

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНА *UGE* *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В ЛОКАЛЬНОМ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОМ МОНИТОРИНГЕ



А.В. Устюжанин, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, А.А. Маханек

ФГБУ НИИ охраны материнства и детства Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Цель исследования: оценить результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* в перинатальном центре. **Материалы и методы.** Проанализировано 56 последовательностей гена *uge* *K. pneumoniae*. Ген *uge* детектировали методом ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе «ДТ лайт» (Россия). **Результаты.** Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов отделений акушерско-гинекологического профиля составила в среднем 1,4% в 2020–2023 гг. В стационарах педиатрического профиля выделение штаммов в диапазоне 12–14% регистрируется в 2020, 2021 и 2023 гг. В 2022 г. зарегистрировано четырехкратное снижение выявления штаммов *K. pneumoniae*. Филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности достоверно сгруппировались в 14 кластеров. Ген фактора вирулентности *K. pneumoniae* *uge* регистрируется в 64,3%. Популяция выделенных от пациентов перинатального центра с 2019 по 2023 гг. штаммов *K. pneumoniae*, нуклеотидные последовательности которых проанализированы филогенетическим методом, является гетерогенной. Существуют кластеры, объединяющие геноварианты бактерий, выделенные в 2019 г., и не пополнившиеся новыми изолятами, что подтверждает эффективность проводимых противоэпидемиологических мероприятий, усиленных в период распространения новой коронавирусной инфекции, исключающих передачу инфекционного агента от источника восприимчивому организму во внутрибольничной среде. Определены аминокислотные замены в гене *uge* P249Q, N279L, отличающие гипервирулентные штаммы от тех, которые имеют меньшую степень патогенности. В четырех из пяти пар мать–ребенок нуклеотидные последовательности гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* были генетически более близки друг другу и отличались от выделенных из биологического материала пациентов отделений, что свидетельствует о высокой степени их родства и с большой долей вероятности указывает на то, что источником штамма для ребенка явилась его мать, а не пациенты отделений или персонал учреждения. В одной паре мать–ребенок штаммы *K. pneumoniae* принадлежали разным кластерам. Изолят, выделенный 06.09.2021 г. из фекалий новорожденного ребенка (7 суток), группировался со штаммами, выделенными от пациентки родового отделения 12.12.2020 г. и в Лаосе в 2013 г. (CP035196). *K. pneumoniae*, выделенная 04.06.2021 г. из мочи женщины, достоверно группировалась со штаммами, вошедшими в 13 кластер. **Вывод.** Продемонстрирована возможность совершенствования локального микробиологического мониторинга методами секвенирования и филогенетического анализа гена *uge* *K. pneumoniae*. Оценка изменения внутривидовой популяционной структуры возбудителей ИСМП необходима для своевременного и обоснованного реагирования на ухудшение эпидемиологической ситуации.

Ключевые слова: секвенирование, филогенетический анализ, ген *uge*, *Klebsiella pneumoniae*, мониторинг, неонатология, эпидемиология.

Адрес для переписки:

Устюжанин Александр Владимирович
620089, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 1,
ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны
материнства и младенчества Минздрава России.
Тел.: 8 908 924-94-19.
E-mail: ust103@yandex.ru

Contacts:

Alexander V. Ustyuzhanin
620089, Russian Federation, Ekaterinburg, Repina str., 1,
Ural Research Institute for the Protection of Maternity and Infancy.
Phone: +7 908 924-94-19.
E-mail: ust103@yandex.ru

Для цитирования:

Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И., Маханек А.А.
Филогенетический анализ гена *uge* *Klebsiella pneumoniae* в локальном
микробиологическом мониторинге // Инфекция и иммунитет. 2023.
Т. 13, № 4. С. 735–742. doi: 10.15789/2220-7619-PAO-12421

Citation:

Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Makhanyok A.A.
Phylogenetic analysis of the *Klebsiella pneumoniae* *uge* gene in local
microbiological monitoring // Russian Journal of Infection and Immunity =
Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 4, pp. 735–742. doi: 10.15789/2220-
7619-PAO-12421

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* *UGE* GENE IN LOCAL MICROBIOLOGICAL MONITORING

Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I., Makhanyok A.A.

Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, Ekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to evaluate the data of phylogenetically analyzed nucleotide sequences from the *K. pneumoniae* strain *uge* genes carried out in the perinatal center. **Materials and methods.** Fifty-six sequences of the *K. pneumoniae* *uge* gene were analyzed. The *uge* gene was detected by real-time PCR using DT light amplifier (Russia). **Results.** The rate of *K. pneumoniae* strains among patients of obstetric and gynecological departments in 2020–2023 averaged 1.4%. In pediatric hospitals, the isolation of *K. pneumoniae* strains comprised 12–14% in 2020, 2021 and 2023. In 2022, a fourfold decrease in detected *K. pneumoniae* strains was recorded. Phylogenetic analysis showed that the nucleotide sequences were significantly grouped into 14 clusters. The *K. pneumoniae* virulence factor *uge* gene is found in 64.3% cases. The nucleotide sequences allowed to detect heterogeneous *K. pneumoniae* strain population isolated from patients at the perinatal center from 2019 to 2023 analyzed by the phylogenetic method. There are clusters that combine *K. pneumoniae* genovariants isolated in 2019 and not replenished with new isolates, which confirms the effectiveness of ongoing anti-epidemic measures, enhanced during COVID-19 spread, excluding the transmission of an infectious agent from a source to a susceptible organism in nosocomial environment. P249Q, N279L amino acid substitutions within the *uge* gene were determined, which distinguish hypervirulent strains from those with a lower degree of pathogenicity. Out of five mother-child pairs, in four — nucleotide sequences of *K. pneumoniae* strain *uge* gene were genetically closer to each other than to other strains isolated from patients of the Medical Departments suggesting about a high degree of their relationship, highly likely indicating that the source of the strain for the child was the paired mother, and not the patients of the departments or the staff of the institution. In one mother-child pair, *K. pneumoniae* strains belonged to different clusters. The isolate obtained on 09/06/2021 from neonatal faeces (age: 7 days old) was grouped with strains isolated on 12/12/2020 from a patient in the maternity ward and in Laos in 2013 (CP035196). *K. pneumoniae* isolated on 06/04/2021 from the urine of a woman, was significantly grouped with strains included in cluster 13. **Conclusion.** An opportunity for improving local microbiological monitoring by sequencing and phylogenetic analysis of *K. pneumoniae* *uge* gene has been demonstrated. Assessment of changes in the intraspecies population pattern of HCAI pathogens is necessary for a timely and reasonable response to the deterioration of the epidemiological situation.

Key words: sequencing, phylogenetic analysis, *uge* gene, *Klebsiella pneumoniae*, monitoring, neonatology, epidemiology.

Введение

Klebsiella pneumoniae — это типичный представитель семейства *Enterobacteriaceae*, который может обладать широким спектром генетических детерминант антибиотикорезистентности и факторов вирулентности. Бессимптомные носители *K. pneumoniae* выделяют бактериальные клетки и являются источниками инфекционных агентов, способствуя их распространению во внутрибольничной среде. С этим микроорганизмом связывают как внутрибольничное инфицирование госпитализированных лиц в стационары хирургического, ожогового, неврологического, терапевтического профилей, так и эпидемические вспышки в неонатальных отделениях [2, 11]. Из двух эволюционно сложившихся линий *K. pneumoniae* наиболее частыми возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), являются штаммы классического патотипа в отличие от гипervирулентного — с которым ассоциированы внебольничные случаи инвазивных процессов (абсцесс печени, менингит, эндофтальмит) [1]. В настоящее время в литературе описано 16 генов, кодирующих синтез факторов вирулентности, имеющих разный вклад в реализацию патогенного потенциа-

ла [3, 17]. Одним из них является ген *uge* хромосомной локализации, кодирующий синтез уридиндифосфатгалактуронат-4-эпимеразу, который принимает участие в колонизации, инвазии и реализации патогенности штаммов *K. pneumoniae* [12].

Ген *uge* является распространенным геном фактора вирулентности и частота его встречаемости, согласно результатам некоторых исследований превышает 90% [7, 18]. Однако нет единых сведений по частоте встречаемости штаммов с *uge*, выделенных из разных локусов человеческого организма. По данным одних авторов, он детектировался чаще ($p = 0,03$) в штаммах, выделенных из мочи, чем из образцов крови и аспирата трахеи, что может указывать на возможную роль этого гена в развитии инфекций мочевыводящих путей [5]. Другие авторы описывают, что в исследовании, проведенном в 2018–2019 гг. в Бангладеш, распространенность гена *uge* среди штаммов, *K. pneumoniae*, выделенных как из проб мочи, так и аспирата трахеи была одинаковой и составила 47% [16].

В статье Su S. и соавт. (2020 г.), указано, что ген *uge* был детектирован во всех исследуемых штаммах, выделенных от пациентов лечебного учреждения в Северо-Восточном Китае [14].

Другая группа исследователей обнаружила ген *uge* в 16% изученных антибиотикорезистентных штаммах в одном из госпиталей Малайзии [8]. Сиквенс-типы, выявленные в РФ впервые в период 2017–2019 гг. также несли ген *uge* в 85,7% [6].

Изоляты с гиперпродукцией слизи (гипервирулентный патотип) также содержат ген *uge* в 85,7% случаев [10]. Реализация генетической информации определяется воздействием как внутренних, так и внешних факторов. В штаммах, выделенных из проб морской воды Сиамского залива, NaCl в концентрации 4% блокировал экспрессию указанного гена, детектированного в 47,9% [9].

Подробная характеристика генетического аппарата изолятов позволяет оценивать внутривидовое разнообразие микроорганизмов и формирование эволюционных эпидемически и клинически значимых линий *K. pneumoniae*. Современные методы высокопроизводительного секвенирования способствуют проведению эпидемиологического наблюдения за циркуляцией штаммов как в глобальном масштабе, так и на локальном уровне, однако остаются недоступными для широкого применения. Открытым остается вопрос об идентичности штаммов со сходными фенотипическими свойствами, выделенных из разного клинического материала, например, фекалии, кровь, от одного и того же человека и от разных пациентов учреждения. Это диктует необходимость проведения внутривидовой дифференциации выделенных штаммов.

В настоящей работе продемонстрирована возможность использования молекулярно-генетических методов исследования (ПЦР, секвенирование с последующим филогенетическим анализом) в оценке гетерогенности популяции штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов лечебного учреждения, установлении степени генетического родства изолятов, полученных в парах мать–ребенок, и применения полученных результатов в эпидемиологическом надзоре за распространением потенциальных возбудителей ИСМП во внутрибольничной среде.

Цель исследования: оценить результаты филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена *uge* штаммов *K. pneumoniae* в перинатальном центре.

Материалы и методы

В период с 01.01.2020 по 09.03.2023 исследована 5351 проба фекалий, 10 249 проб отделяемого из цервикального канала, 104 пробы отделяемого из зева, 1928 образцов крови, 998 образцов мочи. В ходе локального еженедельного микробиологического мониторинга выделен 551 штамм *K. pneumoniae* от новорожденных детей (545 из фекалий и 6 из крови) и 168 — от женщин

(144 штамма из отделяемого цервикального канала, 4 — из зева, 20 — из мочи). Проанализировано 56 нуклеотидных последовательностей гена *uge* *K. pneumoniae*, в том числе депонированной в GenBank под номером MZ395252 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

Клинический материал для исследования собирали и транспортировали в стерильных контейнерах и пробирках с транспортной средой. Для культивирования бактерий посев материала выполняли на среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, г. Оболенск, Россия), кровяно-сыровоточный агар (основа — Conda, Испания; эритроциты барана, ЗАО «ЭКОлаб», Россия; сыворотка крови крупного рогатого скота, ООО «БиолоТ», Россия). Идентификацию *K. pneumoniae* и определение антибиотикочувствительности проводили на автоматическом анализаторе «VITEK 2 compact» (bioMérieux, Франция, входит в перечень оборудования ЦКП «Инновационный научно-лабораторный центр перинатальной и репродуктивной медицины» ФГБУ «НИИ ОММ» Минздрава России) согласно инструкции производителя.

ДНК бактериальных клеток выделяли из взвеси 18-часовой культуры с использованием набора ДНК-экспресс (ООО «Синтол», Россия) согласно инструкции производителя. Ген *uge* детектировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров (5'-ТСТТCACGCСТТССТТКАСТ-3', 5'-GATCATCCGGTCTCCСТГТА-3') и реагентов производства ООО «Синтол». Визуализацию ПЦР продуктов осуществляли в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «ДТ лайт» (ДНК-Технологии, Россия). В состав раствора для амплификации входили 50 мкл реакционной смеси: 2,5х ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl (pH 8,8), 6,25 mM MgCl₂), Syn-Taq ДНК-полимераза, глицерол, Tween 20; дезоксинуклеозидтрифосфаты, 7 мкл dd H₂O, 25 mM MgCl₂, по 1 мкл каждого праймера и 2,5 мкл образца ДНК. Режим амплификации: первоначальная денатурация в течение 5 мин при температуре 95°C, последующие 35 циклов: 94°C — 15 с; отжига праймеров при температуре 55°C для *uge* в течение 20 с; элонгации при температуре 72°C в течение 30 с; завершающим этапом каждого цикла была детекция продуктов амплификации.

Секвенирование гена *uge* проводили по методу Сенгера [13]. Полученные последовательности типировали с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Выравнивание нуклеотидных последовательностей на часть референсного генома KPHS_35510, кодирующего уридиндифосфат-галактуронат-4-эпимеразу [*Klebsiella pneumoniae*

subsp. *pneumoniae* HS11286, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/11848582>]). Последующий филогенетический анализ проводили с использованием программы Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), версия 6 [15].

Филограмма была построена по алгоритму «ближайшего соседа» (Neighbor-Joining) и включала нуклеотидные последовательности, депонированные в GenBank.

Расчет эволюционных дистанций между последовательностями производили согласно двухпараметрической модели М. Кимуры (Kimura 2-parameter). Статистическую значимость топологии филограмм оценивали методом повторных выборок на основании анализа 1000 псевдореplik. Достоверными считали построения дендрограммы при индексе в узлах не менее 70.

Результаты

Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* в клиническом материале от пациентов представлена в табл. 1.

Как видно из представленных в таблице данных, частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов отделений родовспоможения акушерско-гинекологического профиля составила в среднем 1,4% в 2020–2023 гг. среди женщин. В стационарах педиатрического профиля выделение штаммов в диапазоне 12–14% регистрируется в 2020, 2021 и 2023 гг. В 2022 г. зарегистрировано четырехкратное снижение выявляемых штаммов *K. pneumoniae*.

Филогенетический анализ показал, что нуклеотидные последовательности достоверно сгруппировались в 14 кластеров (рис.).

Штаммы, входящие в один кластер являются генетически более близкими между собой, в сравнении с изолятами, расположенными в разных кластерах.

Первый кластер объединяет штаммы с повышенной вирулентностью серотипа K-1, описанные в исследовании Лев А.И. (2018 г.). В него

вошел продуцирующий бета-лактамазу расширенного спектра действия (БЛРС) изолят из Екатеринбурга, имеющий ген *rmpA*, ассоциированный с гиперпродукцией слизи, выделенный в 2021 г. из пробы фекалий, полученной от 19-летней беременной женщины на 31–32 неделе гестации, госпитализированной в родовое отделение.

Во второй кластер вошли карбапенемаза продуцирующие (bla_{kpc+}) штаммы, выделенные из отделяемого цервикального канала 31-летней женщины на 31 неделе беременности. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности не являются идентичными, что согласуется с разной фенотипической характеристикой: колонии одного изолята были малинового цвета, а другого — розового.

Несмотря на то что БЛРС-продуцирующие штаммы 662, 665, выделенные из отделяемого цервикального канала 38-летней пациентки на сроке беременности 31 неделя, при посеве послета и из кала ее ребенка в возрасте 4 суток, не сформировали отдельный кластер, идентичность их нуклеотидных последовательностей анализируемого бактериального гена составила 100%.

Третий кластер включает идентичные штаммы, выделенные из мочи беременной женщины (даты сбора: 28.01.2021 и 26.03.2021) и фекалий ее новорожденного ребенка, собранных на 5 сутки после рождения. При этом следует отметить, что при посеве отделяемого цервикального канала (27.04.2021, 25.03.2021, 07.05.2021), посева крови и содержимого трахеобронхиального дерева новорожденного ребенка на 1 сутки жизни рост микроорганизмов не обнаружен.

Штаммы, сгруппировавшиеся в четвертом, шестом, девятом, десятом, одиннадцатом и тринадцатом кластерах, описаны нами ранее под VI, I, II, V, IV, VII номерами соответственно [4]. Девятый (II) и одиннадцатый (IV) кластеры, так же как и охарактеризованные ранее, содержат штаммы, выделенные в 2019 г., они по-

Таблица 1. Частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* в образцах фекалий новорожденных детей и пробах отделяемого цервикального канала в 2020–2023 гг.

Table 1. The 2020–2023 prevalence of *K. pneumoniae* strains in neonatal fecal and cervical canal discharge samples

Материал Material	2020			2021			2022			2023		
	Кол-во проб Number of samples	<i>K. pneum.</i>		Кол-во проб Number of samples	<i>K. pneum.</i>		Кол-во проб Number of samples	<i>K. pneum.</i>		Кол-во проб Number of samples	<i>K. pneum.</i>	
		абс. abs.	%		абс. abs.	%		абс. abs.	%		абс. abs.	%
Фекалии Feces	1796	220	12,2	1669	213	12,8	1477	55	3,7	409	57	13,9
Отделяемое цервикального канала Cervical discharge	3239	58	1,8	3578	42	1,7	2775	36	1,3	657	8	1,2

полнились штаммами, выделенными из фекалий новорожденного ребенка и из отделяемого цервикального канала в 2021, 2022 гг. Штаммы, генетически близкие изолятам из четвертого (VI), шестого (I), десятого (V) и тринадцатого (VII) кластеров не удалось выделить на протяжении 2020–2023 гг.

Штамм, выделенный из фекалий новорожденного ребенка в возрасте 6 суток, родившегося на 35 неделе, вместе с генетически близким штаммом КХ954850, обнаруженным в мокроте пациента с пневмонией (Оболенск), сформировали пятый кластер.

K. pneumoniae 601, колонизировавшая кишечник новорожденного ребенка в возрасте 12 суток, рожденного на 34 неделе гестации, оказалась со штаммами КХ954849, КР760055, выделенными из пробы мочи (Оболенск, 2013 и 2014 гг.), в седьмом кластере.

Восьмой кластер демонстрирует генетическое родство штаммов, выделенных из разных локусов (кровь, фекалии) одного пациента, что позволяет с высокой долей вероятности предполагать о проникновении возбудителя в кровеносное русло путем трансцитоза через кишечную стенку. Это еще раз подтверждает необходимость проведения локального микробиологического мониторинга в отделениях недоношенных новорожденных детей для установления видов микроорганизмов, колонизирующих кишечный биотоп, как наиболее вероятных возбудителей позднего сепсиса для выбора адекватной тактики антибиотикотерапии.

Группа бактерий № 639, 629, 628, 643 не сформировала отдельный кластер, но содержит идентичные последовательности изолятов, выделенных из отделяемого цервикального канала, послепрода, крови обоих детей из двойни. Следует отметить, что штаммы из гемокультуры выделены на первые сутки жизни детей, что подтверждает внутриутробное инфицирование и определяет этиологический агент раннего неонатального сепсиса, закончившегося летально для обоих новорожденных.

Двенадцатый кластер представлен штаммом из отделяемого цервикального канала женщины 23 лет с длительным безводным промежутком в первом периоде срочных родов (2020 г.). Наиболее генетически близкий вариант СР035196 был выделен в Лаосе в 2012 г.

Четырнадцатый кластер объединил штаммы 2020 г. от матери и ее новорожденного ребенка, которые были наиболее генетически близки изоляту СР065831, выделенному из мочи в США в 2018 г.

Сравнительный анализ аминокислотных замен гена *uge* в штаммах *K. pneumoniae*, изолированных в период 2019–2023 г. с референсной последовательностью КРHS_35510, кодирующего уридиндифосфат-галактуронат-4-эпимеразу

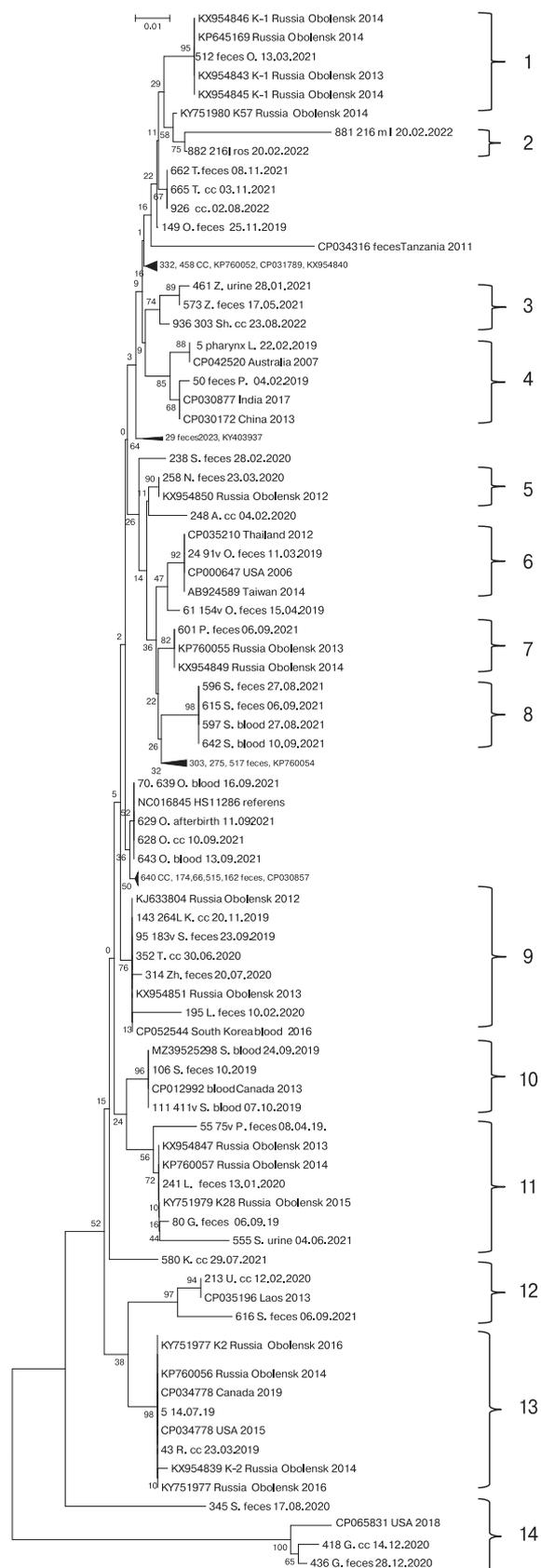


Рисунок. Филогенетическое дерево штаммов *K. pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *uge* (362 нт)

Figure. Phylogenetic tree for *K. pneumoniae* strain *uge* gene nucleotide sequences (362 nt)

Таблица 2. Сравнительный анализ аминокислотных замен гена *ige* в штаммах *K. pneumoniae*, изолированных в период 2019–2023 гг.
 Table 2. 2019–2023 Comparative analysis of amino acid substitutions in the *K. pneumoniae ige* gene strains

Am. Ref.	P157L	I163T	P166L	I167T	A170V	P173L	Q180R	F181C	G185R	C192Y	S194N	E202G	V204A	S214N	S217L	F228C	G229A	R231W	P237R	A245T	P247L	R248Q	P249Q	A251V	I255T	Y257S	H264S	Q265R	P273L	P274L	R277K	R278K	N279L	E280G	S290F	E293A
Ref.	P	I	P	T	A	P	Q	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	P	P	R	R	N	E	S	E
1	P	I	P	T	A	P	R	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	P	L	R	R	N	E	F	A
2	P	I	P	T	A	P	Q	C	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	P	L	R	R	N	E	F	A
3	L	T	L	T	A	P	Q	F	R	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	P	P	R	R	N	E	S	E
4	P	I	P	I	A	P	R	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	V	I	Y	H	Q	P	P	R	K	N	E	S	E
5	L	T	L	T	A	P	Q	C	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	T	Y	H	R	P	P	R	R	N	E	S	E
6	L	T	P	T	A	L	Q	C	G	C	S	E	A	S	S	F	G	W	P	A	P	R	P	A	T	Y	H	Q	L	P	R	R	N	G	S	E
7	L	T	L	T	A	P	Q	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	L	A	T	Y	H	Q	L	P	R	R	N	G	S	E
8*	P	I	P	I	A	P	R	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	T	Y	H	Q	L	P	R	R	N	K	F	A
9	L	T	P	T	A	P	Q	C	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	R	P	P	R	R	N	E	S	E
10*	L	T	L	T	A	P	Q	F	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	L	P	R	R	N	G	S	A
11	L	T	P	T	A	P	Q	C	G	C	S	E	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	S	R	Q	P	L	R	R	N	G	S	A
12	L	I	L	T	A	P	Q	F	G	C	S	E	V	N	L	C	A	R	R	A	T	L	R	P	A	I	Y	H	Q	P	R	R	N	G	S	E
13	L	T	P	T	V	P	Q	F	G	C	S	E	A	S	F	G	R	R	P	T	L	R	P	A	I	Y	H	Q	P	P	R	K	N	E	F	A
14	L	T	L	T	A	P	Q	C	G	Y	N	G	V	S	S	F	G	R	R	A	P	R	P	A	I	Y	H	Q	P	P	R	R	N	E	S	E

Примечание. * — штамм, входящий в кластер, вызвал генерализованную инфекцию; Ам — аминокислотные замены; Реф. — референсная аминокислотная последовательность.
 Note. * — a strain in the cluster caused a generalized infection; Am — amino acid substitutions; Ref. — reference amino acid sequence.

[*Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286], представлен в табл. 2. Жирным шрифтом выделены аминокислотные замены, отличающие гипервирулентные штаммы от других.

Обсуждение

В среднем частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* среди пациентов учреждения родовспоможения, установленная в ходе микробиологического мониторинга составила 1,4% в 2020–2023 г. среди женщин, 12,5% в 2020–2021 гг., 3,7% в 2022 г. и 13,9% в 2023 г. среди детей. Отмечается одинаковая распространенность штаммов из отделяемого цервикального канала и четырехкратное снижение выявления штаммов из фекалий детей в 2022 г. по сравнению с 2020, 2021 гг. с последующим увеличением частоты обнаружения до 13,9% в первом квартале 2023 г.

Согласно проведенным нами исследованиям, ген фактора вирулентности *K. pneumoniae uge*, в изучаемых штаммах регистрируется на уровне 64,3%. В наших предыдущих публикациях мы описывали результаты филогенетического анализа гена *uge* штаммов *K. pneumoniae*, выделенных до 2021 г. [4]. В данном исследовании представляем результаты мониторинга штаммов и изучение их гетерогенности за пятилетний период (2019–2023 гг.).

Существуют кластеры, объединяющие генотипы бактерий, выделенные в 2019 г. и не пополнившиеся новыми изолятами, что подтверждает эффективность проводимых противоэпидемических мероприятий, усиленных в период распространения новой коронавирусной инфекции, исключающих передачу инфекционного агента от источника восприимчивому организму во внутрибольничной среде.

Определены аминокислотные замены в гене *uge* P249Q, N279L, отличающие гипервирулентные штаммы от тех, которые имеют меньшую степень патогенности, что может быть использовано в индикации клинически значимых изолятов.

Колонизация кишечника новорожденного ребенка, штаммом, идентичным выделенному из мочи его матери и не обнаруженному при исследовании отделяемого цервикального канала, свидетельствует о проникновении в организм ребенка бактерий из мочевыделительной системы матери.

В одной паре мать–ребенок штаммы *K. pneumoniae* принадлежали разным кластерам. Изолят, выделенный 06.09.2021 г. из фекалий новорожденного ребенка (7 суток), группировался со штаммами, выделенными от пациентки родового отделения 12.12.2020 г. и в Лаосе в 2013 г. (CP035196). *K. pneumoniae*, выявленная 04.06.2021 г. в моче женщины, достоверно группировалась со штаммами, вошедшими в 13 кластер. Следует отметить, что в период с 04.06.2021 г. по 06.09.2021 г. в ходе бактериологического исследования *K. pneumoniae* не обнаружена ни в моче, ни в отделяемом цервикального канала описанной пациентки.

Таким образом, продемонстрирована возможность совершенствования локального микробиологического мониторинга с применением молекулярно-генетических методов исследования и использования результатов секвенирования и филогенетического анализа гена *uge* *K. pneumoniae* в эпидемиологическом надзоре за внутрибольничным распространением штаммов. Оценка изменения внутривидовой популяционной структуры возбудителей ИСМП необходима для своевременного и обоснованного реагирования на ухудшение эпидемиологической ситуации.

Список литературы/References

1. Агеевец В.А., Агеевец И.В., Сидоренко С.В. Конвергенция множественной резистентности и гипервирулентности у *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2022. Т. 12, № 3. С. 450–460. [Ageevets V.A., Ageevets I.V., Sidorenko S.V. Convergence of multiple resistance and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2022, vol. 12, no. 3, pp. 450–460. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-COM-1825
2. Козлова Н.С., Баранцевич Н.Е., Баранцевич Е.П. Чувствительность к антибиотикам штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном стационаре // Инфекция и иммунитет. 2018. Т. 8, № 1. С. 79–84. [Kozlova N.S., Barantsevich N.E., Barantsevich E.P. Susceptibility to antibiotics in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in a multidisciplinary medical centre. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2018, vol. 8, no. 1, pp. 79–84. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-2018-1-79-84
3. Краева Л.А., Кунилова Е.С., Бургасова О.А., Хамдулаева Г.Н., Данилова Е.М., Беспалова Г.И. Значение факторов патогенности некоторых видов стрептококков и клебсиелл при определении их этиологической роли в развитии воспалительных процессов респираторного тракта // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 121–128. [Kraeva L.A., Kunilova E.S., Burgasova O.A., Hamdulaeva G.N., Danilova E.M., Bepalova G.I. The importance of pathogenicity factors of some *Streptococcus* spp. and *Klebsiella* spp. in determining their etiological role in the inflammatory processes of the respiratory tract. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 121–128. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-TIO-1339
4. Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2020. Т. 97, № 6. С. 556–563. [Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2020, vol. 97, no. 6, pp. 556–563. (In Russ.)] doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-6

5. Ballén V., Gabasa Y., Ratia C., Ortega R., Tejero M., Soto S. antibiotic resistance and virulence profiles of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical sources. *Front. Cell Infect. Microbiol.*, 2021, vol. 11: 738223. doi: 10.3389/fcimb.2021.738223
6. Fursova N.K., Astashkin E.I., Gabrielyan N.I., Novikova T.S., Fedyukina G.N., Kubanova M.K., Esenova N.M., Sharapchenko S.O., Volozhantsev N.V. Emergence of five genetic lines ST39[NDM-1, ST13OXA-48, ST3346OXA-48, ST39CTX-M-14, and novel ST351OXA-48 of multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* in Russia. *Microb. Drug Resist.*, 2020, vol. 26, no. 8, pp. 924–933. doi: 10.1089/mdr.2019.0289
7. Hasani A., Soltani E., Ahangarzadeh Rezaee M., Pirzadeh T., Ahangar Oskouee M., Hasani A., Gholizadeh P., Noie Oskouie A., Binesh E. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* and its relation with capsule-associated virulence genes, antimicrobial resistance pattern, and clinical infections: a descriptive study in medical practice. *Infect. Drug Resist.*, 2020, vol. 13, pp. 1971–1980. doi: 10.2147/IDR.S243984
8. Mobasser G., Thong K.L., Rajasekaram G., Teh C.S.J. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from a Malaysian hospital. *Braz. J. Microbiol.*, 2020, vol. 51, no. 1, pp. 189–195. doi: 10.1007/s42770-019-00208-w
9. Nimnoi P., Pongsilp N. Identification, characterization, and virulence gene expression of marine enterobacteria in the upper gulf of Thailand. *Microorganisms*, 2022, vol. 10, no. 3: 511. doi: 10.3390/microorganisms10030511
10. Osama D.M., Zaki B.M., Khalaf W.S., Mohamed M.Y.A., Tawfik M.M., Amin H.M. Occurrence and molecular study of hypermucoviscous/hypervirulence trait in gut commensal *K. pneumoniae* from healthy subjects. *Microorganisms*, 2023, vol. 11, no. 3: 704. doi: 10.3390/microorganisms11030704
11. Pruss A., Kwiatkowski P., Masiuk H., Bilka I., Giedrys-Kalemba S., Dołęgowska B. Epidemiological analysis of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal clinic in Poland. *Antibiotics (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 1: 50. doi: 10.3390/antibiotics12010050
12. Remya P.A., Shanthi M., Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2019, vol. 37, no. 2, pp. 210–218. doi: 10.4103/ijmm.IJMM_19_157
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
14. Su S., Zhang J., Zhao Y., Yu L., Wang Y., Wang Y., Bao M., Fu Y., Li C., Zhang X. Outbreak of KPC-2 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST76 and carbapenem-resistant K2 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST375 strains in Northeast China: molecular and virulent characteristics. *BMC Infect. Dis.*, 2020, vol. 20, no. 1: 472. doi: 10.1186/s12879-020-05143-y
15. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, vol. 30, no. 12, pp. 2725–2729. doi: 10.1093/molbev/mst197
16. Tanni A.A., Hasan M.M., Sultana N., Ahmed W., Mannan A. Prevalence and molecular characterization of antibiotic resistance and associated genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates: a clinical observational study in different hospitals in Chattogram, Bangladesh. *PLoS One*, 2021, vol. 16, no. 9: e0257419. doi: 10.1371/journal.pone.0257419
17. Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., Jure M.A. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*, 2019, vol. 5, no. 6: e01829. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01829
18. Xu T., Wu X., Cao H., Pei T., Zhou Y., Yang Y., Yang Z. The characteristics of multilocus sequence typing, virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from cattle in Northern Jiangsu, China. *Animals (Basel)*, 2022, vol. 12, no. 19: 2627. doi: 10.3390/ani12192627

Авторы:

Устюжанин А.В., к.м.н., ведущий научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

Чистякова Г.Н., д.м.н., профессор, руководитель отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

Ремизова И.И., к.б.н., старший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия;

Маханек А.А., младший научный сотрудник отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества Минздрава России, г. Екатеринбург, Россия.

Authors:

Ustyuzhanin A.V., PhD (Medicine), Leading Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

Chistyakova G.N., DSc (Medicine), Professor, Head of the Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

Remizova I.I., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation;

Makhanyok A.A., Junior Researcher, Department of Immunology, Microbiology, Pathomorphology and Cytodiagnostics, Urals Scientific Research Institute for Maternal and Child Care of Ministry of Healthcare, Yekaterinburg, Russian Federation.