. Characteristics of plasmids included in the study.

a — distribution of plasmids by country of isolation; *b* — distribution of plasmids by year of isolation; *c* — types of identified replicons.

делено 37 (74%) плазмид (Китай (46%), Южная Корея (24%), Тайвань (4%), Казахстан (2%), Сингапур (2%)), в Европе — две (4%) плазмиды (Франция и Россия) и две (4%) плазмиды были выделены в Северной Америке. В России (г. Москва) была выделена одна плазида. Большинство плазмид (медиана длин ~229 тыс. п. н.) несли два репликона IncHI1B(pNDM-MAR) и repB_KLEB_VIR. Кластер аэробактина типа 1 (*iuc* 1) был выявлен во всех последовательностях данной группы. Все плазмиды, кроме одной, кодировали полный кластер генов синтеза сальмохеллина (*iro* 1), который был отнесён к первому типу, и одна последовательность кодировала неизвестный тип. Гены регулятора капсульного полисахарида *rmrADC* были идентифицированы в большинстве плазмид и относились к первому типу, ген *rmrA2* — во всех плазидах, *peg-344* — в 56% исследуемых

последовательностях. На трёх плазидах были выявлены четыре гена резистентности: *aph(7'')-Ia*, *dfrA14*, *blaCTX-M-122* и ген карбапенемазы *blaKPC-2*.

В кластер 6 вошли 48 плазмид, выделенных с 2008 г. по 2020 г. (один образец выделен из исторической коллекции 1911 года) в 11 странах. Пять стран относились к Азиатскому региону (Китай, Тайвань, Сингапур, Южная Корея, Гонконг), четыре — к Европе (Германия, Франция, Великобритания, Норвегия), две — к Северной Америке (США, Канада). Как и в предыдущем кластере, большинство плазмид были выделены в Азиатском регионе — 73% (48% — Китай), в Европе — 12%, в Северной Америке — 6%. Практически все плазмиды были выделены у *K. pneumoniae*, только две — у *K. quasipneumoniae*. На всех плазидах данного кластера, кроме одной, был выявлен ре-



пликон *repB_KLEB_VIR*, 65% плазмид дополнительно несли репликон *IncHI1B(pNDM-MAR)* и на двух плазмидах был выявлен репликон *IncFIB(K)* (*pCAV1099-114*). Большинство плазмид данного кластера (медиана длин ~211 тыс. п. н.), как и кластера 8, несли гены кластеров аэробактина, сальмохеллина и *rpmADC* первого типа. Ген *rpmA2* был найден также во всех последовательностях, *peg-344* — в 42% исследуемых последовательностях. На двух плазмидах было выявлено 11 генов: *aadA2*, *ant(3'')-Ia*, *cmlA1*, *qacE*, *sul1*, *ARR-3*, *aac(6')-Ib-cr*, *aadA16*, *dfrA27*, *floR*, *sul3*.

Кластеру 0 относилось 44 плазмиды, выделенных из *K.pneumoniae* и одна плаزمид из *Klebsiella* sp. в период с 2013 по 2019 гг. в 11 странах. Четыре страны относились к Азиатскому региону (Китай, Индия, Южная Корея, Тайвань), пять — к Европейскому (Европейская часть России, Великобритания, Норвегия, Италия, Чехия), одна — к Северной Америке (Канада), одна — к Ближнему Востоку (Египет), в которых относились к Азиатскому региону 50% (39% — из Китая), к Европе — 39% (23% — из Европейской части России) плазмид. Большинство плазмид (медиана длин ~306 тыс. п. н.) кодировали два репликона *IncHI1B(pNDM-MAR)* и *IncFIB(pNDM-Mar)*, также были идентифицированы репликоны *IncR* и *IncFIB(K)*. Большинство плазмид данного кластера несли гены кластера аэробактина первого типа, но гены синтеза сальмохеллина кодировала только одна. Ген *rpmA2* был найден во всех плазмидах, *peg-344* — в 20% исследуемых последовательностях. Отличительной особенностью плазмид данного кластера являлась распространённость генов резистентности, кото-

Рис. 2. Кластеризация последовательностей плазмид. *а* — полученная матрица расстояний, определённых программой *mge-cluster*. Каждая точка соответствует последовательности плазмиды, и назначенный им кластер помечен цветом, который основан на идентификаторе кластера ($n=9$). Неназначенные последовательности (-1) соответствуют плазмидам с нулевой вероятностью принадлежности к какому-либо определенному кластеру. *б* — количество плазмид в кластерах. *в* — распределение репликонов в зависимости в различных кластерах. «на» и «-1» обозначены последовательности, которые не были отнесены к какому-либо кластеру. *iuc 1** и *iuc 3** включают неполное совпадение с данным типом аэробактина.

Fig. 2. Clustering of plasmid sequences.

а — The resulting distance matrix determined by the *mge-cluster* program. Each dot corresponds to a plasmid sequence and its assigned cluster is labeled with a color that is based on the cluster ID ($N=9$). Unassigned sequences (-1) correspond to plasmids with zero probability of belonging to any particular cluster. *б* — Number of plasmids in clusters. *в* — Distribution of replicons depending on different clusters. «na» and «-1» indicate sequences that were not assigned to any cluster. *iuc 1** and *iuc 3** include partial matches to this aerobactin type.

Характеристика полученных кластеров
Characteristics of the resulting clusters

Кластер	Количество	Период выделения	Страны	Ведущие ST	Размер (медиана), тыс. по	Ведущие репликоны	Сидерофоры	Карбапенемазы
8	50	2006–2021	Азия 74% (Китай, Южная Корея, Тайвань, Казахстан, Сингапур) Европа 4% (Россия, Франция) Северная Америка 4% (США)	23	229	IncHI1B(pNDM-MAR) repB_KLEB_VIR.	iuc1 (100%) iro1 / unknown (98%)	KPC-2 (2%)
6	48	2008–2020	Азия 73% (Китай, Тайвань, Сингапур, Южная Корея, Гонконг) Европа 12% (Германия, Франция, Великобритания, Норвегия) Северная Америка 6% (США, Канада)	—	211	IncHI1B(pNDM-MAR) repB_KLEB_VIR.	iuc1 (100%) iro1 (92%)	—
0	44	2013–2019	Азия 50% (Китай, Индия, Южная Корея, Тайвань) Европа 39% (Россия, Великобритания, Норвегия, Италия, Чехия) Ближний Восток (Египет) Северная Америка 2% (Канада)	—	306	IncHI1B(pNDM-MAR), IncFIB(pNDM-Mar IncR IncFIB(K).	iuc1 (100%) iro1 (2%)	NDM-тип (30%) OXA-48 (2%)
7	29	2015–2020	Азия 72% (Китай, Южная Корея) Европа 3% (Испания)	—	219	IncHI1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR, IncFII(pHN7A8), IncR	iuc1 (100%) iro1 (7%)	KPC-2 (7%)
1	28	2016–2021	Азия 100% (Китай)	11	195	IncHI1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR	iuc1 (100%)	—
5	20	2016–2017	Неизвестно 65% Азия 35% (Китай, Южная Корея)	—	178	IncHI1B(pNDM-MAR), repB_KLEB_VIR	iuc1 (100%)	—
3	16	2010–2019	Азия 81% (Китай, Лаос, Тайланд) Европа 19% (Великобритания, Норвегия)	896	181	IncFIB(K), IncFII(pKP91), IncQ1	iuc3(100%)	—
2	13	2016–2020	Азия 69% (Индия, Китай) Европа 15% (Норвегия, Швейцария) Северная Америка 8% (США)	231	73	IncFIA, IncFII(pAMA1167-NDM-5), IncFIB(pQil)	iuc5 (100%) iro5 (15%)	—
4	13	2010–2020	Азия 100% (Китай, Вьетнам)		243	IncFIB(K), IncQ1, IncFII(pHN7A8)	iuc3(100%)	—

рые были выявлены у 86% исследуемых плазмид, при этом гены карбапенемаз (*bla*NDM-1, *bla*NDM-5, *bla*OXA-48) были выявлены у 32% плазмид.

Десять из 11 плазмид, выделенных в России, были отнесены к кластеру 0, и с этим кластером был проведён дополнительный филогенетический анализ (рис. 3). Все плазмиды были выделены из изолятов от пациентов. Последовательности были разделены на две ветки: ветка I включала только 2 плазмиды из Китая и Тайваня, ветка II состояла из двух субкладов IIa и IIb. Субклад IIa был образован четырьмя плазмидами из Индии, IIb также может быть разделён на два субклада (IIb-1 и IIb-2). Плазмиды из Китая сформировали субклад IIb-1, тогда как большинство плазмид из субклады IIb-2 (ветка выделена красным) были NDM-позитивными и происходили из Европы (Россия, Великобритания, Норвегия, Чехия).

Плазмиды из кластера 7 ($n=29$) были выделены с 2015 по 2020 гг. в трёх странах из *K. pneumoniae*

(доминирующий сиквенс тип ST11): Китай (69%) и по одной плазмиде из Южной Кореи и Испании. На последовательностях (медиана длин ~219 тыс. п. н.) данной группы плазмид выявлены мультирепликон IncHI1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR и дополнительно на одной плазмиде были найдены репликоны IncFII(pHN7A8) и IncR. Все плазмиды данного кластера кодировали аэробактин первого типа и только на двух последовательностях выявлен неполный кластер генов сальмохеллина (*iro* 1). Большинство плазмид несли гены *rmpADC* первого типа и во всех плазмидах выявлен ген *rmpA2*, *peg-344* — в 31% исследуемых последовательностей. 4 плазмиды несли различные гены резистентности ($n=12$), включая две плазмиды с геном карбапенемазы *bla*KPC-2.

Плазмиды из кластера 1 ($n=28$) были выделены с 2016 по 2021 гг. в Китае из *K. pneumoniae* (доминирующий сиквенс тип ST11). Все плазмиды

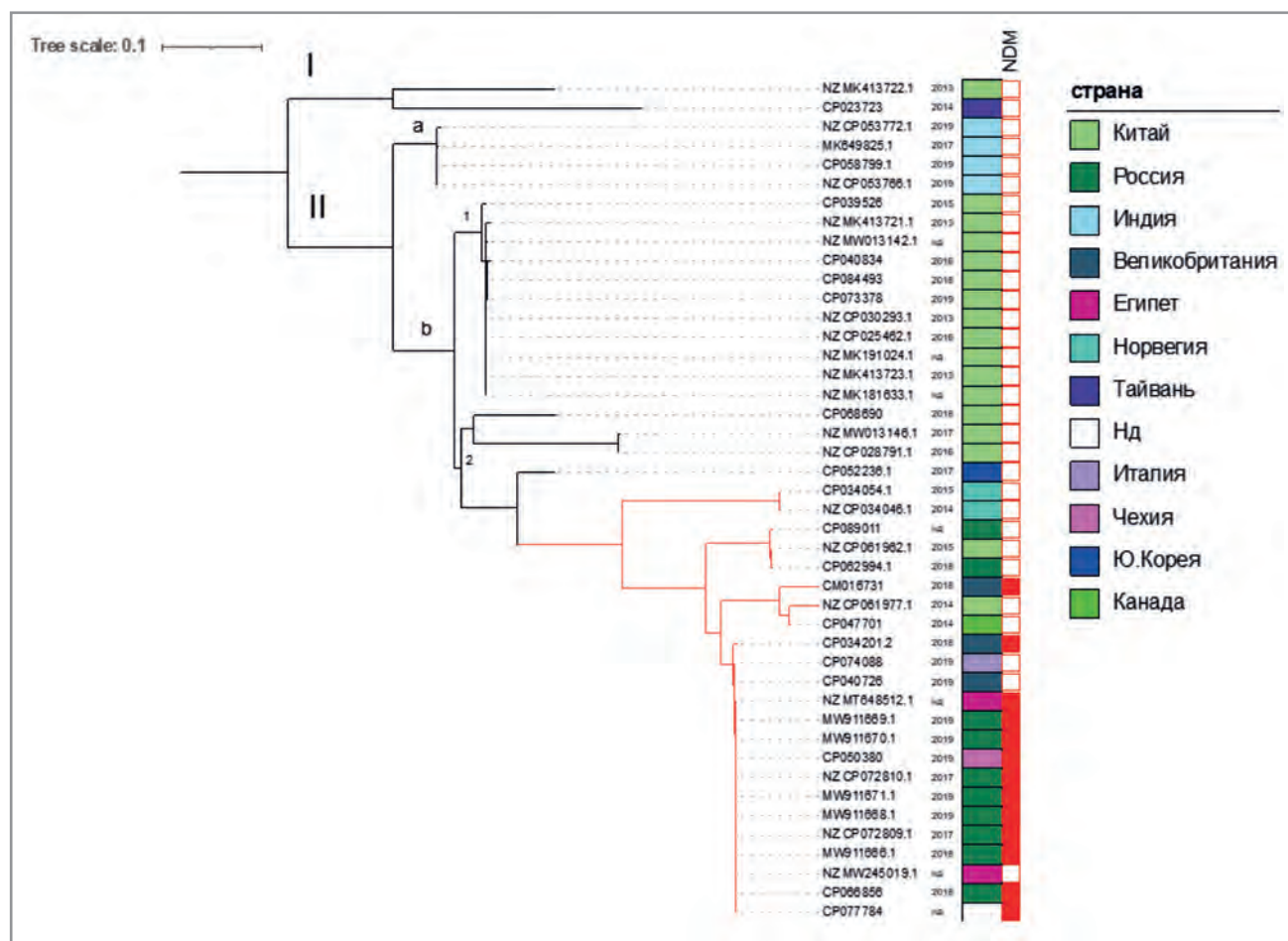


Рис. 3. Филогенетический анализ плазмид из кластера 0.

Примечание. Референс — последовательность MW911666.1. Нд — нет данных. Закрашенный красный квадрат означает наличие гена *bla*NDM на последовательности.

Fig. 3. Phylogenetic analysis of plasmids from cluster 0.

Note. Reference sequence MW911666.1. Нд — no data. A filled red square indicates the presence of the *bla*NDM gene on the sequence.

(медиана длин ~195 тыс. п. н.) данного кластера кодировали мультирепликон IncHI1B(pNDM-MAR)/repB_KLEB_VIR и аэробактин первого типа. Гены синтеза сальмохеллина не были выявлены. Большинство плазмид несли гены *rmrADC* первого типа и во всех плазмидах выявлен ген *rmrA2*, *peg-344* — в 11%. Гены резистентности не были выявлены.

Для большинства плазмид из кластера 5 ($n=20$) страна и год выделения не известны, кроме плазмид из Китая и Южной Кореи, выделенных в 2016–2017 гг. Все плазмиды были выделены из *K. pneumoniae* с медианой длин ~178 тыс. п. н. и несли кластер аэробактина *iuc* 1 и ген *rmrA2*. Генов *iro*, *rmrADC* и *peg-344* и генов резистентности не было выявлено.

Плазмиды из кластера 3 ($n=16$, медиана длин ~181 тыс. п. н.) были выделены с 2010 по 2019 гг. в пяти различных странах из *K. pneumoniae* (50% — ST896). В Азиатском регионе выделены 81% плазмид (Китай (50%), Лаос (19%), Таиланд (13%)), в Европе — 19% (Великобритания (13%), Норвегия (6%)). Все плазмиды данного кластера, кроме одной, несли два репликона IncFIB(K) и IncFII(pKP91), на половине плазмид ещё был выявлен третий репликон IncQ1. В отличие от других кластеров, на плазмидах данной группы был найден аэробактин третьего типа. Дополнительные факторы вирулентности *rmrADC*, *rmrA2* и *peg-344* не были выявлены. 75% плазмид несли ещё различные гены резистентности ($n=18$).

Плазмиды из кластера 2 ($n=13$) были выделены из пяти стран, девять (69%) из которых из Азиатского региона (Индия (54%), Китай (15%)), две (15%) из Европы (Норвегия, Швейцария) и одна плазида из Северной Америки (США) из *K. pneumoniae* (9 плазмид — из штаммов сиквенс типа ST231), отличались сравнительно небольшой медианой длин ~73 тыс. п. н. Более половины плазмид ($n=9$) несли два репликона IncFIA и IncFII(pAMA1167-NDM-5), на одной плазмиде был выявлен ещё дополнительно ген репликона IncFIB(pQil). Кластер генов аэробактина был отнесён к пятому типу (*iuc* 5) и две плазмиды кодировали сальмохеллин также пятого типа. Дополнительные факторы вирулентности *rmrADC*, *rmrA2* и *peg-344* не были выявлены. На всех плазмидах данного кластера были выявлены гены резистентности ($n=26$).

Все плазмиды из кластера 4 ($n=13$, медиана длин ~243 тыс. п. н.) были выделены в Азиатском регионе (все, кроме одной плазмиды (Вьетнам) выделены в Китае) из *Klebsiella pneumoniae*. На всех последовательностях был выявлен ген репликона IncFIB(K), в четырёх последовательностях был ещё дополнительно ген репликона IncQ1 и на одной плазмиде второй репликон был IncFII(pHN7A8). Кластер аэробактина был отнесён к

третьему типу. Дополнительные факторы вирулентности *iro*, *rmrADC*, *rmrA2* и *peg-344* не были выявлены. 70% плазмид несли ещё различные гены резистентности ($n=24$).

Доминирующими репликонами в кластерах 8, 6, 7, 5, 1 были IncHI1B(pNDM-MAR) и repB_KLEB_VIR, в то время как IncHI1B(pNDM-MAR) и IncFIB(pNDM-Mar) были наиболее распространёнными в кластере 0 (рис. 2, с). Репликон IncFIB(K) был наиболее распространён в кластерах 3 и 4, репликоны IncFIA и IncFII — в кластере 2. Доминирующим типом аэробактина был *iuc* 1, и он был обнаружен во всех кластерах, кроме 3, 4 и 2. *Iuc* 3 был идентифицирован в кластерах 3 и 4, тогда как *iuc* 5 обнаружен только в кластере 2.

Обсуждение

Гибридные плазмиды, содержащие одновременно гены вирулентности и антимикробной резистентности (прежде всего гены карбапенемазы), представляют серьёзную угрозу всей системе здравоохранения из-за трудности проведения адекватной антимикробной терапии и потенциально высокой смертности при инфекциях, вызванных несущими их клебсиеллами. Однако структура и распространение этих плазмид изучены недостаточно. Плазмиды становятся обладателями мозаичной структуры с набором различных функциональных генетических модулей, каждый из которых, вероятно, имеет независимую филогенетическую историю. Таким образом, для исследования эпидемиологии этих сложных динамических структур необходимо применять различные методы кластеризации. В данной работе для первичного типирования последовательностей была использована программа mge-cluster, позволяющая проводить кластеризацию на основе извлечённых юнитигов (unitigs). Во всех девяти полученных кластерах преобладали плазмиды из Азиатского региона: во всех кластерах, кроме второго, большинство плазмид были выделены в Китае. Плазмиды из второго кластера преимущественно были выделены в Индии и обладали особой структурой аэробактинового кластера *iuc* 5. Наибольший процент плазмид, выделенных в Европе, был в кластере 0. К этому же кластеру были отнесены все (10/11), кроме одной, плазмиды из России (Европейская часть). Дополнительный филогенетический анализ этого кластера позволил установить, что плазмиды из Европейского региона образовали отдельную ветку. Так же было выявлено, что плазмиды, отнесённые к этой ветке, кодировали карбапенемазы NDM-типа. Из этого можно сделать вывод о формировании

отдельной генетической линии гибридных гипервирулентных плазмид на Европейской части территории России. Необходимы дополни-

тельные эпидемиологические меры по сдерживанию и раннему выявлению данных опасных штаммов.

Литература/References

- Ikuta K.S., Swetschinski L.R., Robles Aguilar G., Sharara F., Mestrovic T., Gray A.P. et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet*. 2022; 400 (10369): 2221–2248. doi: 10.1016/S0140-6736(22)02185-7.
- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (4): 589–603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589.
- Tzouvelekis L.S., Markogiannakis A., Psychogiou M., Tassios PT, Daikos G.L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25 (4): 682–707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.
- Arnold R.S., Tharm K.A., Sharma S., Phillips M., Kristie Johnson J., Morgan D.J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria: *South Med J*. 2011; 104 (1): 40–45. doi: 10.1097/SMJ.0b013e3181fd7d5a.
- Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., Ilina E.N., Lobzin Y.V., Shlyapnikov S.A. et al. Emergence of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Saint Petersburg, Russia. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 44 (2): 152–155. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.05.004.
- Barantsevich E.P., Churkina I.V., Barantsevich N.E., Pelkonen J., Schlyakhto E.V., Woodford N. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 carbapenemase in Saint Petersburg, Russia. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68 (5): 1204–1206. doi: 10.1093/jac/dks503.
- Fursova N.K., Astashkin E.I., Knyazeva A.I., Kartsev N.N., Leonova E.S., Ershova O.N. et al. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015; 14 (1): 46. doi: 10.1186/s12941-015-0108-y.
- Liu Y.C. *Klebsiella pneumoniae* Liver Abscess Associated With Septic Endophthalmitis. *Arch Intern Med*. 1986; 146 (10): 1913. doi: 10.1001/archinte.1986.0036022005701.1
- Wang J., Liu Y., Lee S.S., Yen M., Wang Y.C. Jao-Hsien, Wann S. et al. Primary Liver Abscess Due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis*. 1998; 26 (6): 1434–1438. doi: 10.1086/516369.
- Rossi B., Gasperini M.L., Leflon-Guibout V., Gioanni A., De Lastours V., Rossi G. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in cryptogenic liver abscesses, Paris, France. *Emerg Infect Dis*. 2018; 24 (2): 221–229. doi: 10.3201/eid2402.170957.
- Nadasy K.A., Domiati-Saad R., Tribble M.A. Invasive *Klebsiella pneumoniae* Syndrome in North America. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (3): e25–e28. doi: 10.1086/519424.
- Nassif X., Sansonetti P.J. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin. *Infect Immun*. 1986; 54 (3): 603–608. doi: 10.1128/iai.54.3.603-608.1986.
- Yu W.L., Chan K.S., Ko W.C., Lee C.C., Chuang Y.C. Lower Prevalence of diabetes mellitus in patients with *Klebsiella pneumoniae* primary liver abscess caused by isolates of K1/K2 than with Non-K1/K2 capsular serotypes. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 (11): 1529–1530. doi: 10.1086/523006.
- Russo T.A., Olson R., Fang C.T., Stoesser N., Miller M., MacDonald U. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018; 56 (9): e00776–18. doi: 10.1128/JCM.00776-18.
- Bulger J., MacDonald U., Olson R., Beanan J., Russo T.A. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge. *Infect Immun*. 2017; 85 (10): e00093–17. doi: 10.1128/IAI.00093-17.
- Lin Z. wei, Zheng J. xin, Bai B., Xu G. jian, Lin F. jun, Chen Z. et al. Characteristics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: does low expression of rmpA contribute to the absence of hypervirulence? *Front Microbiol*. 2020; 11: 436. doi: 10.3389/fmicb.2020.00436.
- Walker K.A., Treat L.P., Sepúlveda V.E., Miller V.L. The small protein RmpD drives hypermucoviscosity in *Klebsiella pneumoniae*. *mBio*. 2020; 11 (5): e01750–20. doi: 10.1128/mBio.01750-20.
- Chen Y.T., Chang H.Y., Lai Y.C., Pan C.C., Tsai S.F., Peng H.L. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*. 2004; 337: 189–198. doi: 10.1016/j.gene.2004.05.008.
- Wu K.M., Li L.H., Yan J.J., Tsao N., Liao T.L., Tsai H.C. et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J Bacteriol*. 2009; 191 (14): 4492–4501. doi: 10.1128/JB.00315-09.
- Shon A.S., Bajwa R.P.S., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence*. 2013; 4 (2): 107–118. doi: 10.4161/viru.22718.
- Gu D., Dong N., Zheng Z., Lin D., Huang M., Wang L. et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2018; 18 (1): 37–46. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30489-9.
- Turton J., Davies E., Turton J., Perry C., Payne Z., Pike R. Hybrid resistance and virulence plasmids in «High-Risk» clones of *Klebsiella pneumoniae*, including those carrying blaNDM-5. *Microorganisms*. 2019; 7 (9): 326. doi: 10.3390/microorganisms7090326.
- Lev A.I., Astashkin E.I., Kislichkina A.A., Solovieva E.V., Kombarova T.I., Korobova O.V. et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. *Pathog Glob Health*. 2018; 112 (3): 142–151. doi: 10.1080/20477724.2018.1460949.
- Lazareva I., Ageevets V., Sopova J., Lebedeva M., Starkova P., Likholetova D. et al. The emergence of hypervirulent blaNDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. *Infect Genet Evol*. 2020; 85: 104527. doi: 10.1016/j.meegid.2020.104527.
- Shaidullina E., Shelenkov A., Yanushevich Y., Mikhaylova Y., Shagin D., Alexandrova I. et al. Antimicrobial resistance and genomic characterization of OXA-48- and CTX-M-15-Co-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 recovered from nosocomial outbreak. *Antibiotics*. 2020; 9 (12): 862. doi: 10.3390/antibiotics9120862.
- Starkova P., Lazareva I., Avdeeva A., Sulian O., Likholetova D., Ageevets V. et al. Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring new delhi metallo-β-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Antibiotics*. 2021; 10 (6): 691. doi: 10.3390/antibiotics10060691.
- Xu Y., Zhang J., Wang M., Liu M., Liu G., Qu H. et al. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2021; 13 (1): 119. doi: 10.1186/s13073-021-00936-5.
- Spadar A., Perdigão J., Campino S., Clark T.G. Large-scale genomic analysis of global *Klebsiella pneumoniae* plasmids reveals multiple simultaneous clusters of carbapenem-resistant hypervirulent strains. *Genome Med*. 2023; 15 (1): 3. doi: 10.1186/s13073-023-01153-y.
- Cejas D., Fernández Canigia L., Rincón Cruz G., Elena A.X., Maldonado I., Gutkind G.O. et al. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *J Clin Microbiol*. 2014; 52 (9): 3483–3485. doi: 10.1128/JCM.00726-14.
- Compain E., Vandenberghe A., Gominet M., Genel N., Lebeaux D., Ramahafasolo A. et al. Primary osteomyelitis caused by an NDM-1-producing *K. pneumoniae* strain of the highly virulent sequence type 23. *Emerg Microbes Infect*. 2017; 6 (1): 1–3. doi: 10.1038/emi.2017.43.
- Becker L., Kaase M., Pfeifer Y., Fuchs S., Reuss A., Von Laer A. et al. Genome-based analysis of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008–2014. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018; 7 (1): 62. doi: 10.1186/s13756-018-0352-y.
- Roulston K.J., Bharucha T., Turton J.F., Hopkins K.L., Mack D.J.F. A case of NDM-carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the UK. *JMM Case Rep*. 2018; 5 (9). doi: 10.1099/jmmcr.0.005130.
- Galata V., Fehlmann T., Backes C., Keller A. PLSDb: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47 (D1): D195–D202. doi: 10.1093/nar/gky1050.
- Olson R.D., Assaf R., Brettin T., Conrad N., Cucinell C., Davis J.J. et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*. 2023; 51 (D1): D678–D689. doi: 10.1093/nar/gkac1003.
- Seemann T. Abriicate. <https://github.com/tseemann/abriicate>
- Lam M.M.C., Wick R.R., Watts S.C., Cerdeira L.T., Wyres K.L., Holt K.E. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nat Commun*. 2021; 12 (1): 4188. doi: 10.1038/s41467-021-24448-3.
- Carattoli A., Hasman H. PlasmidFinder and in silico pMLST: identification and typing of plasmid replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In: De La Cruz F, ed. *Horizontal Gene Transfer*. Vol 2075. *Methods in Molecular Biology*. Springer US; 2020: 285–294. doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7_20.
- Jolley K.A., Maiden M.C. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11 (1): 595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595.

39. Florensa A.F., Kaas R.S., Clausen P.T.L.C., Aytan-Aktug D., Aarestrup E.M. ResFinder — an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microb Genomics*. 2022; 8 (1). doi: 10.1099/mgen.0.000748.
40. Arredondo-Alonso S., Gladstone R.A., Pöntinen A.K., Gama J.A., Schürch A.C., Lanza V.F. et al. Consistent typing of plasmids with the Mge-cluster pipeline. *Bioinformatics*; 2022. doi: 10.1101/2022.12.16.520696.
41. Treangen T.J., Ondov B.D., Koren S., Phillippy A.M. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intra-specific microbial genomes. *Genome Biol*. 2014; 15 (11): 524. doi: 10.1186/s13059-014-0524-x.
42. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. 2021; 49 (W1): W293–W296. doi: 10.1093/nar/gkab301.
43. Seemann T. mlst. <https://github.com/tseemann/mlst>

Информация об авторах

Шаповалова Валерия Владиславовна — научный сотрудник Центр постгеномных технологий, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия. ORCID ID: 0000-0002-6915-031X

Чулкова Полина Сергеевна — младший научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней» Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Агеев Владимир Андреевич — к. б. н., научный сотрудник, отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», Санкт-Петербург, Россия. ORCID ID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900

About the authors

Vleriya V. Shapovalova — Researcher, Center for Postgenomic Technologies, 1Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia. ORCID ID: 0000-0002-6915-031X

Polina S. Chulkova — Junior researcher, Department of Medical Microbiology and Molecular Epidemiology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. WOS Researcher ID: AAB-3307-2021. Scopus Author ID: 57210585992

Vladimir A. Ageevets — Ph.D. in Biology, Pediatric Research and Clinical Center for Infectious Diseases the Federal Medical Biological Agency, St. Petersburg, Russia. ORCID ID: 0000-0002-3963-0144. WOS Researcher ID: F-9282-2017. Scopus Author ID: 55949608900