

## МОБИЛОМ КЛИНИЧЕСКИХ КАРБАПЕНЕМ-УСТОЙЧИВЫХ ИЗОЛЯТОВ *Klebsiella pneumoniae*

© 2020 г. А. Е. Алексеева<sup>1</sup> \*, Н. Ф. Бруснигина<sup>1</sup>, Н. А. Гординская<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии  
им. академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, 603950 Россия

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, 603005 Россия

\*e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Поступила в редакцию 07.03.2019 г.

После доработки 25.04.2019 г.

Принята к публикации 05.06.2019 г.

Дана характеристика структуры мобилома клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, принадлежащих к эпидемически распространенному сиквенс-типу 395 и продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия СТХ-М-15 и ОХА-48 карбапенемазы. По данным анализа *in silico* в мобиломе всех штаммов установлено наличие Col-подобной плазмиды и репликонов групп несовместимости R и L/M. Проведен анализ генетического окружения генов *bla*<sub>ОХА-48</sub> и *bla*<sub>СТХ-М-15</sub> и описаны варианты мобильных структур, участвующих в распространении этих генов. В структуре мобилома штамма *K. pneumoniae* KP1083 обнаружены дополнительная плазмида H11B/FIB, нуклеотидная последовательность которой имеет филогенетическое родство с плазмидой pNDM-MAR, а также широкий спектр мобильных структур, сцепленных с детерминантами антибиотикорезистентности, в частности инсерционные структуры ISCR1 и две интегразы, относящиеся к интегронам класса I.

**Ключевые слова:** *Klebsiella pneumoniae*, плазмиды, группы несовместимости, ОХА-48, СТХ-М-15, IS, интегрон, ISCR1.

**DOI:** 10.31857/S0016675820030030

В Российской Федерации, как и во всем мире, бактерии вида *K. pneumoniae* являются актуальными нозокомиальными патогенами, вызывающими инфекционные заболевания респираторного, желудочно-кишечного трактов, глаз, кожи, инфекции мочевыводящих путей, центральной нервной системы, а также первичные абсцессы печени [1–3]. Повышенное внимание исследователей к изучению клинических изолятов клебсиелл связано, в первую очередь, с биологическими свойствами данных микроорганизмов, в частности с их вирулентностью и высокой устойчивостью к широкому спектру антимикробных препаратов [1, 2, 4]. Антибиотикорезистентность клебсиелл, как правило, связана с наличием генетических детерминант, расположенных на мобильных элементах (плазмидах, транспозонах, интегронах, IS-элементах и т.д.) [3–7].

Исследователями разных стран мира показано присутствие в геноме клинических штаммов клебсиелл нескольких плазмид, часто комбинированных и принадлежащих одновременно к нескольким группам несовместимости [3, 5]. Однако хотелось бы отметить, что в Российской Федерации имеется существенный недостаток сведений, касающихся

детальной характеристики мобилома нозокомиальных штаммов *K. pneumoniae*.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были три карбапенем-резистентных клинических изолята *K. pneumoniae* KP59, KP314, KP1083, выделенных из раневой поверхности пациентов ожогового отделения клиники ФГБОУ “Приволжский исследовательский медицинский университет”. ДНК чистых культур *K. pneumoniae* выделяли с помощью коммерческого набора “АмплиПрайм ДНК-сорб-В” (ЦНИИЭ, Россия). Полногеномное секвенирование штаммов *K. pneumoniae* проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina, США). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT Sample Preparation kit (Illumina, США), секвенирование проводили с использованием набора MiSeq reagent kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов. Сборку чтений *de novo*, полученных в результате секвенирования, осуществляли с помощью программного обеспечения SPAdes версия 3.9.1 [8]. Аннотирование проводили с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annota-

tion Pipeline (PGAP) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). С помощью сервиса BLASTN [9] осуществляли поиск гомологичных последовательностей, принадлежащих плазмидам, и подбор наиболее близких референс-последовательностей целых плазмид, депонированных в базе данных GenBank. Типирование по группам несовместимости плазмид *in silico* проводили с использованием web-сервиса PlasmidFinder [10]. Поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности осуществляли с помощью базы данных Klebsiella Sequence Typing (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) и сервера Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Поиск и характеристику мобильных элементов, связанных с детерминантами антибиотикорезистентности, проводили с помощью web-сервисов IS-finder [11] и INTEGRALL [12]. Для выявления гомологичных последовательностей мобильных структур относительно базы данных RefSeq (NCBI) [13] использовали сервис BLASTN.

Филогенетический анализ проводили с помощью web-сервиса REALPHY [14], построение дендрограмм осуществляли в программе MEGA версия 7.0.21 [15], алгоритм ближайшего соседа (Neighbor-Joining) [16] с бутстреп-поддержкой (1000 повторов).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На основании полученных результатов сборки коротких чтений проведено типирование исследуемых штаммов *K. pneumoniae* KP59, KP314, KP1083, установлена принадлежность их к сиквенс-типу 395 (ST395) и капсульному типу K2. Более подробная характеристика этих штаммов клебсиелл дана в ранее представленной публикации [17].

При анализе нуклеотидных последовательностей генома штаммов *K. pneumoniae* KP59, KP314, KP1083, проведенном с помощью web-сервиса PlasmidFinder, найдены репликоны групп несовместимости L/M и R. Кроме того, выявлен Col1440I/440II-подобный репликон с уровнем гомологии около 90% относительно нуклеотидных последовательностей плазмид *K. pneumoniae* FDAARGOS\_440 plasmid unnamed (номер GenBank CP023920.1 и CP023921.1). У штамма *K. pneumoniae* KP1083 дополнительно обнаружены репликоны IncHI1B и IncFIB, имеющие уровень идентичности 99.82 и 99.54% соответственно с репликонами плазмиды pNDM-MAR (номер GenBank JN420336.1), выявленной у штамма *K. pneumoniae* TСКрпС (Марокко, 2011) [18].

Принадлежность контигов конъюгативной плазмиде IncL/M определяли относительно референс-последовательности плазмиды pOXA-48

штамма *K. pneumoniae* Kp11978 (номер GenBank JN626286.1). В результате аннотирования установлено, что у всех трех штаммов данная плазида несет только детерминанту OXA-48 карбапенемазы. У штамма *K. pneumoniae* KP1083 детерминанта OXA-48 входит в состав широко распространенного транспозона *Th1999* [19]. При анализе генетического окружения детерминанты *bla*<sub>OXA-48</sub> штаммов клебсиелл KP59 и KP314 с помощью сервиса BLASTN установлено, что наиболее гомологичной является структура транспозона *Th1999.2*, несущего ген OXA-48 карбапенемазы и выявленного впервые в плазмиде p11099 штамма *E. cloacae* 11099 (номер GenBank JN714122.1) [20]. На рис. 1 представлена дендрограмма нуклеотидных последовательностей плазмид IncL/M исследуемых штаммов и полногеномных последовательностей плазмид *K. pneumoniae*, депонированных в базу данных GenBank.

Результаты филогенетического анализа показали, что нуклеотидные последовательности плазмид IncL/M штаммов *K. pneumoniae* KP59, KP314 находятся на одной ветке, а штамма *K. pneumoniae* KP1083 группируются с плазмидной ДНК pOXAAPSS2 (номер GenBank KU159086.1), выделенной у штамма *K. pneumoniae* OXAAPSS2 (Санкт-Петербург, 2012 г.).

Референс-последовательностью для определения контигов, принадлежащих плазмиде IncR, являлась нуклеотидная последовательность плазмиды rKp\_Goe\_629-1 (номер GenBank CP018365.1). По данным аннотирования в структуре плазмиды IncR исследуемых штаммов *K. pneumoniae* обнаружено значительное количество детерминант антибиотикорезистентности, включая ген эпидемически значимой CTX-M-15 цефалоспорины. При анализе генетического окружения гена *bla*<sub>CTX-M-15</sub> с помощью web-сервиса IS-finder установлено, что у всех трех исследуемых штаммов в генетическую структуру, несущую детерминанту CTX-M-15, входит делетированная последовательность мобильного элемента *ISEcp1* длиной в 192 нуклеотида, через 48 нуклеотидов расположен ген *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, далее находится ген, предположительно кодирующий металлотеин семейства WbuC, затем последовательность транспозона  $\Delta Th3$  (контиги MRVH02000054.1, MRYN02000056.1, MRYM02000096.1 + MRYM02000092.1). Вся структура фланкирована инвертированными инсерционными элементами длиной 188 пн, представляющими собой последовательности  $\Delta IS26$  транспозаз. Следует отметить, что высокогомологичная структура обнаружена только в референсной нуклеотидной последовательности плазмиды Kp\_Goe\_629-1 штамма *K. pneumoniae* Kp\_Goe\_62629 (Германия, 2015 г.) Менее гомологичные последовательности обнаружены в плазмидах других групп несовместимо-

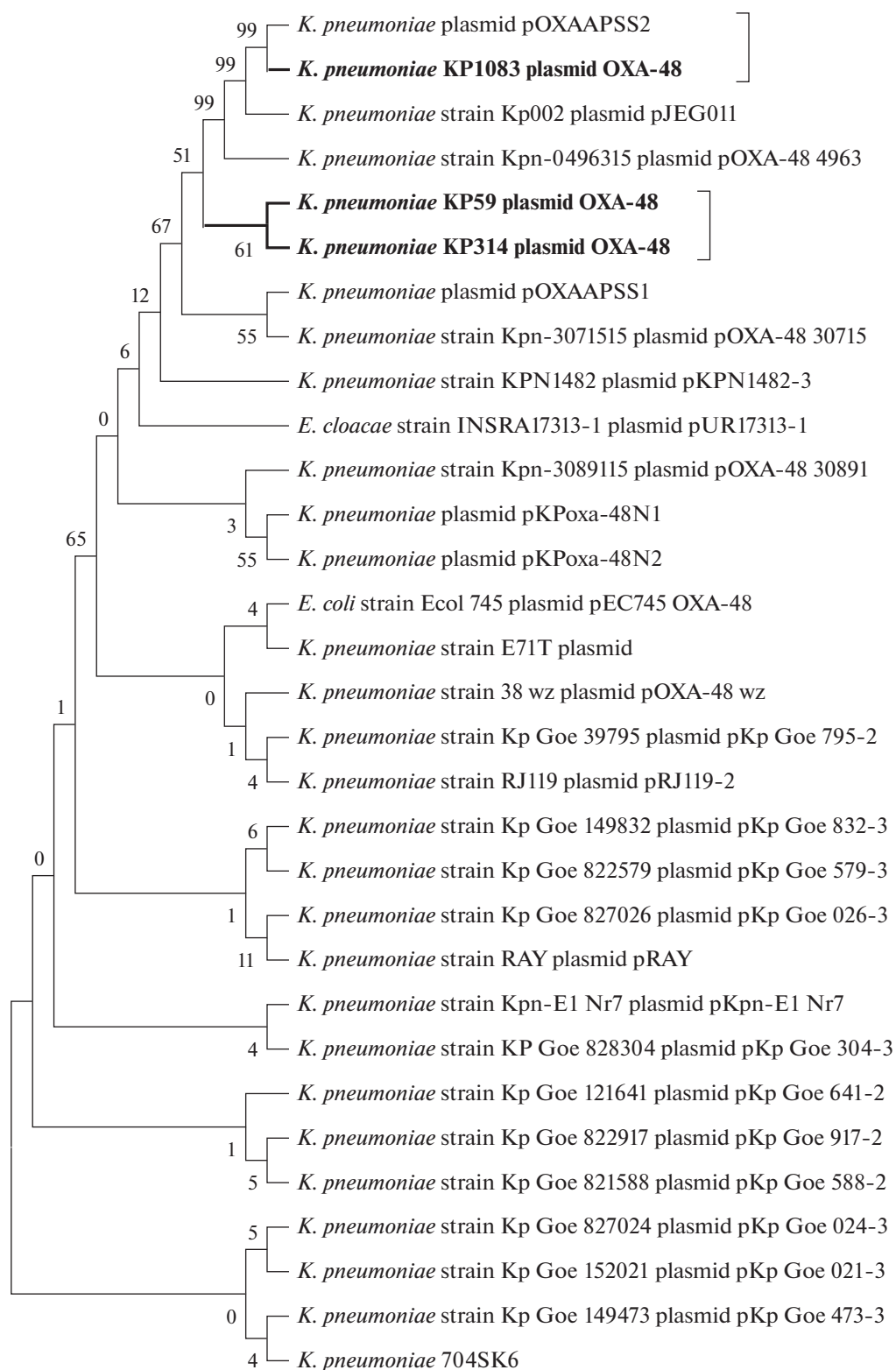


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основании сравнения нуклеотидных последовательностей плазмид IncL/M штаммов *K. pneumoniae*.

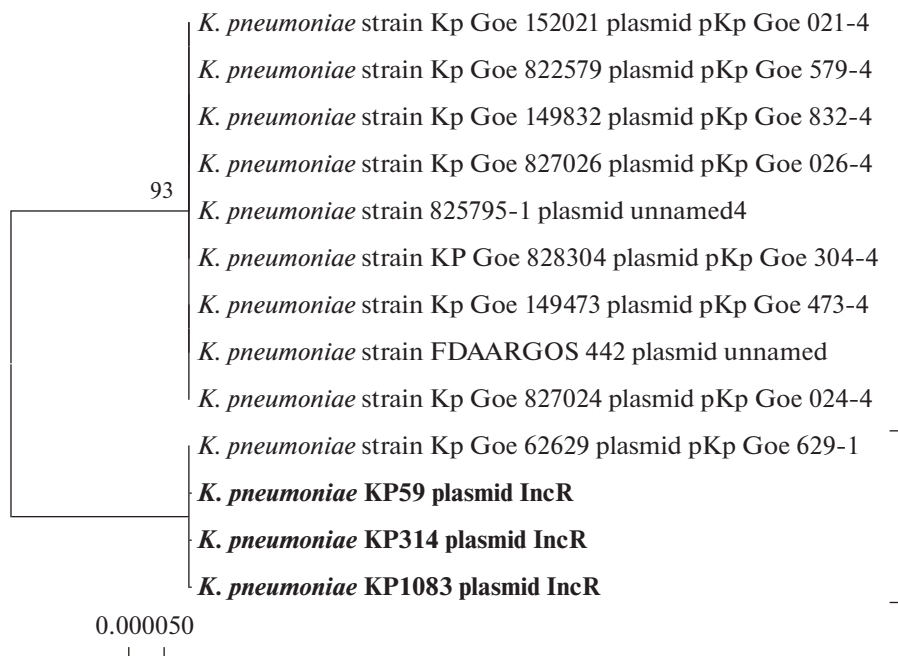


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании сравнения нуклеотидных последовательностей плазмид IncR штаммов *K. pneumoniae*.

сти, выделенных у различных штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae.

Сцеплены с мобильными элементами и другие детерминанты антибиотикорезистентности, локализованные группами на разных контигах, которые входят в структуру плазмиды IncR. В частности, на одном контиге расположены детерминанты пентапептидного белка QnrS1, определяющего устойчивость к хинолонам, и бета-лактамазы TEM-1. Ген *qnrS1* фланкирован, с одной стороны, инсерционным элементом *ISKpn19*, а с другой — фрагментом последовательности транспозазы, предположительно относящейся к семейству *IS3*. Ген *bla<sub>TEM-1</sub>* находится в составе  $\Delta Tn2$  транспозона длиной 2125 пн [21].

Гены, определяющие устойчивость к триметоприму (*dfrA1*), тетрациклину (*tetA*), сульфаниламидам (*sul1*), связаны с мобильным элементом *IS6100*.

С транспозазой семейства *IS6* сцеплены гены аминогликозидацетилтрансферазы (*aac(6)-Ib-cr*), оксациллиназы OXA-1 (*bla<sub>OXA-1</sub>*), хлорамфениколацетилтрансферазы (*catB<sub>3</sub>*).

Дендрограмма нуклеотидных последовательностей плазмид IncR исследуемых штаммов *K. pneumoniae* относительно полногеномных последовательностей плазмид IncR *K. pneumoniae*, депонированных в базу данных GenBank, представлена на рис. 2.

Результаты филогенетического анализа показали, что последовательности всех трех штаммов

группируются в единый кластер только с плазмидой Kp\_Goe\_629-1 штамма *K. pneumoniae* Kp\_Goe\_62629.

Обнаруженная в структуре мобилома всех трех штаммов клебсиелл Col-подобная плаزمиды длиной 3.5–3.6 тыс. пн является высокоомологичной (99%) с нуклеотидной последовательностью короткой плазмиды pB1023 (номер GenBank JQ319770.1) штамма *E. cloacae* BB1092 и плазмиды plasmid4 (номер GenBank CP034043.1) штамма *K. pneumoniae* CRK0298. В структуре плазмиды выявлены только гены, ответственные за мобилизацию и репликацию. Относительно базы данных RefSeq NCBI (для таксона *K. pneumoniae*) высокоомологичные последовательности длиной от 3 тыс. до 7.3 тыс. пн обнаружены у более 30 штаммов клебсиелл, изолированных в различных странах мира, включая Российскую Федерацию.

Как уже было сказано выше, штамм *K. pneumoniae* KP1083 характеризуется наличием дополнительно двух репликонов H11B и F1B, имеющих высокий уровень идентичности с соответствующими последовательностями плазмиды pNDM-MAR. Таким образом, мы предположили, что репликон IncF1B также входит в структуру плазмиды IncH11B штамма *K. pneumoniae* KP1083. Подбор контигов, относящихся к плазмиде IncH11B/F1B исследуемого штамма, проводился относительно последовательности pNDM-MAR. При анализе нуклеотидной последовательности плазмиды IncH11B/F1B обнаружены гены аэробактина (*iucABCDiutA*), а так-

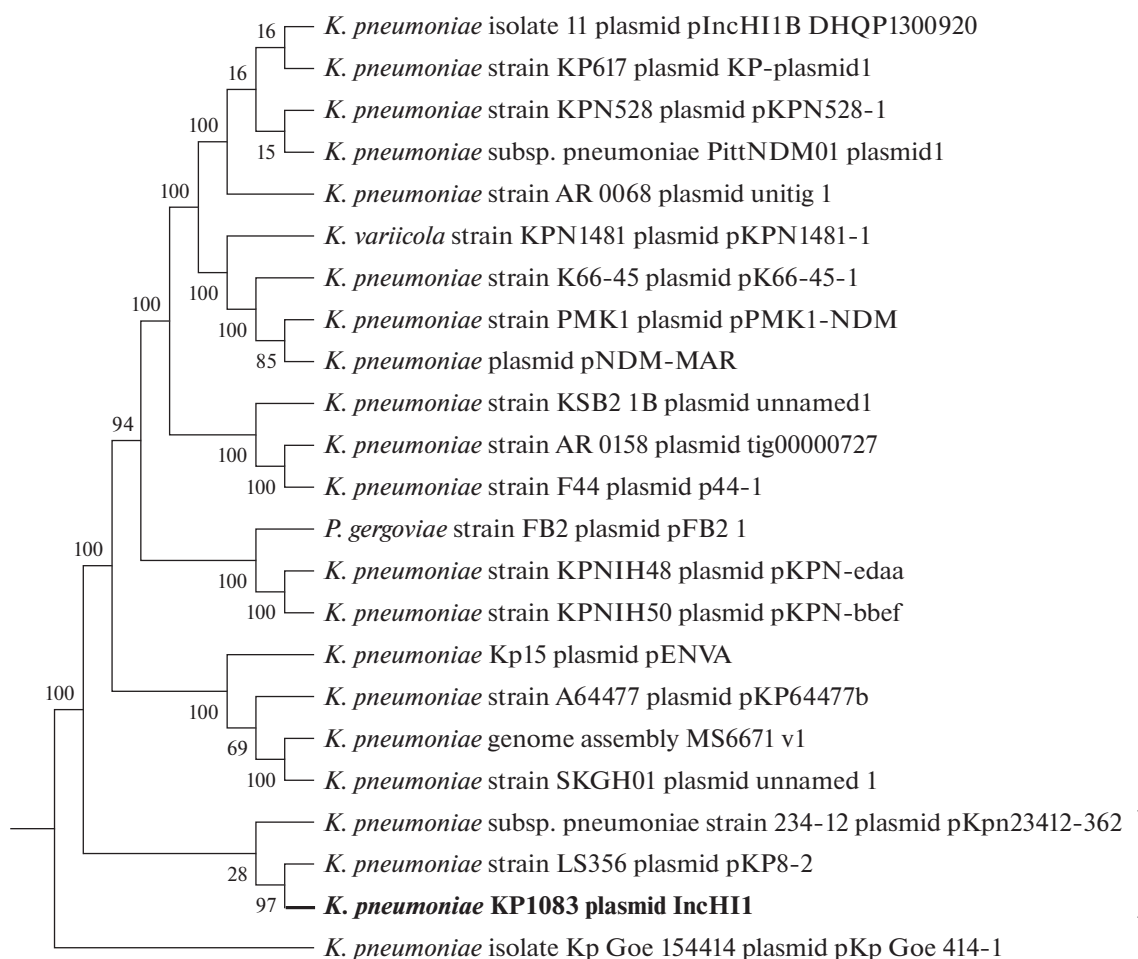


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основании сравнения нуклеотидных последовательностей плазмид IncHI1B/F1B штаммов *K. pneumoniae*.

же гены, определяющие устойчивость к ионам теллура (*terEX*) (табл. 1).

На рис. 3 представлены результаты филогенетического анализа относительно полногеномных последовательностей плазмид IncHI1B/F1B.

Полученные данные свидетельствуют, что последовательности плазмиды IncHI1B штамма *K. pneumoniae* KP1083 имеют высокое филогенетическое родство с нуклеотидной последовательностью плазмиды pKP8-2 (номер GenBank CP025638.1) штамма *K. pneumoniae* LS356 (Китай, 2011 г.).

Часть контигов, входящих в структуру мобилома штамма *K. pneumoniae* KP1083, не удалось отнести к какой-либо плазмиде с использованием сервиса BLASTN. Некоторые из них содержат мобильные элементы, сцепленные с детерминантами антибиотикорезистентности. Так, в контиге MRYM02000086.1 выявлен неполный интегрон первого класса, представленный только 5'CS-участком, включающим интегразу и гены устойчивости к триметоприму (*dfra17*) и аминогликозидам

(*aadA3*). В контиге MRYM02000075.1 обнаружен *Tn3*-подобный элемент, несущий транспозазу семейства *TnAs3* и детерминанту устойчивости к фениколам (*catA1*). В структуре контига MRYM02000063.1 определены инсерционный элемент *ISCR1* (insertion sequence common region) [22], ген метилазы 16S рНК (*arma*), обеспечивающей устойчивость к аминогликозидам, *IS4*-подобный элемент (*ISEc29* семейства транспозаз) с генами белка защиты мишени *Msr(E)* и макролид 2'-фосфотрансферазы (*mphE*), вся структура фланкирована инвертированными остатками *IS6* транспозаз. В контиге MRYM02000093.1 обнаружена укороченная (127 пн) последовательность интегразы интегрона класса 1, с которой сцеплены гены аденилилтрансфераз: *ant(2'')-Ia* (*aadB*) и *ant(3'')-Ia* (*aadA1*).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Характерной особенностью энтеробактерий, в том числе *K. pneumoniae*, является одновременное

Таблица 1. Общая характеристика мобилома штаммов *Klebsiella pneumoniae*

Штамм	Группы несовместимости плазмид	Референс-геномы плазмид	Номера контигов в базе данных GenBank	Детерминанты антибиотикорезистентности	Детерминанты патогенности
KP59	Incl/M	JN626286.1	MIRVH02000033.1, MIRVH02000046.1, MIRVH02000060.1, MIRVH02000070.1, MIRVH02000072.1, MIRVH02000080.1, MIRVH02000100.1	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	
			MIRVH02000044.1, MIRVH02000048.1, MIRVH02000049.1, MIRVH02000053.1, MIRVH02000054.1, MIRVH02000056.1, MIRVH02000058.1, MIRVH02000061.1, MIRVH02000062.1, MIRVH02000063.1, MIRVH02000064.1, MIRVH02000065.1, MIRVH02000066.1, MIRVH02000067.1, MIRVH02000070.1, MIRVH02000072.1, MIRVH02000080.1, MIRVH02000081.1, MIRVH02000083.1, MIRVH02000092.1	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>qnrS</i> <sub>1</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul</i> <sub>1</sub> , <i>dfra</i> <sub>1</sub> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>catB</i> <sub>3</sub> , <i>catA</i> <sub>1</sub>	
			MIRVH02000055.1		
			MIRYN02000034.1, MIRYN02000046.1, MIRYN02000061.1, MIRYN02000070.1, MIRYN02000072.1, MIRYN02000083.1, MIRYN02000103.1	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	
KP314	Incl/M	CP018365.1	MIRYN02000044.1, MIRYN02000050.1, MIRYN02000051.1, MIRYN02000055.1, MIRYN02000056.1, MIRYN02000058.1, MIRYN02000062.1, MIRYN02000063.1, MIRYN02000064.1, MIRYN02000066.1, MIRYN02000067.1, MIRYN02000071.1, MIRYN02000073.1, MIRYN02000083.1, MIRYN02000084.1, MIRYN02000092.1, MIRYN02000111.1, MIRYN02000093.1, MIRYN02000099.1	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>qnrS</i> <sub>1</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul</i> <sub>1</sub> , <i>dfra</i> <sub>1</sub> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>catB</i> <sub>3</sub> , <i>catA</i> <sub>1</sub>	
			MIRYN02000057.1		
			MIRYM02000034.1, MIRYM02000064.1	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	
			MIRYM02000059.1, MIRYM02000066.1, MIRYM02000075.1, MIRYM02000076.1, MIRYM02000080.1, MIRYM02000089.1, MIRYM02000090.1, MIRYM02000091.1, MIRYM02000092.1, MIRYM02000094.1, MIRYM02000096.1, MIRYM02000099.1, MIRYM02000104.1, MIRYM02000107.1	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>qnrS</i> <sub>1</sub> , <i>tet(A)</i> , <i>sul</i> <sub>1</sub> , <i>dfra</i> <sub>1</sub> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>catA</i> <sub>1</sub> , <i>catB</i> <sub>3</sub>	
KP1083	Incl/M	CP018365.1	MIRYM02000026.1, MIRYM02000033.1, MIRYM02000039.1, MIRYM02000046.1, MIRYM02000049.1, MIRYM02000054.1, MIRYM02000072.1, MIRYM02000081.1, MIRYM02000097.1, MIRYM02000123.1		<i>iucABCD</i> , <i>iutA</i> , <i>terEX</i>
			MIRYM02000083.1		
			MIRYM02000063.1	<i>ISCR1</i> , <i>armA</i> , <i>mstE</i> , <i>mphE</i>	
			MIRYM02000086.1	<i>Int1</i> , <i>dfra</i> <sub>17</sub> , <i>aadA</i> <sub>5</sub>	
	Col440I/440II	JQ319770.1		$\Delta$ <i>Int1</i> , <i>aadB</i> , <i>aadA</i> <sub>1</sub>	

присутствие в структуре генома нескольких плазмид, принадлежащих к разным группам несовместимости и несущих детерминанты множественной лекарственной устойчивости. Известно, что многокопийные плазмиды могут иметь малый размер (1.3–3.75 тыс. пн), а низкокопийные – большой (105 тыс. пн и выше) [3, 5].

У всех трех исследуемых штаммов *K. pneumoniae* обнаружена Col-подобная плазида, встречающаяся не только у представителей *K. pneumoniae*, но и у *E. cloacae*. Данная Col-подобная плазида не несет в своей структуре детерминант патогенности и антибиотикорезистентности, однако по данным литературы некоторые группы Col-плазмид, в частности представители ColE1, характеризуются наличием таких детерминант за счет приобретения Tn3-подобных транспозонов [3].

Нуклеотидная последовательность плазмиды резистентности IncR, выявленная у всех исследуемых штаммов клебсиелл, содержит детерминанту *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Обнаружение гена CTX-M-15 цефалоспорины в структуре плазмиды, принадлежащей группе несовместимости R, является нехарактерным, поскольку согласно представленным в литературе сведениям данная детерминанта наиболее часто детектировалась в составе плазмид IncF (FIA, FIB, FII), IncI, IncN, IncHI2, IncL/M и IncK [5, 23]. Описанию генетического окружения гена CTX-M-15 цефалоспорины посвящено значительное число работ, в которых показано наличие большого генетического разнообразия в участках ДНК бактерий семейства Enterobacteriaceae, прилегающих к генам *bla*<sub>CTX-M</sub>. Известно, что первичная мобилизация гена *bla*<sub>CTX-M-15</sub> произошла в результате встраивания последовательности *ISEcp1*, в дальнейшем в структуре *ISEcp1* отмечается появление делеции и инсерции последовательностей *IS26*, *IS1*, *IS10*, *resTn2*, *resTn3* в разных ориентациях [5, 6, 23, 24]. В нашем исследовании выявлена конструкция, в которой последовательность *ISEcp1* разрушена инсерционным элементом  $\Delta IS26$ . При этом расстояние между *ISEcp1* и геном *bla*<sub>CTX-M-15</sub> в 48 пн сохранилось, что свидетельствует о продолжении процесса рекомбинационных перестроек, а не является новым случаем мобилизации. Необходимо отметить, что в структуре высокомолекулярной последовательности плазмиды Kp\_Goe\_629-1 участок  $\Delta ISEcp1$ -*bla*<sub>CTX-M-15</sub>-*wbuC*- $\Delta Tn3$  фланкирован целыми последовательностями *IS26*. Примеры разрушения мобильного элемента *ISEcp1* инсерционной структурой *IS26* описывались ранее в штаммах *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенных в Индии в 2003–2005 гг. [24]. Отметим, что высокомолекулярные последовательности обнаружены в плазмидах штаммов клебсиелл других групп несовместимости, депонированных в базу данных GenBank.

Все три исследуемых нами штамма клебсиелл содержат детерминанту OXA-48 карбапенемазы, находящуюся в структуре плазмиды IncL/M, однако детальное изучение генетического окружения гена *bla*<sub>OXA-48</sub> выявило отличия между штаммами, что подтверждается результатами филогенетического анализа и свидетельствует о разных источниках приобретения данной плазмиды.

Мобилом штамма *K. pneumoniae* KP1083 характеризуется более широким набором как плазмид, так и детерминант резистентности и патогенности. Согласно результатам филогенетического анализа нуклеотидная последовательность плазмиды IncHI1B/FIB данного штамма – наиболее близкородственная последовательность плазмиды вирулентности рKP8-2. Сходством является отсутствие детерминант антибиотикорезистентности в структурах обеих плазмид, однако есть и существенные отличия, например у плазмиды рKP8-2 отсутствует репликон FIB, а в структуре плазмиды IncHI1B/FIB исследуемого штамма – кластер генов катехол-содержащего сидерофора (*iroBCDN*) и регулятора мукоидного фенотипа *rmpA*. Отметим, что в единый кластер с плазмидами IncHI1B/FIB штамма *K. pneumoniae* KP1083 и рKP8-2 входит последовательность плазмиды рKpn23412\_362 (номер GenBank CP011314.1) штамма *K. pneumoniae* 234-12 (Германия, 2011 г.), содержащая репликоны IncHI1B/FIB/Q1 [25] и несущая детерминанты множественной лекарственной устойчивости.

В мобиломе штамма *K. pneumoniae* KP1083 присутствуют контиги неустановленной локализации (плазмидной или хромосомной), нуклеотидная последовательность которых содержит детерминанты антибиотикорезистентности, сцепленные с мобильными элементами. Это связано с широким распространением данных мобильных структур, которые могут встречаться как в хромосоме, так и плазмидах бактерий – представителей семейства Enterobacteriaceae. Так, среди исследуемых штаммов клебсиелл лишь штамм *K. pneumoniae* KP1083 имеет структуру, содержащую интегразу, встречающуюся у интегронов первого класса. По данным литературы интегроны первого класса наиболее часто детектируются у штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра [1, 2, 4, 6, 7]. Проведенное исследование *in silico* не позволило определить целую структуру интегрона, поскольку консервативными участками являются последовательности 5'CS (контиг MRYM02000086.1) и 3'CS (контиг MRYM02000104.1) концов, в то время как средняя часть вариабельна и может содержать любой набор кассетных генов [7, 26]. В результате поиска гомологичных последовательностей с помощью сервиса BLASTN относительно базы данных GenBank установлено, что интегроны класса 1, содержащие только кас-

сетные гены *dfrA*<sub>17</sub> и *aadA*<sub>5</sub>, имеют широкое распространение среди представителей семейства Enterobacteriaceae, в том числе бактерий родов *Salmonella* и *Shigella*, что подтверждается данными литературных источников [7, 22, 27].

Нуклеотидная последовательность еще одного контига штамма *K. pneumoniae* KP1083 по результатам аннотирования содержит укороченную последовательность гена интергазы интегрона класса I, сцепленного с детерминантами *aadB* и *aadA*<sub>1</sub>. Описание подобной структуры интегрона первого класса для штаммов *K. pneumoniae* в литературе отсутствует. Однако анализ последовательности данного контига с помощью сервиса BLASTN относительно полных геномов, представленных в базе данных GenBank, позволил определить высокоомологичные последовательности (более 99%) в составе интегров класса I, выявленных у некоторых представителей разных видов бактерий. Например: в структуре плазмиды *unitig\_1* (номер GenBank CP021733.1) штамма *E. coli* AR\_0114, который содержит касетные гены *aadB*, *aadA*<sub>1</sub>, *clmA6*; в транспозоне *Tn1412 P. aeruginosa* 2293 (L36547.1); в хромосоме *Trueperella pyogenes* TP1 (номер GenBank CP033902.1); в транспозоне *Tn2426 Shigella sonnei* (номер GenBank M86913.1); в интегоне *In547 P. aeruginosa* Paе 2002 (номер GenBank KC879156.1) [28] и др.

Интересным фактом является присутствие нуклеотидной последовательности, содержащей инсерционную структуру *ISCR1*, с которой сцеплены гены трех детерминант антибиотикоустойчивости. Во многих работах показано, что *ISCR* может находиться в структуре интегрона, обеспечивая, таким образом, его мобилизацию [7, 22, 27, 28]. В частности, в результате поиска относительно базы данных RefSeq выявлен штамм *K. pneumoniae* kрneu013, у которого в последовательности одного контига (UWVW01000002.1) участок, содержащий *ISCR1* и имеющий уровень идентичности 99% с последовательностью контига MRYM02000063.1, как раз находится в составе интегрона класса I. Такая же последовательность выявлена и в составе интегрона класса I в плазмиде рPMK1-NDM штамма *K. pneumoniae* PMK1 (номер GenBank CP008933.1). Однако в базе данных описаны штаммы *K. pneumoniae*, у которых инсерционный элемент не является частью интегрона. В целом необходимо отметить, что высокоомологичная инсерционная структура *ISCR1*, сцепленная с детерминантами *armA*, *msrE* и *mphE*, имеет широкое распространение среди штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в таких странах, как Непал, Турция, Китай, ЮАР, Филиппины и Пакистан.

Таким образом, результаты проведенного нами исследования выявили неоднородность структуры мобилома штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у пациентов одного травматологического отделения

медицинского учреждения и принадлежащих к одному сиквенс-типу. Мобилом одного штамма имеет более сложную структуру, в которой выявлено наличие инсерционной структуры *ISCR1*, и предположительно двух интегров класса I, несущих детерминанты антибиотикорезистентности. Один интегрон с касетными генами *dfrA*<sub>17</sub> и *aadA*<sub>5</sub> имеет широкое распространение среди представителей разных видов бактерий и является, по-видимому, одним из наиболее “успешных” в распространении детерминант антибиотикорезистентности. Другой интегрон, содержащий гены *aadB* и *aadA*<sub>1</sub>, которые ранее обнаруживались в составе транспозонов, впервые выявлен в структуре мобилома *K. pneumoniae*. В связи с этим вероятно, что штамм *K. pneumoniae* KP1083 — источник распространения дополнительных детерминант антибиотикорезистентности среди штаммов не только *K. pneumoniae*, но и представителей других видов, относящихся к возбудителям нозокомиальных инфекций.

Исследование не имело спонсорской поддержки.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paczosa M.K., Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2016. V. 80. № 3. P. 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
2. Hou X.-H., Song X.-Y., Ma X.-B. et al. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates // Braz. J. Microbiol. 2015. V. 46. № 3. P. 759–768. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140138>
3. Ramirez M.S., Traglia G.M., Lin D.L. et al. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm // Microbiol. Spectr. 2014. V. 2. № 5. P. 1–15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013>
4. Navon-Venezia S., Kondratyeva K., Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance // FEMS Microbiol. Rev. 2017. V. 41. № 3. P. 252–275. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>
5. Фурсова Н.К., Прячук С.Д., Абаев И.В. и др. Генетическое окружение генов *bla*<sub>CTX-M</sub>, локализованных на конъюгативных плаزمидах нозокомиальных изолятов Enterobacteriaceae, выделенных в России в 2003–2007 гг. // Антибиотики и химиотерапия. 2010. Т. 55. № 11–12. С. 3–10.



6. Partridge S.R. Analysis of antibiotic resistance regions in gram-negative bacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2011. V. 35. № 5. P. 820–855.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277>
7. Kaushik M., Kumar S., Kapoor R.K. et al. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018. V. 51. № 2. P. 167–176.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
8. Bankevich A., Nurk S., Antipov D. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J. Comput Biol.* 2012. V. 19. № 5. P. 455–477.  
<https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
9. Altschup S.F., Gish W., Miller W. et al. Basic local alignment search tool // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
10. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A. et al. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2014. V. 58. № 7. P. 3895–3903.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>
11. Siguier P., Perochon J., Lestrade L. et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 34. P. 32–36.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>
12. Moura A., Soares M., Pereira C. et al. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 8. P. 1096–1098.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
13. Tatusova T., Ciufu S., Fedorov B. et al. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 553–559.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkt1274>
14. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M.I. et al. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads // *Mol. Biol. Evol.* 2014. V. 31. № 5. P. 1077–1088.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msu088>
15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
16. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. № 4. P. 406–425.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
17. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Солнцев Л.А. и др. Молекулярное типирование клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра действия // *Клин. лаб. диагн.* 2017. Т. 62. № 11. С. 699–704.  
<https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-11-699-704>
18. Villa L., Poirel L., Nordmann P. et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes // *J. Antimicrob. Chemother.* 2012. V. 67. № 7. P. 1645–1650.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dks114>
19. Giani T., Conte V., Di Pilato V. et al. *Escherichia coli* from Italy producing OXA-48 carbapenemase encoded by a novel Tn1999 transposon derivative // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 4. P. 2211–2213.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00035-12>
20. Poirel L., Bonnin R. A., Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48 // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012. V. 56. № 1. P. 559–562.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11>
21. Bailey J.K., Pinyon J.L., Anantham S. et al. Distribution of the blaTEM gene and blaTEM-containing transposons in commensal *Escherichia coli* // *J. Antimicrob. Chemother.* 2011. V. 66. № 4. P. 745–751.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkq529>
22. Rui Y., Lu W., Li S. et al. Integrons and insertion sequence common region 1 (ISCR1) of carbapenem-non-susceptible Gram-negative bacilli in fecal specimens from 5000 patients in southern China // *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2018. V. 52. № 5. P. 571–576.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.06.015>
23. Прячук С.Д. Идентификация специфичных маркеров для характеристики множественно-устойчивых госпитальных штаммов *Enterobacteriaceae*: Дис. ... канд. биол. наук. Оболенск: Гос. науч. центр прикл. микробиологии и биотехнологии, 2011. 191 с.
24. Ensor V.M., Shahid M., Evans J.T. et al. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* from Indian hospitals // *J. Antimicrob. Chemother.* 2006. V. 58. № 6. P. 1260–1263.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkl422>
25. Becker L., Bunk B., Eller C. et al. Complete genome sequence of a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak strain from multilocus sequence type 514 // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 4. 2 p.  
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00742-15>
26. Ильина Т.С. Мобильные ISCR-элементы: структура, функции и роль в создании, наращивании и распространении блоков бактериальных генов множественной резистентности к антибиотикам // *Мол. ген. микробиол. вирусол.* 2012. № 4. С. 3–13.
27. Томова А., Иванова Л., Buschmann A.H. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes and class 1 integrons in quinolone-resistant marine bacteria and clinical isolates of *Escherichia coli* from an aquacultural area // *Microb. Ecol.* 2018. V. 75. № 1. P. 104–112.  
<https://doi.org/10.1007/s00248-017-1016-9>
28. Quiroga M.P., Arduino S.M., Merquier A.K. et al. Distribution and functional identification of complex class 1 integrons // *Infect. Genet. Evol.* 2013. V. 19. P. 88–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.06.029>

## The Mobilome of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates

A. E. Alekseeva<sup>a,\*</sup>, N. F. Brusnigina<sup>a</sup>, and N. A. Gordinskaya<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology Name acad. I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

<sup>b</sup>*Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, 603005 Russia*

\*e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

The mobilome structure of the extended spectrum beta-lactamases CTX-M-15 and OXA-48 carbapenemas-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates an epidemically common sequence type 395 is characterized. According to the *in silico* analysis in the mobilome of all strains, the presence of a Col-like plasmid and replicons of the R and L/M incompatibility groups was established. The genetic regions surrounding *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> genes were analyzed and the variants of mobile structures involved in these genes distribution were described. In the mobilome structure of *K. pneumoniae* strain KP1083 was found an additional plasmid H11B/FIB, which nucleotide sequence has phylogenetic relationship with the plasmid pNDM-MAR, as well as a wide range of mobile structures linked to antibiotic resistance determinants, in particular, insertion structures ISCR1 and two integrases related to class 1 integrons.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, plasmids, incompatibility groups, OXA-48, CTX-M-15, IS, integron, ISCR1.