

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ КОМПЛЕКСА ВИДОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

РЕЗЮМЕ

Белькова Н.Л.¹,
Клименко Е.С.¹,
Немченко У.М.¹,
Григорова Е.В.¹,
Ситникова К.О.¹,
Зугеева Р.Е.¹,
Смулова Н.Е.¹,
Чемезова Н.Н.^{1,2},
Савилов Е.Д.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России (664049, г. Иркутск, Юбилейный, 100, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Белькова Наталья Леонидовна,
e-mail: nlbelkova@gmail.com

Комплекс видов *Klebsiella pneumoniae* (Kp) представляет собой генетически и экологически разнообразную группу бактерий, вызывающую широкий спектр инфекций у людей и животных.

Цель исследования. Биологическая характеристика и генотипирование на основе изучения разных локусов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*.

Материалы и методы. Объектом исследования стали три клинических изолята Kp, выделенные из разных биотопов пациентов детского многопрофильного стационара регионального уровня. В работе использован комплекс бактериологических, молекулярно-генетических и биоинформационных методов. Генотипирование изолятов проводили с использованием сервиса Института Пастера для штаммов видового комплекса *K. pneumoniae*.

Результаты. Все штаммы были чувствительны к антимикробным препаратам групп карбапенемы (имипенем, меропенем) и тетрациклины (тигезиклин) и демонстрировали высокую чувствительность к бактериофагу клебсиелл поливалентный. У изолятов Kp ODKB-16 и ODKB-81 отмечена антибиотикорезистентность к семи и восьми антимикробным препаратам соответственно.

Согласно результатам мультилокусного типирования, все штаммы отнесены к филогруппе Kp1, имели K2-тип и различались по сиквенс-типам, профилю *scgMLST629* и *KL-типу*. Штамм Kp ODKB-16 был определен как ST-65, *scgST-11107*, *KL2*; ODKB-07 – как ST-219, *scgST-6401*, *KL125KL114*; ODKB-81 – как ST-86, *scgST-2800*, *KL2KL30*. Кластеры генов вирулентности *AbST*, *CbST*, *YbST*, *SmST* и *RmST* были охарактеризованы только в геноме изолята Kp ODKB-16, что позволяет охарактеризовать его как высоковирулентный с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Дополнительно у всех штаммов выявлены гены, ответственные за синтез фимбриальных адгезинов 1-го и 3-го типов, а локусы *ter*-оперона – только у Kp ODKB-16. Анализ резистома показал, что все штаммы имели генотип 2b. Плазмиды были определены в геномах Kp ODKB-81 (*Incl2*) и ODKB-16 (*IncFIA* + *IncFIB* + *IncHI1B*).

Заключение. Использована комплексная схема для геномной таксономии клинических изолятов, которая может способствовать унификации глобальных и региональных особенностей возникновения и микроэволюции бактериальных патогенов.

Ключевые слова: комплекс видов *Klebsiella pneumoniae*, генотипирование, мультилокусный анализ, множественная антибиотикорезистентность, антимикробные препараты, вирулентность

Для цитирования: Белькова Н.Л., Клименко Е.С., Немченко У.М., Григорова Е.В., Ситникова К.О., Зугеева Р.Е., Смулова Н.Е., Чемезова Н.Н., Савилов Е.Д. Биологические свойства и генетическая структура клинических изолятов комплекса видов *Klebsiella pneumoniae*. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 53-63. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.6

Статья поступила: 28.08.2023

Статья принята: 17.01.2024

Статья опубликована: 26.03.2024

BIOLOGICAL PROPERTIES AND GENETIC STRUCTURE OF CLINIC ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SPECIES

Belkova N.L.¹,
 Klimenko E.S.¹,
 Nemchenko U.M.¹,
 Grigorova E.V.¹,
 Sitnikova K.O.¹,
 Zugeeva R.E.¹,
 Smurova N.E.¹,
 Chemezova N.N.^{1,2},
 Savilov E.D.¹

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazeva str. 16, Irkutsk 664003, Russian Federation)

² Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Yubileyny 100, Irkutsk 664049, Russian Federation)

Corresponding author:
Natalia L. Belkova,
 e-mail: nlbelkova@gmail.com

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*Kp*) species complex is a genetically and ecologically diverse group of bacteria that causes a wide range of infections in humans and animals.

The aim. To carry out biological characterization and genotyping based on the study of different loci of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates.

Materials and methods. The object of the study was three *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from different biotopes of patients from a regional children's multidisciplinary hospital. We used a complex of bacteriological, molecular genetic and bioinformatic methods. Genotyping of the isolates was carried out using the Pasteur Institute service for strains of the *K. pneumoniae* species complex.

Results. All strains were sensitive to antimicrobial drugs from carbapenem (imipenem, meropenem) and tetracycline groups (tigecycline), and demonstrated high sensitivity to the *Klebsiella* polyvalent bacteriophage. The antibiotic resistance of the *Kp* ODKB-16 and ODKB-81 isolates to seven and eight antimicrobial drugs, respectively, was registered.

Based on the results of multi-locus sequence typing, all strains were assigned to *Kp*1 phylogroup, *K2* type and differed in sequence type, *scgMLST629* profile and *KL* type. *Kp* ODKB-16 strain was identified as *ST-65*, *scgST-11107*, *KL2*; ODKB-07 strain – as *ST-219*, *scgST-6401*, *KL125KL114*; ODKB-81 strain – as *ST-86*, *scgST-2800*, *KL2KL30*. The virulence gene clusters *AbST*, *CbST*, *YbST*, *SmST*, and *RmST* have been characterized only in the genome of the *Kp* ODKB-16 isolate, allowing it to be characterized as highly virulent with multidrug resistance (MDR). Additionally, genes responsible for the synthesis of types 1 and 3 fimbrial adhesins were registered in all strains, and *ter* operon loci were identified only in *Kp* ODKB-16. Resistome analysis showed that all strains had 2b genotype. Plasmids were found in the genomes of *Kp* ODKB-81 (*IncI2*) and ODKB-16 (*IncFIA* + *IncFIB* + *IncHI1B*).

Conclusion. We used a comprehensive framework for genomic taxonomy of clinical isolates, which can contribute to the unification of global and regional peculiarities of the developing and microevolution of bacterial pathogens.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* species complex, genotyping, multilocus analysis, multiple antibiotic resistance, antimicrobial drugs, virulence

Received: 28.08.2023

Accepted: 17.01.2024

Published: 26.03.2024

For citation: Belkova N.L., Klimenko E.S., Nemchenko U.M., Grigorova E.V., Sitnikova K.O., Zugeeva R.E., Smurova N.E., Chemezova N.N., Savilov E.D. Biological properties and genetic structure of clinic isolates of *Klebsiella pneumoniae* species. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(1): 53-63. doi: 10.29413/ABS.2024-9.1.6

ОБОСНОВАНИЕ

Комплекс видов *Klebsiella pneumoniae* представляет собой генетически и экологически разнообразную группу бактерий, вызывающую широкий спектр инфекций у людей и животных [1]. Учитывая его разнообразие, а также эволюционную динамику, множественную лекарственную устойчивость и вирулентность, разрабатываются схемы типирования штаммов *K. pneumoniae* [1–3]. Нечёткое определение вида микроорганизмов и горизонтальный перенос генов лежат в основе обширной штаммовой гетерогенности их фенотипов, имеющей экологическое, медицинское и/или промышленное значение [4]. Очевидно, что наиболее успешной таксономической системой для генетического типирования микробных штаммов является подход мультилокусного секвенирования [5, 6]. Эта система используется для исследований популяционной биологии и надзора за бактериальными патогенами в общественном здравоохранении [7]. Для комплекса видов *K. pneumoniae* разработано несколько схем генотипирования на основе разных локусов: собственно мультилокусное типирование (MLST, multi-locus sequence typing) [8], мультилокусное типирование по основному геному (cgMLST, core genome multi-locus sequence typing) [2, 3], типирование по генам *wzc* и *wzi* [9], а также мультилокусное типирование кластеров генов вирулентности (AbST, CbST, YbST, SmST, RmST) и антибиотикорезистентности (аминогликозиды, бета-лактамазы, хинолоны) [2, 10, 11].

Ранее нами было показано, что *K. pneumoniae* в 23,1 % случаев выступает как этиологический фактор развития госпитальных гнойно-септических инфекций в детском многопрофильном стационаре регионального уровня [12]. При изучении микробиологических данных клинически значимых биотопов (кровь, мокрота, моча, раневое содержимое, жидкость брюшной полости, смывы с трахеобронхиального дерева, ликвор) было определено, что наибольшая частота выделения микроорганизмов приходилась на кровь (32,3 %) и мокроту (27,1 %) [12]. Экспериментально было показано, что эти клинические изоляты *K. pneumoniae* с различной эффективностью формируют биоплёнки, показывая разную устойчивость к дезинфицирующим средствам и антимикробным препаратам (АМП) [13–15]. Следует также отметить, что традиционные методы клинической бактериологии не позволяют различать штаммы внутри комплекса видов *K. pneumoniae*, что маскирует истинное клиническое значение каждого сиквенс-типа/филогруппы и их потенциальные эпидемиологические особенности [9]. Исходя из этого положения при выборе штаммов для проведения генетического типирования учитывали биотоп выделения и множественную устойчивость к АМП.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологическая характеристика и генотипирование на основе разных локусов трёх клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из разных биотопов паци-

ентов детского многопрофильного стационара регионального уровня.

МЕТОДЫ

Исследованы три изолята *K. pneumoniae*, выделенные из клинического материала пациентов, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня (г. Иркутск).

Идентификацию изолятов проводили в соответствии с морфологическими, тинкториальными, культуральными и биохимическими свойствами с использованием API-систем «bioMérieux» (Франция) и подтверждали с помощью масс-спектрометрического анализа на приборе ultraflExtreme (Bruker Daltonics, Германия) [16].

Для оценки чувствительности к АМП бактериальную суспензию готовили по стандартной методике с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду. Чувствительность к АМП определяли диско-диффузионным методом на среде Мюллера – Хинтона (HiMedia, Индия); результаты анализировали в соответствии с действующими нормативными документами и интерпретационными таблицами Европейского комитета по определению чувствительности к АМП (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; версия 11.0, действуют с 01.01.2021) [17–19]. Штаммы, соответствующие критерию R, отнесены к категории резистентные, У – чувствительные при увеличенной экспозиции, Ч – чувствительные. В исследование были взяты диски с азтреонамом (АТМ; 30 мкг), амикацином (АК; 30 мкг), амоксициллин-клавулановой кислотой (АМС; 20–10 мкг), гентамицином (GN; 10 мкг), имипенемом (IPM; 10 мкг), меропенемом (MEM; 10 мкг), нетилмицином (NET; 10 мкг), пиперациллин-тазобактамом (РТЗ; 30 мкг – 6 мкг), тигециклином (ТГС; 15 мкг), цефепимом (FEP; 30 мкг), цефтазидимом (CAZ; 10 и 30 мкг) (ООО «НИЦФ», Россия).

Для оценки чувствительности изолятов *K. pneumoniae* к фагам был использован коммерческий препарат бактериофага производства НПО «Микроген» (Россия) с заявленной активностью против клебсиелл – бактериофаг клебсиелл поливалентный (флаконы по 20 мл, серия У387 02.2020; г. Уфа). Определение уровня литической активности (УЛА) бактериофага к изолятам *K. pneumoniae* проводили капельным методом (spot-test) [20, 21].

Полногеномное секвенирование проводили на оборудовании NextSeq 550 (Illumina, США) с использованием наборов реагентов для приготовления библиотек DNA Prep Tagmentation, DNA/RNA UD Indexes Set Tagmentation и NextSeq 500/550 High Output Kit v. 2.5 (300 Cycles) (Illumina, США), согласно рекомендациям производителя. Сборку первичных данных до контигов проводили с помощью SPAdes v. 3.11.1 [22]. Контиги были упорядочены по референсному геному *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 (GenBank CP003200) и откорректированы с помощью MAUVE 2.4.0 (The Darling Lab, Австралия) [23]. Для функциональной аннотации использовали Prokka 1.14.6 (Oregon State

University, США) [24]. Для описания плазмид применяли MOB-Typer (National Microbiology Laboratory, Канада) [25]. Поиск мобильных генетических элементов (МГЭ) (IS-элементов и транспозонов) проводили с помощью IS-finder (Франция) [26].

Генотипы изолятов определяли с использованием базы данных Института Пастера для штаммов видового комплекса *K. pneumoniae* [27] на основе MLST [8], cgMLST [2, 3], типирования по генам *wzc* и *wzi* [9] и MLST кластеров генов вирулентности (AbST, CbST, YbST, SmST, RmST) и антибиотикорезистентности (аминогликозиды, бета-лактамазы, хинолоны) [2, 10, 11].

Данная работа выполнена в рамках темы государственного задания № 121022500179-0 с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» и УНУ «Коллекция микробиоты человека Иркутской области» ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (г. Иркутск).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Краткая характеристика проанализированных изолятов *K. pneumoniae* представлена в таблице 1. Исходя из результатов определения чувствительности к АМП, все штаммы показали устойчивость более чем к двум АМП разных групп, но были чувствительны к имипенему, меропенему (группа карбапенемы) и тигециклину (тетрациклины). Кроме того, все изоляты проявили высокую чувствительность к бактериофагу клебсиелл поливалентный (табл. 1). Следует также отметить, что изоляты *K. pneumoniae* ODKB-16 и ODKB-81 показали резистентность к семи и восьми препаратам соответственно и могут быть определены как штаммы с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ).

Краткие результаты сборки и аннотации геномов приведены в таблице 2. Геномы штаммов были картированы на референсный геном *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 и представлены на рисунке 1. Размеры геномов проанализированных изолятов варьировали незначительно и составили $5,7 \times 10^6$, $5,3 \times 10^6$ и $5,4 \times 10^6$ пар нуклеотидов (п. н.) для *K. pneumoniae* ODKB-16, *K. pneumoniae* ODKB-07 и *K. pneumoniae* ODKB-81 соответственно. Гуанин-цитозиновый (ГЦ) состав соответствовал характеристике вида *K. pneumoniae*. У штаммов *K. pneumoniae* ODKB-16 и *K. pneumoniae* ODKB-81 обнаружены плазмиды, относящиеся к разным группам несовместимости (табл. 3). Следует отметить, что *K. pneumoniae* ODKB-81 несёт плазмиду группы несовместимости IncI2, в то время как *K. pneumoniae* ODKB-16 – комбинированную плазмиду, принадлежащую одновременно нескольким группам (IncFIA + IncFIB + IncHI1B), что является характерной особенностью клинических изолятов. Дополнительно в плазмиде *K. pneumoniae* ODKB-16 была обнаружена релаксаза MOBF-типа и предсказана конъюгативная мобильность. Профаги и интегроны не были найдены ни у одного изолята. МГЭ были представлены инсерционными IS-элементами и Tn-транспозонами. МГЭ семейств IS1380 и IS3 встречались во всех трёх изолятах в хромосоме. Помимо этого, в хромосоме *K. pneumoniae* ODKB-7 были обнаружены IS66, а в *K. pneumoniae* ODKB-16 – IS5- и IS1-элементы. МГЭ данных семейств имеют небольшую длину – от 500 до 2000 п. н. – и не содержат в себе генов, отвечающих за резистентность или патогенность. В плазмиде *K. pneumoniae* ODKB-81 были обнаружены два МГЭ семейств IS481 и IS66, не несущих генов резистентности или вирулентности. В плазмиде *K. pneumoniae* ODKB-16 были обнаружены 18 МГЭ, относящихся к семействам IS1, IS3, IS4, IS5, IS6, IS21, IS66, IS110, IS481, IS630, IS1380, ISNCY и Tn3. Один МГЭ Tn3 семейства включал в себя гены *pbrR*

ТАБЛИЦА 1
КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛЯТОВ КОМПЛЕКСА ВИДОВ *K. PNEUMONIAE*

TABLE 1
SHORT CHARACTERISTICS OF THE ISOLATES FROM *K. PNEUMONIAE* COMPLEX SPECIES

Маркировка изолята	Источник выделения (дата)	Антибиотики		Генотип (23 локуса*)	Бактериофаг клебсиелл поливалентный
		Чувствительность	Резистентность		
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-16	Трахеобронхиальное дерево (06.11.2018)	AMC20-10, IPM10, MEM10, TGC15	AK30, GN10, NET10, PTZ30-6, FEP30, CAZ10, CAZ30, ATM30	2b	3X
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-07	Кровь (21.06.2018)	AK30, GN10, NET10, AMC20-10, PTZ30-6, IPM10, CAZ30, MEM10, TGC15	FEP30, CAZ10, ATM30	2b	3X
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-81	Мокрота (22.10.2019)	IPM10, MEM10, TGC15	AK30, GN10, NET10, AMC20-10, PTZ30-6, FEP30, CAZ10, CAZ30, ATM30	2b	4X

Примечание. * – генотипирование проведено по следующим локусам: blaAMPc, blaBEL, blaCARB, blaCMY, blaCTX_M, blaGES, blaIMP, blaIND, blaKPC, blaLEN, blaNDM, blaOKP_ABCD, blaOXA, blaOXY, blaPER, blaSHV, blaSME, blaTEM, blaVEB, blaVIM.

ТАБЛИЦА 2
КРАТКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СБОРКИ И АННОТАЦИИ
ГЕНОМОВ ИЗОЛЯТОВ КОМПЛЕКСА ВИДОВ
K. PNEUMONIAE

TABLE 2
BRIEF RESULTS ON GENOME ASSEMBLY
AND ANNOTATION STATISTICS OF THE ISOLATES
FROM *K. PNEUMONIAE* COMPLEX SPECIES

Характеристики	<i>K. pneumoniae</i> ODKB-16	<i>K. pneumoniae</i> ODKB-07	<i>K. pneumoniae</i> ODKB-81
Результаты сборки геномов			
Количество прочтений на образец	18 689 678	23 218 431	8 283 075
Число скаффолдов	73	66	61
N50	293 674	308 988	308 386
Результаты аннотации геномов			
Размер генома, п. н.	5 693 553	5 333 942	5 368 963
ГЦ, %	56.69	57.19	57.33
Количество белок-кодирующих последовательностей	5 421	5 085	4 892
Число рРНК	4	7	6
Число тРНК	63	66	54
Количество плазмид	1	Нет	1

ТАБЛИЦА 3
КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМИД ИЗОЛЯТОВ
КОМПЛЕКСА ВИДОВ *K. PNEUMONIAE*

TABLE 3
BRIEFLY CHARACTERISTIC OF PLASMIDS OF THE ISOLATES
FROM *K. PNEUMONIAE* COMPLEX SPECIES

Характеристики	<i>K. pneumoniae</i> ODKB-16	<i>K. pneumoniae</i> ODKB-81
Размер, п. н.	359 611	35 021
ГЦ, %	50.37	43.25
Группы несовместимости	IncFIA+IncFIB+IncHI1B, rep_cluster_1254	IncI2
Вероятное происхождение	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>

(транскрипционный фактор, принадлежащий семейству MerR), *pbrA* (АТРаза Р1В-типа), *pbrB* (интегральный мембранный белок) и *pbrC* (предполагаемая сигнальная пептидаза). Считается, что кластер генов *pbrTRABCD* кодирует уникальный, специфический механизм устойчивости к свинцу [28].

Генетическое типирование *K. pneumoniae* включало определение сиквенс-типа по схемам мультилокусного секвенирования MLST и cgMLST, выявление маркеров, связанных с фенотипическим капсульным серотипированием, а также поиск детерминант вирулентности и антибиотикорезистентности.

Согласно результатам мультилокусного типирования MLST по семи генам *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* и *tonB*, все штаммы показали разный генотип: *K. pneumoniae* ODKB-16 был определён как ST-65, *K. pneumoniae* ODKB-07 – как ST-219, *K. pneumoniae* ODKB-81 – как ST-86 (табл. 4). Все штаммы были отнесены к филогруппе Kp1, *K. pneumoniae* ODKB-16 и *K. pneumoniae* ODKB-81 имели K2-тип по генам *wzc* и *wzi*, но различались по профилю scgMLST629 и KL-типу (табл. 4).

Характеристика профиля вирулентности изолятов *K. pneumoniae* была проведена по кластерам генов вирулентности AbST, CbST, YbST, SmST и RmST, типизирующих по локусам азробактерина, колибактерина, эрсиниабактерина, сальмохелина и семейства белков RmST/RmpADC соответственно. Все кластеры генов вирулентности были идентифицированы и охарактеризованы только в геноме изолята *K. pneumoniae* ODKB-16 (табл. 5); их локализация представлена на картированном геноме (рис. 16). Таким образом, только изолят *K. pneumoniae* ODKB-16 можно охарактеризовать как высоковирулентный с МЛУ.

Дополнительно в геномах был проведён поиск детерминант патогенности, не входящих в перечень маркерных генов и их участков, которые валидированы для типирования штаммов видового комплекса *K. pneumoniae* [27]. Известно, что штаммы комплекса *K. pneumoniae*, имеющие серотип K2, проявляют инвазивные свойства [9]. В структуре хромосомы исследуемых штаммов *K. pneumoniae* были обнаружены гены, ответственные за синтез фимбриальных адгезинов

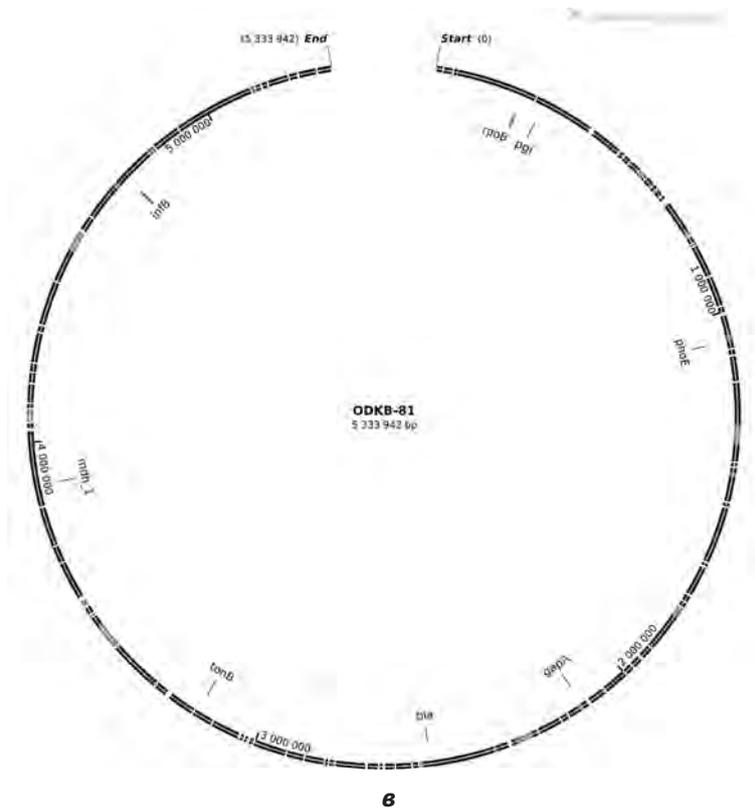


РИС. 1. (продолжение)
Хромосомные карты штаммов *K. pneumoniae* ODKB-81 (в), картированные на референсный геном *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286. В выносках указаны гены, определённые на основании MLST (*gapA*, *infB*, *mdh*, *rgi*, *rhoE*, *rpoB* и *tonB*), а также MLST-анализа детерминант вирулентности (*AbST*, *CbST*, *YbST*, *SmST*, *RmST*) и антибиотикорезистентности

FIG. 1. (continued)
Chromosomal maps of *K. pneumoniae* ODKB-81 (в) strains mapped to the reference genome of *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286. The callouts contain genes identified based on MLST (*gapA*, *infB*, *mdh*, *rgi*, *rhoE*, *rpoB* and *tonB*), as well as on MLST analysis of virulence determinants (*AbST*, *CbST*, *YbST*, *SmST*, *RmST*) and antibiotic resistance

ТАБЛИЦА 4
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ИЗОЛЯТОВ КОМПЛЕКСА ВИДОВ *K. PNEUMONIAE*

TABLE 4
GENETIC PROFILE OF THE ISOLATES FROM *K. PNEUMONIAE* COMPLEX SPECIES

Маркировка изолята	MLST	scgMLST629	Профиль scgMLST629_S					
			LIN код	Филогруппа	Подлиния	Клональная группа	K-type	KL-type
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-16	ST-65	scgST-11107	0_0_391_0_0_0_3_1_0_0	Kp1	SL1471; SL322; SL65	CG1471; CG322; CG65	K2	KL2
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-07	ST-219	scgST-6401	0_0_80_8_0_0_0_7_0_0	Kp1	SL107; SL3157	CG219; CG3157	no	KL125KL114
<i>K. pneumoniae</i> ODKB-81	ST-86	scgST-2800	0_0_395_0_13_1_0_0_0_0	Kp1	SL1471; SL322; SL86	CG1471; CG322; CG86	K2	KL2KL30

ТАБЛИЦА 5
ПРОФИЛЬ ВИРУЛЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТА *K. PNEUMONIAE*
ODKB-16

TABLE 5
VIRULENT PROFILE OF THE *K. PNEUMONIAE*
ISOLATE

AbST/Aerobactin/ <i>iucABCD, iutA*</i>		CbST/Colibactin/ <i>clbABCDEFGHIJLMNOPQ</i>		YbST/Yersiniabactin/ <i>ybtSXQPAUTE, irp2, irp1, fyuA</i>		SmST/Salmochelin/ <i>iroBCDN</i>		RmST/RmpADCproteins/ <i>rmpACD</i>	
Генотип	<i>iuc</i> lineage	Генотип	<i>clb</i> lineage	ICE lineage		Генотип	<i>iro</i> lineage	Генотип	<i>rmp</i> lineage
ST-1	<i>iuc</i> 1	ST-13	<i>clb</i> 3	Ybt-17; ICEKp10		ST-10	<i>iro</i> 1	ST-38	<i>rmp</i> 1; KpVP-1

Примечание. * – название кластера генов/целевой продукт/список генов из генного кластера.

1-го и 3-го типов (*fimA* и *mrkD* соответственно). Однако гены, ответственные за синтез инвазинов, адгезинов – пили Р, α-гемолизина, термолабильных энтеротоксинов, а также за проявление гипермукоидного фенотипа (*rmpA* и *magA*), не обнаружены. В составе геномов был проведён поиск оперона устойчивости к теллуриду (TeO₃⁻², *ter*-оперона), который, как было ранее показано, тесно связан с инфекцией *K. pneumoniae* [29, 30]. Все локусы этого оперона были определены только в высоко вирулентном изоляте с МЛУ *K. pneumoniae* ODKB-16 (рис. 16).

Анализ резистома исследуемых штаммов с использованием сервиса Института Пастера для штаммов видового комплекса *K. pneumoniae* [27] показал, что в геноме трёх штаммов *K. pneumoniae* присутствовали генные кластеры, кодирующие устойчивость к аминогликозидам, бета-лактамазам, хинолонам, и имели генотип 2b, определённый по 23 локусам, кодирующим устойчивость к бета-лактамам антибиотикам. Дополнительно в геномах всех штаммов определили гены *catA* и *sulA*, кодирующие устойчивость к хлорамфениколу и сульфаниламидам соответственно. Ген *fosA*, кодирующий устойчивость к фосфомицину, выявили только в хромосоме изолятов *K. pneumoniae* ODKB-16 и ODKB-81. Одним из механизмов формирования множественной устойчивости к АМП считается наличие эффлюксных насосов. В геномах всех изолятов были определены детерминанты эффлюксных помп и их регуляции *oqxAB*, *acrAB-tolC*, *acrZ*, *cusA*, *marAR*, *soxSR*, *rob*, *ramAR* (семейство RND (Resistance-Nodulation Division)), *mdtM*, *bcr* (семейство MFS (Major Facilitator Superfamily)) и *macAB* (семейство ABC (ATP Binding Cassette)).

ОБСУЖДЕНИЕ

В наших предыдущих исследованиях условно-патогенные бактерии вида *K. pneumoniae* были определены как этиологический фактор развития нозокомиальных генерализованных гнойно-септических инфекций [12], при этом отмечалась их способность к биоплёнкообразованию и устойчивость к дезинфицирующим средствам и АМП [13–15]. Для определения клинического значения и потенциала комплекса видов *K. pneumoniae* исследованы три изолята *K. pneumoniae*, обладающие устойчивостью к АМП разных групп. Следует отметить, что штам-

мы *K. pneumoniae* ODKB-07 и ODKB-81 были изолированы из биотопов, на которые приходится наибольшая частота выделения условно-патогенных микроорганизмов комплекса видов *K. pneumoniae* [12] – это кровь и мокрота соответственно.

Проведённый М. Hennart и соавт. [3] филогенетический анализ комплекса видов *K. pneumoniae* позволил выделить семь основных филогрупп Kp1–Kp7, при этом наиболее представленной является филогруппа Kp1 – группа *K. pneumoniae sensu stricto*. Различными исследованиями показано, что в её филогенетической структуре выявлено большое разнообразие подлиний (SL, *sublineage*) и клональных групп (CG, *clonal groups*), что отражает активный интерес клинических микробиологов к изолятам с множественной лекарственной устойчивостью или/и гипервирулентностью [1, 3, 10, 11]. Филогенетический анализ других филогрупп *K. pneumoniae* выявил различающиеся SL, но они не являлись преобладающими; по-видимому, важные с клинической точки зрения подлинии и клональные группы в этих филогруппах ещё предстоит выявить [3]. Авторы также дополнили схему мультилокусного анализа основного генома (scgMLST, 634 локуса), ранее определённую S. Bialek-Davenet и соавт. [2]. В схему scgMLST629 включено 629 локусов, профиль сочетает LIN код, филогруппу (Kp), подлинию (SL) и клональную группу (CG) [3].

Проанализированные в данной работе изоляты *K. pneumoniae* ODKB-16, ODKB-07 и ODKB-81 на основании анализа MLST отнесены к генотипам ST-65, ST-219 и ST-86. ScgMLST629 анализ позволил выявить сходство с подлиниями SL1471, SL322 и SL65 для *K. pneumoniae* ODKB-16, SL107 и SL3157 для *K. pneumoniae* ODKB-07, а также SL1471, SL322 и SL86 для *K. pneumoniae* ODKB-81.

Следует также отметить наличие разной частоты обнаружения генов вирулентности и устойчивости к АМП среди основных SL и CG [3, 31]. Среди проанализированных изолятов только в геноме *K. pneumoniae* ODKB-16 определены все локусы, согласно профилю вирулентности, предложенному ранее [10, 11]. При этом изолят со средним баллом вирулентности 5 имел средний балл резистентности 1 (1 = ESBL).

В последнее время факт появления высоковирулентных штаммов *K. pneumoniae* с высокой устойчивостью к антибиотикам заставляет исследователей активно изучать механизмы и факторы, обуславливающие появление и выживаемость таких бактерий [29]. Если рас-

смаатривать воздействие АМП на бактерии как реакцию клетки на стрессовый фактор окружающей среды, формирование устойчивости может быть обусловлено разными генетическими детерминантами. С другой стороны, перекрёстная, совместная резистентность, например, к АМП и дезинфицирующим средствам и/или АМП и тяжёлым металлам, может быть обусловлена наличием сходных генетических механизмов формирования фенотипа резистентности [32, 33]. Последними экспериментальными исследованиями с модельными животными было показано, что оперон резистентности к теллуре, известный как *ter*-оперон, ассоциирован с пневмонией и бактериемией, вызванными *K. pneumoniae* [29]. Комплексные исследования *ter*-оперона *K. pneumoniae* на основании геномного и биоинформатического подхода показали, что *ter*-оперон был генетически независим от других локусов вирулентности и устойчивости к антибиотикам, кодируемых плазмидами [29]. В модельных экспериментах с мышами было показано, что *ter*-оперон, тесно связанный с инфекцией, кодирует факторы, которые противостоят стрессу, вызванному местной микробиотой кишечника во время колонизации *K. pneumoniae* [29]. В исследовании, моделирующем инфекцию мочевыводящих путей, была показана роль белка TerC в формировании устойчивости к офлоксацину, полимиксину В и хлориду цетилпиридиния [30], а в совокупности результаты этих исследований указывают на роль *ter*-оперона как фактора персистенции и толерантности к стрессу [29, 30]. Среди проанализированных в данном исследовании штаммов *K. pneumoniae* только в геноме высоковирулентного изолята с МЛУ ODKB-16 охарактеризованы все локусы *ter*-оперона, что свидетельствует о наличии в его геноме дополнительных детерминант толерантности к стрессовым факторам окружающей среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филогруппы, подлинии и клональные группы внутри изолятов комплекса видов *K. pneumoniae* могут существенно различаться по своей экологии и патогенности, и их точное определение важно как в фундаментальных исследованиях, так и в практическом здравоохранении. На основе разных схем типирования мультилокусных последовательностей охарактеризованы геномы трёх клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из клинического материала пациентов. Определён профиль вирулентности, проведено типирование MLST по семи генам и типирование основного генома с 629 генами (*scgMLST62*), все изоляты отнесены к филогруппе Kp1, K2 K-типе и 2b генотипу. Дополнительно охарактеризован *ter*-оперон как фактор толерантности к стрессу. Эта комплексная видоспецифичная схема для геномной таксономии клинических изолятов может быть использована и должна способствовать унификации глобальных и региональных особенностей возникновения и микроэволюции бактериальных патогенов.

Финансирование

Исследование выполнено в рамках госзадания № 121022500179-0.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020; 18(6): 344-359. doi: 10.1038/s41579-019-0315-1
- Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(11): 1812-1820. doi: 10.3201/eid2011.140206
- Hennart M, Guglielmini J, Bridel S, Maiden MCJ, Jolley KA, Criscuolo A, et al. A dual barcoding approach to bacterial strain nomenclature: Genomic taxonomy of *Klebsiella pneumoniae* strains. *Mol Biol Evol*. 2022; 39(7): msac135. doi: 10.1093/molbev/msac135
- Gonzalez JM, Puerta-Fernández E, Santana MM, Rekadwad B. On a non-discrete concept of prokaryotic species. *Microorganisms*. 2020; 8(11): 1723. doi: 10.3390/microorganisms8111723
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(6): 3140-3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140
- Achtman M, Wain J, Weill F-X, Nair S, Zhou Z, Sangal V, et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog*. 2012; 8(6): e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776
- Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.Org website and their applications. *Wellcome Open Res*. 2018; 3: 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 4178-4182. doi: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
- Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51(12): 4073-4078. doi: 10.1128/JCM.01924-13
- Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, Wick RR, Jenney A, Brisse S, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med*. 2018; 10(1): 77. doi: 10.1186/s13073-018-0587-5
- Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom*. 2018; 4(9): e000196. doi: 10.1099/mgen.0.000196
- Носкова О.А., Агапова Е.Д., Батурина Е.А., Гвак Г.В. Микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в детском многопрофильном стационаре. *Acta biomedica scientifica*. 2019;

- 4(5): 122-126. [Noskova OA, Agapova ED, Baturina EA, Gvak GV. Microbiological monitoring in the system of epidemiological surveillance of purulent-septic infections in a multidisciplinary hospital. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 122-126. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.19
13. Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., и др. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(10): 652-658. [Nemchenko UM, Kungurtseva EA, Grigorova EV, Belkova NL, Markova YA, Noskova OA, et al. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020; 65(10): 652-658. (In Russ.)] doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658
14. Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биопленки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. [Savilov ED, Anganova EV, Noskova OA, Dukhanina AV. Bacteria biofilms in purulent-septic infections. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.6
15. Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Кунгурцева Е.А., и др. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2020; 1: 32-35. [Savilov ED, Markova YA, Nemchenko UM, Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, et al. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Pacific Medical Journal*. 2020; 1: 32-35. (In Russ.)]. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35
16. Воропаева Н.М., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Григорова Е.В., Кунгурцева Е.А., Носкова О.А., и др. Идентификация возбудителей инфекционных заболеваний при совместном использовании бактериологической диагностики и MALDI Biotyper. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 88-94. [Voropaeva NM, Belkova NL, Nemchenko UM, Grigorova EV, Kungurtseva EA, Noskova OA, et al. Identification of infectious diseases patterns in the combined use of bacteriological diagnostics and MALDI Biotyper. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 88-94. (In Russ.)] doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.10
17. *Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации; версия 2018-03. М., 2018. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs: Clinical recommendations; version 2018-03. Moscow; 2018. (In Russ.)]. URL: <https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2018.pdf> [дата доступа: 28.08.2023].*
18. *Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: МУК 4.2.1890-04. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: МУК 4.2.1890-04. (In Russ.)]. URL: <https://docs.cntd.ru/document/1200038583> [дата доступа: 28.08.2023].*
19. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. URL: <https://www.eucast.org> [date of access: 28.11.2023].*
20. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Кафтырева Л.А., Бойцов А.Г., Акимкин В.Г., Долгий А.А., и др. *Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике: Федеральные клинические рекомендации. М.; 2014. [Aslanov BI, Zueva LP, Kaftyreva LA, Boytsov AG, Akimkin VG, Dolgiy AA, et al. Rational use of bacteriophages in therapeutic and anti-epidemic practice: Federal clinical guidelines. Moscow; 2014. (In Russ.)].*
21. Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савелькаева М.В., Кунгурцева Е.А., и др. Оценка литической активности препаратов бактериофагов на штаммы *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты толстой кишки у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021; 66(4): 217-222. [Grigorova EV, Rychkova LV, Belkova NL, Nemchenko UM, Savelkaeva MV, Kungurtseva EA, et al. Evaluation of the sensitivity of bacteriophage preparations to *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2021; 66(4): 217-222. (In Russ.)]. doi: 10.51620/0869-2084-2021-66-4-217-222
22. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012; 19(5): 455-477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021
23. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. *Bioinformatics*. 2009; 25: 2071-2073. doi: 10.1093/bioinformatics/btp356
24. Seemann T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30(14): 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153
25. Robertson J, Nash JHE. MOB-suite: Software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom*. 2018; 4(8): e000206. doi: 10.1099/mgen.0.000206
26. IS FINDER. URL: <https://www-is.biotoul.fr> [date of access: 01.12.2023].
27. Institut Pasteur. *Klebsiella pneumoniae* species complex. URL: <https://bigsd.biotoul.fr/klebsiella> [date of access: 28.08.2023].
28. Hynninen A, Touzé T, Pitkänen L, Mengin-Lecreux D, Virta M. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. *Mol Microbiol*. 2009; 74(2): 384-394. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06868.x
29. Vornhagen J, Bassis CM, Ramakrishnan S, Hein R, Mason S, Bergman Y, et al. A plasmid locus associated with *Klebsiella* clinical infections encodes a microbiome-dependent gut fitness factor. *PLoS Pathog*. 2021; 17(4): e1009537. doi: 10.1371/journal.ppat.1009537
30. Mason S, Vornhagen J, Smith SN, Mike LA, Mobley HLT, Bachman MA. The *Klebsiella pneumoniae* ter operon enhances stress tolerance. *Infect Immun*. 2023; 91(2): e0055922. doi: 10.1128/iai.00559-22
31. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. 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
32. Vats P, Kaur UJ, Rishi P. Heavy metal-induced selection and proliferation of antibiotic resistance: A review. *J Appl Microbiol*. 2022; 132(6): 4058-4076. doi: 10.1111/jam.15492

33. Ковальчук С.Н., Федорова Л.С., Ильина Е.Н. Молекулярные механизмы микробной устойчивости к дезинфицирующим средствам. *Антибиотики и химиотерапия*. 2023; 68(1-2): 45-56.

[Kovalchuk SN, Fedorova LS, Ilina EN. Molecular mechanisms of microbial resistance to disinfectants. *Antibiotics and Chemotherapy*. 2023; 68(1-2): 45-56. (In Russ.)]. doi: 10.37489/0235-2990-2023-68-1-2-45-56

Сведения об авторах

Белькова Наталья Леонидовна – кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

Клименко Елизавета Станиславовна – младший научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0979-8816>

Немченко Ульяна Михайловна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: umnemch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7656-342X>

Григорова Екатерина Владимировна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6588-2591>

Ситникова Ксения Олеговна – лаборант-исследователь лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: butakovaksenia505@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7717-906X>

Зугеева Раиса Евгеньевна – лаборант лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: raya.zugeeva@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-8522-7359>

Смурова Надежда Евгеньевна – лаборант-исследователь лаборатории микробиома и микроэкологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: nadinasmurova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-3614-6631>

Чемезова Наталья Николаевна – кандидат медицинских наук, врач-бактериолог, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, e-mail: chemezova_nataly@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5375-7785>

Савилов Евгений Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: savilov47@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9217-6876>

Information about the authors

Natalia L. Belkova – Cand. Sc. (Biol.), Docent, Leading Research Officer at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nlbelkova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-9720-068X>

Elizaveta S. Klimenko – Junior Research Officer at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: klimenko.elizabet@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-0979-8816>

Ulyana M. Nemchenko – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: umnemch@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7656-342X>

Ekaterina V. Grigорова – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6588-2591>

Kseniya O. Sitnikova – Clinical Research Assistant at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: butakovaksenia505@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-7717-906X>

Raisa E. Zugeeva – Clinical Research Assistant at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: raya.zugeeva@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0000-8522-7359>

Nadezhda E. Smurova – Clinical Research Assistant at the Laboratory for Microbiome and Microecology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: nadinasmurova@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0004-3614-6631>

Natalya N. Chemezova – Cand. Sc. (Biol.), Bacteriologist, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; Associate Professor at the Department of Epidemiology and Microbiology, Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, e-mail: chemezova_nataly@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5375-7785>

Evgeny D. Savilov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Chief Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Important Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: savilov47@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-9217-6876>