

УДК [579.842.16:575]:[616-092+615.015.8]

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-1-01>

Молекулярно-генетические маркеры резистентности и вирулентности инвазивных штаммов *Klebsiella pneumoniae* по данным полногеномного секвенирования

Н. А. Бонда¹, И. О. Стома², О. В. Осипкина², А. А. Зятков²,
А. С. Шафорост², Е. В. Карпова², Д. В. Тапальский²

¹Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья, г. Гомель, Беларусь

²Гомельский государственный медицинский университет, г. Гомель, Беларусь

Резюме

Цель исследования. С использованием полногеномного секвенирования оценить генетические механизмы антибиотикорезистентности и вирулентности инвазивных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов.

Материалы и методы. Для двух устойчивых к карбапенемам множественно-антибиотикорезистентных инвазивных штаммов *K. pneumoniae*, а также двух чувствительных к карбапенемам инвазивных штаммов *K. pneumoniae* выполнено секвенирование в геномном секвенаторе MiSeq (Illumina). Проведена сборка геномных последовательностей и их аннотация. Выполнено определение сиквенс-типа, поиск плазмид и факторов вирулентности, генов антибиотикорезистентности и механизмов эффлюкса.

Результаты. Штаммы *K. pneumoniae* относились к сиквенс-типам ST395, ST101, ST111, ST512 и имели гипермукоидный фенотип. Гены аэробактина *iutA* были обнаружены как у чувствительных, так и у резистентных к карбапенемам штаммов. У одного выделенного из крови штамма выявлены гены вирулентности *fimH*, *fyuA*, *irp2*. У двух штаммов выявлены гены карбапенемаз (*blaKPC*, *blaNDM*). Гены устойчивости к аминогликозидам и фторхинолонам выявлены у трех из четырех штаммов. У всех штаммов отмечено присутствие различных систем активного выведения антибиотиков из микробной клетки.

Заключение. Показана возможность идентификации гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* при комплексном использовании фенотипического теста наряду с генотипированием *hlyKp*. Результаты полногеномного секвенирования отражают значительную устойчивость выделенных из крови гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* к большинству антибиотиков, включая β-лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, фосфомицин, хлорамфеникол, полимиксины.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, гипервирулентность, антибиотикорезистентность, полногеномное секвенирование

Вклад авторов. Бонда Н.А.: сбор материала и создание базы данных, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, обсуждение данных, подготовка рукописи; Стома И.О.: концепция и дизайн исследования; Осипкина О.В., Зятков А.А., Шафорост А.С.: получение экспериментальных данных; Карпова Е.В., Тапальский Д.В.: проверка критически важного содержания, редактирование, утверждение рукописи для публикации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Финансовая поддержка отсутствует.

Для цитирования: Бонда НА, Стома ИО, Осипкина ОВ, Зятков АА, Шафорост АС, Карпова ЕВ, Тапальский ДВ. Молекулярно-генетические маркеры резистентности и вирулентности инвазивных штаммов *Klebsiella pneumoniae* по данным полногеномного секвенирования. *Проблемы здоровья и экологии*. 2023;20(1):7–15. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-1-01>

Molecular genetic markers of resistance and virulence of invasive *Klebsiella pneumoniae* strains according to whole genome sequencing data

Nadezhda A. Bonda¹, Igor O. Stoma², Olga V. Osipkina², Aliaksei A. Ziatskov², Alexander S. Shaforost², Elena V. Karpova², Dmitry V. Tapalski²

¹Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Gomel, Belarus

²Gomel State Medical University, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To evaluate genetic mechanisms of antibiotic resistance and virulence of invasive strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from inpatients using whole genome sequencing.

Materials and methods. For two carbapenem-resistant multiple-antibiotic-resistant invasive strains of *K. pneumoniae*, as well as two carbapenem-sensitive invasive strains of *K. pneumoniae*, sequencing was performed using the MiSeq genomic sequencer (Illumina). Genomic sequences were assembled and annotated. Sequence type determination, search for plasmids and virulence factors, antibiotic resistance genes, and efflux mechanisms were performed.

Results. *K. pneumoniae* strains belonged to sequence types ST395, ST101, ST111, and ST512 s and had a hypermucoid phenotype. The *iutA* aerobactin genes were detected in both sensitive and carbapenem-resistant strains. Virulence genes *fimH*, *fyuA*, and *irp2* were detected in one strain isolated from blood. Carbapenemase genes (*blaKPC*, *blaNDM*) were detected in two strains. Aminoglycosides and fluoroquinolones resistance genes were detected in 3 of 4 strains. All strains showed the presence of different systems of active antibiotic elimination from the microbial cell.

Conclusion. The possibility of identifying hypervirulent strains of *K. pneumoniae* using a complex phenotypic test along with hvKp genotyping is shown. The results of full-genome sequencing reflect significant resistance of hypervirulent *K. pneumoniae* strains isolated from blood to most antibiotics, including β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones, phosphomycin, chloramphenicol and polymyxins.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, hypervirulence, antibiotic resistance, whole genome sequencing

Author contributions. Bonda N.A.: collection of material and creation of a database, obtaining experimental data, statistical data processing, article preparation, data discussion; Stoma I.O.: research concept and design; Osipkina O.V., Ziatskov A.A., Shaforost A.S.: obtaining experimental data; Karpova E.V., Tapalski D.V.: verification of critical content, approval of the article for publication.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was conducted without sponsorship

For citation: Bonda NA, Stoma IO, Osipkina OV, Ziatskov AA, Shaforost AS, Karpova EV, Tapalski DV. Molecular genetic markers of resistance and virulence of invasive *Klebsiella pneumoniae* strains according to whole genome sequencing data. *Health and Ecology Issues*. 2023;20(1):7–15. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-1-01>

Введение

Klebsiella pneumoniae является распространенным условно-патогенным микроорганизмом, который часто вызывает внутрибольничные инфекции, включая пневмонию, инфекцию кровотока и мочевыводящих путей [1]. Гипервирулентная *Klebsiella pneumoniae* (hvKp), новый патотип *K. pneumoniae*, впервые была зарегистрирована на Тайване, вызвав гнойный абсцесс печени. В настоящее время hvKp признан важным широко распространившимся патотипом в дополнение к классическому *K. pneumoniae* (сКР), связанным с высокой патогенностью и смертностью из-за гипервирулентности [2, 3]. Факторы, способствующие гипервирулентности, в основном включают капсулы, сидерофоры, липополисахарид (ЛПС) и фимбрии [4]. В изолятах hvKp наличие rLVPK плазмиды большой вирулентности кодируют гены факторов вирулентности, включая регуля-

торы синтеза капсульных полисахаридов (*rmpA* и *rmpA2*) и системы накопления железа (*iucA*, *iutA* и *iro* siderophore gene cluster), метаболический транспортер (*peg-344*), а также гены устойчивости к тяжелым металлам (медь, серебро, свинец и теллурид). rLVPK-подобные плазмиды могут нести все гены факторов вирулентности или утратили некоторые из них [5, 6]. С другой стороны, приобретение устойчивых к антибиотикам плазмид или вставка устойчивых мобильных генетических элементов в плазмиду hvKp превращает их в супербактерии, которые можно назвать гиперрезистентными штаммами hvKp [7, 8, 9]. Некоторые клоны *K. pneumoniae* характеризуются как клоны высокого риска, которые играют важную роль в распространении устойчивых к антибиотикам штаммов [10, 11].

Важно отличать hvKp от классических изолятов *K. pneumoniae*. На сегодняшний день для

идентификации изолятов hvKp используют метод обнаружения гипермуковязкого фенотипа на агаре (string-test, струнный тест). Однако фенотипического теста для выявления hvKp недостаточно, дополнительно рекомендуется определять наличие различных генов вирулентности. Гены *iucA*, *iutA*, *peg-344* были предложены в качестве наиболее надежных диагностических маркеров hvKp [12, 13].

За исключением видовой устойчивости к аминопенициллинам, штаммы hvKp обычно чувствительны к различным антибиотикам, включая цефалоспорины и карбапенемы. В последние годы стали появляться отдельные штаммы *K. pneumoniae*, сочетающие в себе признаки множественной лекарственной устойчивости и гипервирулентности (MDR-hv) в результате горизонтального переноса плазмидно-опосредованной резистентности или вирулентности (обозначаются как MDR-hvKp типа I). Кроме того, штаммы MDR-hvKp могут возникать в результате переноса rLVPK-подобной плазмиды вирулентности в классические штаммы *K. pneumoniae* с множественной устойчивостью к антибиотикам (обозначаются как MDR-hvKp типа II) [14, 15]. Так, штаммы MDR-hvKp типа II, продуцирующие карбапенемазу KPC и имеющие rLVPK-подобную плазмиду вирулентности, вызвали госпитальную вспышку с высокой летальностью в Китае [16].

Желудочно-кишечный тракт является основным биотопом для колонизации *K. pneumoniae*. В дальнейшем инвазивные гипервирулентные штаммы могут преодолевать кишечный барьер, транслоцироваться в печень и вызывать инфекции кровотока. Недавно описанные штаммы hvKp с множественной антибиотикорезистентностью способны вызывать серьезные инвазивные инфекции не только у иммунокомпрометированных лиц, но и у здоровых людей [17, 18].

Распространение hvKp, включая штаммы MDR-hvKp, представляет серьезную угрозу для здоровья населения. Молекулярно-генетические исследования, оценивающие механизмы антибиотикорезистентности и вирулентности hvKp, необходимы для понимания патогенеза и теоретической основы лечения и профилактики инфекции.

Цель исследования

С использованием полногеномного секвенирования оценить генетические механизмы антибиотикорезистентности и вирулентности инвазивных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от госпитализированных пациентов.

Материалы и методы

В исследование включены 2 инвазивных штамма *K. pneumoniae* с устойчивостью к кар-

бапенемам, выделенных из крови, и 2 штамма *K. pneumoniae*, чувствительных к карбапенемам, выделенных из мочи и раневого отделяемого. Штаммы были выделены от госпитализированных пациентов в 2021–2022 гг. в организациях здравоохранения Гомеля (3 штамма) и Гомельской области (1 штамм).

Для проведения полногеномного секвенирования культуры микроорганизмов выращивали на питательном агаре (Nutrient agar, HiMedia, Индия) в течение 24 ч при 35 °С. Одну 2 мкл пластиковую петлю выделенной культуры внесли в 1 мл деонизированной воды, суспендировали вортиксованием, отмытые клетки осаждали центрифугированием — 5 мин при 10 000 об/мин. Супернатант удаляли, полученный осадок из отмытых бактериальных клеток использовали для выделения ДНК. Выделение ДНК из культур *K. pneumoniae* проводили с помощью набора PureLink™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре NanoDrop 1000. Оценку чистоты ДНК производили по соотношениям 260/230, 260/280. После измерения концентрации проводили разведение образцов ДНК до 0,2 нг/мкл, согласно инструкции к набору Nextera XT DNA Library Prep. После этого проводили измерение концентрации ампликонов на спектрофотометре Qubit4 (Thermo Scientific, Германия) с помощью набора Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit. Для уменьшения размеров фрагментов геномной ДНК (гДНК) проводили тагментацию ДНК с помощью набора Nextera XT DNA Library Prep. На амплификаторе TianLong Gentier96 проводили ПЦР-реакции амплификации и мечения полученных фрагментов с использованием смеси Nextera PCR Master Mix (NPM) и набор индексов Nextera XT Index Kit.

Далее проводили очистку продуктов таргетной ПЦР с использованием набора AMPure XP («Beckman Coulter», США) с последующим измерением концентрации ампликонов на спектрофотометре Qubit4 (Thermo Scientific, Германия) с помощью набора Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit. Контроль протекания таргетной ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в 1,7 % агарозном геле. Измеряли концентрацию (нг/мкл) очищенных библиотек с помощью спектрофотометра Qubit 4 (набор Qubit™ 1X dsDNA High Sensitivity Assay Kit). Из каждой библиотеки отбирали по 5 мкл и объединяли в одну пробирку, получая общую геномную библиотеку с концентрацией 4 нМ. Далее проводили денатурацию общей библиотеки с использованием 0,2 М NaOH. Образец для секвенирования получали, смешивая 570 мкл 10 пМ библиотеки и 30 мкл 10 пМ phiX (доля phiX = 5 %).

Секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием картриджа 2 x 151. В Local Run Manager создавали запуск («FastQ only»), указывая название запуска, тип картриджа (151/8/8/151, парноконцевые прочтения (paired-end)), набор для пробоподготовки, набор индексов, индексы для каждого образца, и запускали секвенирование.

Сборку генома до уровня контигов производили с помощью приложения SPAdes Genome Assembler на сервисе Illumina BaseSpace Sequence Hub и набора программ в среде Linux. Оценку качества сборки генома проводили с помощью сервиса QUAST. Аннотацию геномных последовательностей выполняли с помощью программного пакета Unipro UGENE v.1.29.0. Определение принадлежности штамма к сиквенс-типу и серогенотипирование осуществлялось путем сравнения результатов секвенирования с последовательностями, приведенными в международной базе данных Института Пастера (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella>). Поиск плазмид выполнялся с помощью ресурса PlasmidFinder 2.1. Поиск факторов вирулентности выполнялся с помощью ресурса VirulenceFinder-2.0. Для идентификации генов антибиотикорезистентности и поиска механизмов эффлюкса использовали два альтернативных подхода: ResFinder и комплексную базу данных по исследованиям антибиотиков (Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD). Ассемблированные последовательности были проанализированы с помощью веб-ресурса ResFinder v4.1 (<http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) на предмет идентификации приобретенных генов антибиотикорезистентности. Значение минимального порога идентичности последовательностей было установлено на уровне 98 % при степени перекрытия не менее 80 %.

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетические маркеры вирулентности инвазивных штаммов *K. pneumoniae*

Данные о принадлежности к сиквенс-типам и генетических маркерах вирулентности инвазивных штаммов *K. pneumoniae* представлены в таблице 1. Все штаммы имели гипермукоидный фенотип, определяемый в фенотипическом стринг-тесте. На основании результатов секвенирования геномов установлено, что штаммы *K. pneumoniae* относились к 4 различным сиквенс-типам. «Клоны высокого риска» были представлены штаммами Кр-329 (ST395) и Кр-476 (ST512). Выделенный из мочи штамм *K. pneumoniae* Кр-329 относится к сиквенс-типу

ST395, широко распространенному в Российской Федерации, ряде европейских стран (Франции, Венгрии, Польше), а также в Китае. В работе Н. Е. Баранцевич было показано присутствие гена карбапенемазы OXA-48 среди штаммов *K. pneumoniae* ST395, выделенных в Российской Федерации [19]. Штаммы *K. pneumoniae* Кр-1271 и Кр-366 относились к ST101 и ST111. Принадлежность *K. pneumoniae* к ST101 и ST111 часто ассоциируется с гипермукоидным фенотипом, высокой инвазивностью и повышенной патогенностью для человека. Типичные для гипервирулентных клебсиелл гены *fyuA*, *irp2* присутствовали только у выделенного из крови штамма *K. pneumoniae* Кр-1271, у выделенного из раневого отделяемого штамма *K. pneumoniae* Кр-366 они не обнаруживались.

Гены азробактина *iutA* были обнаружены в качестве молекулярных маркеров hvKp как у чувствительных, так и у резистентных штаммов *K. pneumoniae*. Другие исследования также показали, что азробактин продуцируется более чем у 90 % hvKp, тогда как только 6 % штаммов cKp могут его экспрессировать [13]. Вторым по распространенности среди детерминант факторов вирулентности среди hvKp был ген иерсиниабактина *irp2*, который обнаруживался у штаммов *K. pneumoniae* Кр-329 и *K. pneumoniae* Кр-1271. Ген иерсиниабактина и его рецептор являются важными факторами вирулентности, необходимыми для выживания штаммов клебсиеллы в тяжелых условиях [20].

Нам не удалось обнаружить большую плазмиду вирулентности pLVK ни у одного из штаммов.

Молекулярно-генетические механизмы устойчивости *K. pneumoniae* к антибиотикам разных групп

У всех штаммов, для которых выполнялось полногеномное секвенирование, были обнаружены гены β-лактамаз одновременно нескольких типов (таблица 2). У большинства штаммов отмечено присутствие β-лактамаз SHV-типа: SHV-1, SHV-11, SHV-26, SHV-40, SHV-56, SHV-79, SHV-89, SHV-106 (таблица 2). У 1 из 4 штаммов отмечено присутствие ферментов CTX-M (β-лактамазы расширенного спектра, БЛРС). Присутствие β-лактамаз TEM-типа выявлено у 2 штаммов, OXA-типа (без карбапенемазной активности — OXA-1) — у 1 штамма. У выделенных из крови карбапенеморезистентных штаммов Кр-476 и Кр-1271 выявлены гены карбапенемаз (KPC-3 и NDM-1). Широкое распространение продуцирующих карбапенемазы NDM штаммов *K. pneumoniae* в различных регионах Беларуси и появление отдельных штаммов, продуцирующих карбапенемазу KPC, было показано нами ранее [21, 22].

Таблица 1. Принадлежность к сиквенс-типам и перечень генетических маркеров вирулентности инвазивных штаммов *K. pneumoniae*Table 1. Sequence types and virulence genetic markers of *K. pneumoniae* invasive strains

Штамм	Кр-329	Кр-366	Кр-476	Кр-1271	Функциональное назначение (гены, связанные с эпидемиологическим распространением)	
Стационар	ГУЗ «ГГКБ № 1»	ГУЗ «ГГКБ № 2»	ГУЗ «ГГКБ № 3»	УЗ «Жлобинская ЦРБ»		
Сиквенс-тип	ST 395	ST 111	ST 512	ST 101		
Биоматериал	моча	раневое отделяемое	кровь	кровь		
Стринг-тест	+	+	+	+		
Плазмиды	Col440II ColpVC IncFIB(pNDM-Mar) IncHI1B(pNDM-MAR) IncR	Col440II	IncFIB(K) IncFII(K) IncX3 ColRNAI	Col440II ColpVC IncFIB(K) IncFII(K) IncR repB(R1701)		
Факторы вирулентности						
<i>fimH</i>	+	+	+	+		Адгезия (субъединица фимбрий 1-го типа)
<i>fyuA</i>	+	—	—	+		Захват железа, сидерофор (сидерофорный рецептор)
<i>irp2</i>	+	—	—	+		Биосинтез иерсиниабактина сидерофора (нерибосомальная пептидсинтетаза белка 2 с высокой молекулярной массой)
<i>iutA</i>	+	+	+	+	Синтез аэробактина сидерофора, захват железа (рецептор железосодержащего аэробактина)	
<i>terC</i>	+	—	—	—	Резистентность к теллуриту (белок устойчивости к ионам теллура)	
<i>c/pk1</i>	—	—	+	—	Выживание при тепловом шоке, тепловом стрессе (АТФаза <i>C/pk</i> семейства AAA)	

Гены устойчивости к аминогликозидам выявлены у 3 из 4 штаммов, наиболее распространенными были *aph(3')* кодирующие производные аминогликозидацетилтрансферазы, их присутствие отмечено у 3 из 4 штаммов. Генетические детерминанты устойчивости к фторхинолонам имели 3 из 4 штаммов (мутации в *gyrA* и *parC* — у 3 штаммов, *qnr* — у 2 штаммов). Выявленные гены *qnrS* кодируют белки группы пентапептидных повторов, которые защищают ДНК-гиразу и топоизомеразу IV от ингибирования фторхинолонами, как правило, имеют плазмидную ло-

кализацию и способность к быстрому горизонтальному распространению в бактериальных популяциях [21].

Ген *FosA*, отвечающий за устойчивость к фосфомицину, выявлен у всех 4 штаммов. Гены хлорамфеникол ацетилтрансферазы (*catI*) выявлены у 2 из 4 штаммов. У всех штаммов также отмечено присутствие различных систем эффлюкса — активного выведения антибиотиков из микробной клетки.

Таблица 2. Перечень генетических детерминант антибиотикорезистентности инвазивных штаммов *K. pneumoniae*Table 2. List of genetic determinants of antibiotic resistance of invasive *K. pneumoniae* strains

Показатели	Кр-329 (ST 395)	Кр-366 (ST 111)	Кр-476 (ST 512)	Кр-1271 (ST 101)
Карбапенемаза				
<i>bla</i> NDM	—	—	—	+ (1)
<i>bla</i> KPC	—	—	+ (3)	—
β-лактамы				
<i>bla</i> TEM	+ (1B)	—	—	+ (1A)
<i>bla</i> CTX-M	+ (15)	—	—	—
<i>bla</i> SHV	+ (11)	+ (11, 79, 89, 40, 56)	+ (11)	+ (1, 26, 106)
<i>bla</i> OXA	+ (1,48)	—	—	—
Аминогликозиды				
<i>aac</i> (6')	+ (1b-cr)	—	+ (1b10, 1b-cr)	—
<i>ant</i> (2'')	+ (1a)	—	—	—
<i>aph</i> (3')	+ (VI)	—	+ (1a)	+ (VI)
<i>aadA</i>	+ (1)	—	+ (2)	—
<i>armA</i>	+	—	—	—
Фторхинолоны				
<i>gyrA</i>	+ (S83I)	—	+ (S83I)	+ (D87N)
<i>parC</i>	+ (S80I)	—	+ (S80I)	+ (S80I)
<i>qnr</i>	+ (S1)	—	—	+ (S1)
Фосфомицин				
<i>uhpT</i>	—	+	+	—
<i>FosA</i>	+ (6)	+ (6)	+ (6)	+ (6)
Хлорамфеникол				
<i>cat</i>	+ (I)	—	+ (I)	—
Тетрациклины				
<i>tet(A)</i>	+	—	—	—
Сульфаниламиды				
<i>sul</i>	+ (1,2)	—	+ (1)	—
Триметоприм				
<i>dfpA</i>	+ (1,5)	—	+ (12)	+ (14)
Макролиды				
<i>mphA</i>	+	—	+	—
<i>msrE</i>	+	—	—	—
Полимиксины				
<i>ArnT</i>	+	+	+	+
<i>eptB</i>	+	+	+	+
Эфлюкс				
<i>baeR</i>	+	+	+	+
<i>LptD</i>	+	+	+	+
<i>qacEdelta</i>	+ (1)	—	+ (1)	—
<i>CRP</i>	+	+	+	+
<i>H-NS</i>	+	+	+	+
<i>oqxA</i>	+	+	+	+

Окончание таблицы 2
End of Table 2

Показатели	Кр-329 (ST 395)	Кр-366 (ST 111)	Кр-476 (ST 512)	Кр-1271 (ST 101)
<i>oqxВ</i>	+	—	+	+
<i>Kpn</i>	+ (F, E, H, G)	+ (F, E, H, G)	+ (F, E, H, G)	+ (F, E, G, H)
<i>emrR</i>	+	+	+	+
<i>marA</i>	+	+	+	+
<i>msbA</i>	+	+	+	+
<i>tet(D)</i>	—	—	—	+
Дефект поринов				
<i>ompK37</i>	+	+	+	+
<i>OmpA</i>	+	+	+	+

Примечание. Наличие генетических детерминант обозначено «+», при наличии генетических вариантов они указаны в скобках

Заключение

Показана возможность идентификации гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* при комплексном использовании фенотипического теста наряду с генотипированием hvKp. Выявлены многочисленные генетические детерминанты антибиотикорезистентности у гипермукоидных штаммов. Отмечена ко-продукция бета-лактамаз одновременно нескольких типов (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M-15, *bla*OXA и *bla*NDM).

Показана принадлежность штаммов *K. pneumoniae* к «клонам высокого эпидемического риска» (ST395, ST512) и наличие у них генов карбапенемаз *bla*KPC, *bla*NDM.

Результаты полногеномного секвенирования отражают значительную устойчивость выделенных из крови гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* к большинству антибиотиков,

включая β-лактамы, аминогликозиды, фторхинолоны, фосфомицин, хлорамфеникол, полимиксины. Распространение MDR-hvKp в организациях здравоохранения является неизбежным событием, что требует принятия мер по сдерживанию эпидемиологического распространения гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*. Конвергенция гипервирулентности и устойчивости к противомикробным препаратам у hvKp может значительно усугубить клиническое течение инфекции и затруднить ее этиотропную терапию.

Определение молекулярных маркеров резистентности и вирулентности госпитальных штаммов *K. pneumoniae* необходимо для проведения мер инфекционного контроля и эпидемиологического надзора за распространением множественно-антибиотикорезистентных гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*.

Список литературы

1. Togawa A, Toh H, Onozawa K, Yoshimura M, Tokushige C, et al. Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in Klebsiella pneumoniae bacteremia patients: a retrospective cohort study. *J Infect Chemother*. 2015 Jul;21(7):531-537. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.04.004>
2. Liu C, Guo J. Hypervirulent Klebsiella pneumonia (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann clin microbiol*. 2019 Jan 21;18(1):4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0302-9>
3. Rossi B, Gasperini ML, Leflon-Guibout V, Gioanni A, de Lastours V, Rossi G, et al. Hypervirulent Klebsiella pneumonia in cryptogenic liver abscesses, Paris, France. *Emerg Infect Dis*. 2018 Feb;24(2):221-229. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2402.170957>
4. Parrott AM, Shi J, Aaron J, Green DA, et al. Detection of multiple hypervirulent Klebsiella pneumoniae strains in a New York City hospital through screening of virulence genes. *Clin. Microbiol. Infect*. 2021 Apr;27(4):583-589. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.012>
5. Dong N, Yang X, Zhang R, Chan EW-C, Chen S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent Klebsiella pneumoniae outbreak strains. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Aug 12;7(1):146. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0146-6>
6. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, et al. Molecular epidemiology of hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Microbiol*. 2021 Jun;13(3):257-265. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i3.6384>
7. Liao W, De Wang L, Li D, Du F-L, Long D, Liu Y, et al. High Prevalence of 16s rRNA methylase genes among carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae isolates in a Chinese Tertiary Hospital. *Microb Drug Resist*. 2021 Jan;27(1):44-52. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0482>
8. RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of Klebsiella pneumoniae. *PLoS Genet*. 2019 Apr 15;15(4):e1008114. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008114>
9. Feng Y, Lu Y, Yao Z, Zong Z. Carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae of sequence type 36. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Jun 26;62(7):e02644-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02644-17>

10. Yan J, Wang M, Zheng P, Tsai L, Wu J. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *N Microbes New Infect.* 2015 Feb;5:1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.01.002>
11. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Martinez MF, Landolsi S, Ferjani S, Maamar E, et al. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBL and/or blaampC genes in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Dec;52(6):898-905. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.020>
12. Li G, Shi J, Zhao Y, Xie Y, Tang Y, Jiang X, et al. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates using the string test in combination with *Galleria mellonella* infectivity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Sep;39(9):1673-1679. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03890-z>
13. Russo TA, Olson R, Fang CT, 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 Aug 27;56(9):e00776-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
14. Hao M, Shi X, Lv J, Niu S, Cheng S, Du H, et al. In vitro activity of apramycin against carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Front. Microbiol.* 2020 Mar 13;11:425. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00425>
15. Shankar C, Jacob JJ, Vasudevan K, Biswas R, Manesh A, et al. Emergence of multidrug resistant hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*: multidrug resistant plasmid acquisition drives evolution. *Front. cell Infect. Microbiol.* 2020 Nov 20;10:575289. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.575289>
16. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* 2018;18:37-46. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9)
17. Gorrie CL, Mirceta, M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* 2017 Jul 15;65(2):208-215. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
18. Sun QL, Gu D, Wang Q, Hu Y, Shu L, Hu J, et al. Dynamic colonization of isolates in gastrointestinal tract of intensive care patients. *Front. Microbiol.* 2019 Feb 11;10:230. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00230>
19. Баранцевич ЕП. Продукция карбапенемаз нозокомиальными штаммами *K. pneumoniae* в Санкт-Петербурге. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2016;18(3):196-199.
20. Lam MM, 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 Oct 29;10(1):77. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5>
21. Тапальский ДВ, Петренев ДР. Распространенность *Klebsiella pneumoniae* - продуцентов карбапенемаз в Беларуси и их конкурентоспособность. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2017;19(2):139-144.
22. Тапальский ДВ, Осипов ВА, Евсеенко ЕО, и др. Металло-бета-лактамазы и карбапенемазы экстремально-антибиотикорезистентных энтеробактерий: распространение в Беларуси. *Здравоохранение.* 2017;(3):40-47.
1. Togawa A, Toh H, Onozawa K, Yoshimura M, Tokushige C, et al. Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia patients: a retrospective cohort study. *J Infect Chemother.* 2015 Jul;21(7):531-537. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2015.04.004>
2. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hyper-mucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. *Ann clin microbiol.* 2019 Jan 21;18(1):4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12941-018-0302-9>
3. Rossi B, Gasperini ML, 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 Feb;24(2):221-229. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2402.170957>
4. Parrott AM, Shi J, Aaron J, Green DA, et al. Detection of multiple hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a New York City hospital through screening of virulence genes. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021 Apr;27(4):583-589. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.012>
5. Dong N, Yang X, Zhang R, Chan EW-C, Chen S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Aug 12;7(1):146. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0146-6>
6. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Seppehr A, et al. Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. *Iran J Microbiol.* 2021 Jun;13(3):257-265. DOI: <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i3.6384>
7. Liao W, De Wang L, Li D, Du F-L, Long D, Liu Y, et al. High Prevalence of 16s rRNA methylase genes among carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Chinese Tertiary Hospital. *Microb Drug Resist.* 2021 Jan;27(1):44-52. DOI: <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0482>
8. RR, Judd LM, Froumine R, Tokolyi A, Gorrie CL, et al. Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet.* 2019 Apr 15;15(4):e1008114. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008114>
9. Feng Y, Lu Y, Yao Z, Zong Z. Carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 36. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018 Jun 26;62(7):e02644-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02644-17>
10. Yan J, Wang M, Zheng P, Tsai L, Wu J. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *N Microbes New Infect.* 2015 Feb;5:1-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.01.002>
11. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Martinez MF, Landolsi S, Ferjani S, Maamar E, et al. Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBL and/or blaampC genes in conferring carbapenem resistance among non-carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2018 Dec;52(6):898-905. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.020>
12. Li G, Shi J, Zhao Y, Xie Y, Tang Y, Jiang X, et al. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates using the string test in combination with *Galleria mellonella* infectivity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020 Sep;39(9):1673-1679. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03890-z>
13. Russo TA, Olson R, Fang CT, 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 Aug 27;56(9):e00776-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-18>
14. Hao M, Shi X, Lv J, Niu S, Cheng S, Du H, et al. In vitro activity of apramycin against carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Front. Microbiol.* 2020 Mar 13;11:425. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00425>

References

15. Shankar C, Jacob JJ, Vasudevan K, Biswas R, Manesh A, et al. Emergence of multidrug resistant hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*: multidrug resistant plasmid acquisition drives evolution. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 20;10:575289. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.575289>
16. Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:37-46. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30489-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30489-9)
17. Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell, RA, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin Infect Dis*. 2017 Jul 15;65(2):208-215. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix270>
18. Sun QL, Gu D, Wang Q, Hu Y, Shu L, Hu J, et al. Dynamic colonization of isolates in gastrointestinal tract of intensive care patients. *Front Microbiol*. 2019 Feb 11;10:230. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00230>
19. Barantsevich EP. Production of Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Saint-Petersburg. *Clin Microb Antichemother*. 2016;18(3):196-199. (In Russ.).
20. Lam MM, 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 Oct 29;10(1):77. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0587-5>
21. Tapalski DV, Petrenev DR. Prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Belarus and their competitive ability *Clin Microb Antichemother*. 2017;19(2):139-144. (In Russ.).
22. Tapalski DV, Osipov VA, Yevseyenko EO, et al. (2017) Metallo-beta-lactamases and carbapenemases among extreme antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: occurrence in Belarus. *Zdravoohranenie*. 2017;(3):40-47. (In Russ.).

Информация об авторах / Information about the authors

Бонда Надежда Александровна, заведующий микробиологической лабораторией, ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2104-585X>

e-mail: bondana8448@gmail.com

Стома Игорь Олегович, д.м.н., доцент, ректор, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0483-7329>

e-mail: rektor@gsmu.by

Осипкина Ольга Викторовна, заведующий научно-исследовательской лабораторией, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1931-4224>

e-mail: olga.osipkina@mail.ru

Зятков Алексей Александрович, научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9542-3791>

e-mail: ziatskovaa@gmail.com

Шафорост Александр Сергеевич, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6725-5353>

e-mail: asofocl@mail.ru

Карпова Елена Васильевна, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3952-6187>

e-mail: lena_2007_23@mail.ru

Тапальский Дмитрий Викторович, д.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9484-7848>

e-mail: tapalskiy@gsmu.by

Nadezhda A. Bonda, Head of Microbiological Laboratory at Gomel Regional Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2104-585X>

e-mail: bondana8448@gmail.com

Igor O. Stoma, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Rector of Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0483-7329>

e-mail: rektor@gsmu.by

Olga V. Osipkina, Head of Research Laboratory of Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1931-4224>

e-mail: olga.osipkina@mail.ru

Aliaksei A. Ziatskov, Researcher at the Research Laboratory of Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9542-3791>

e-mail: ziatskovaa@gmail.com

Alexander S. Shaforost, Senior Researcher at the Research Laboratory of Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6725-5353>

e-mail: asofocl@mail.ru

Elena V. Karpova, Assistant Lecturer at the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3952-6187>

e-mail: lena_2007_23@mail.ru

Dmitry V. Tapalski, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, Gomel State Medical University

ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9484-7848>

e-mail: tapalskiy@gsmu.by

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Бонда Надежда Александровна,

e-mail: bondana8448@gmail.com

Nadezhda A. Bonda

e-mail: bondana8448@gmail.com

Поступила в редакцию / Received 05.02.2023

Поступила после рецензирования / Accepted 06.02.2023

Принята к публикации / Revised 17.02.2023