



Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim*

Устюжанин А.В.[✉], Чистякова Г.Н., Ремизова И.И.

ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества»,
620028, Екатеринбург, Россия

Введение. В настоящее время недостаточно данных о том, какова частота встречаемости штаммов *Klebsiella pneumoniae* с генами факторов вирулентности *uge* и *fim* среди женщин и новорожденных, что диктует необходимость проведения исследования распространенности *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) и определения степени гетерогенности выделенной популяции бактерий среди детей и взрослых.

Цель исследования — филогенетический анализ генов *uge* и *fim* штаммов *K. pneumoniae* для оценки гетерогенности изучаемой популяции и возможной кластеризации по локусу колонизации, временной и территориальной принадлежности.

Материалы и методы. Исследовано 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от 39 новорожденных и 24 женщин из проб фекалий, крови, мочи, последа, отделяемого цервикального канала, зева, шва. Две гемокультуры получены от одного пациента с интервалом в 2 нед, и 2 изолята выделены из отделяемого цервикального канала и шва одной пациентки. Детекцию наличия генов проводили методом полимеразной цепной реакции, нуклеотидные последовательности генов определяли секвенированием по Сэнгеру.

Результаты исследования. Частота встречаемости гена *uge* составила 53,8%, *fim* — 23,1%, что свидетельствует о большей распространенности в штаммах гена *uge*, чем *fim* ($p < 0,001$). Проведенный филогенетический анализ 18 нуклеотидных последовательностей гена *uge* и 4 нуклеотидных последовательностей гена *fim* показал, что штаммы распределились по 7 и 4 кластерам соответственно. Установлено, что как по гену *uge*, так и по *fim* нет четкой кластеризации по временной и территориальной принадлежности, возрасту пациента, биологическому материалу.

Обсуждение. Результаты филогенетического анализа демонстрируют генетическую гетерогенность изучаемой популяции *K. pneumoniae*, что подтверждено широкой географией и временем выявления наиболее генетически близких бактериальных изолятов.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*; филогенетический анализ; ген *uge*; ген *fim*.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Устюжанин А.В., Чистякова Г.Н., Ремизова И.И. Филогенетический анализ родства штаммов *Klebsiella pneumoniae* по генам *uge* и *fim*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020; 97(6): 556–563.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-6>

Поступила 30.06.2020

Принята в печать 14.10.2020

The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes

Aleksander V. Ustyuzhanin[✉], Guzel' N. Chistyakova, Irina I. Remizova

Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia

Introduction. Currently, there is insufficient data on the prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains with virulence factors genes *uge* and *fim* among women and newborns. This indicates the need for a study of the prevalence of *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) and the degree of heterogeneity of the bacterial population isolated from children and adults.

The **aim** of the study was to perform a phylogenetic analysis of the *uge* and *fim* genes of the *K. pneumoniae* strains.

Materials and methods. Total 65 strains of *K. pneumoniae* isolated from samples of feces, blood, urine, placenta, cervical canal, pharynx, suture of 39 newborns and 24 women were studied. Two blood cultures were obtained from one patient with an interval of two weeks, and two isolates were obtained from the separated cervical canal

and suture of one patient. The presence of genes was detected by PCR, nucleotide sequences of the genes were determined by Sanger sequencing.

Results. The frequency of detection of the *uge* gene was 53.8% (35 of 65), *fim* gene — 23.1% (15 of 65), which indicates a higher prevalence of *uge* gene strains compared to *fim* ($p < 0.001$). The phylogenetic analysis of 18 nucleotide sequences of the *uge* gene and 4 of the *fim* gene demonstrated that the strains were distributed in 7 and 4 clusters, respectively. It was established that for, there are no clear clustering by time and place of isolation, patient age, and type of biological material was observed for both *uge* and *fim* genes.

Discussion. The results of phylogenetic analysis demonstrate the genetic heterogeneity of the studied population of *K. pneumoniae*, which is confirmed by the wide geography and time variations in detection of the most genetically close bacterial isolates.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; phylogenetic analysis; *uge* gene; *fim* gene.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Ustyuzhanin A.V., Chistyakova G.N., Remizova I.I. The relatedness of *Klebsiella pneumoniae* strains based on phylogenetic analysis of *uge* and *fim* genes. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(6): 556–563. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-6>

Received 30 June 2020
Accepted 14 October 2020

Введение

Klebsiella pneumoniae часто колонизирует кишечник детей и взрослых без клинических и лабораторных признаков микробного воспаления, в то же время указанный вид бактерий может быть оппортунистическим этиологическим агентом пневмонии, абсцесса, бактериемии, инфекции мочевыводящих путей [1], неонатального сепсиса [2, 3]. Одним из возбудителей внутрибольничных, в том числе гнойно-септических, инфекций являются полирезистентные к антибиотикам и устойчивые к дезинфектантам штаммы *K. pneumoniae* [4–6].

Среди представителей семейства энтеробактерий, с которыми ассоциировано развитие осложненных инфекционного характера у новорожденных в отделении реанимации, на долю *K. pneumoniae* приходится 48% [7]. В этиологической структуре пневмоний с летальным исходом у взрослого населения штаммы *K. pneumoniae* выявлены в 27,27% случаев [8]. В настоящее время выделяют две эволюционно сложившиеся линии, отличающиеся по степени вирулентности. Одну представляют так называемые классические штаммы, вторую — вирулентные, с выраженной продукцией слизи [9].

J.M. Vargas и соавт. описывают 16 генов вирулентности, имеющих разный вклад в патогенный потенциал [10]. Другие авторы также приводят результаты аналогичных исследований различных генов *K. pneumoniae* [9, 11], выделенных при обследовании пациентов с различной выраженностью клинических проявлений в стационарах хирургического, пульмонологического, травматологического профилей, отделениях реанимации и интенсивной терапии. В то же время недостаточно данных, характеризующих бактериальные изоляты, обнаруженные в пробах кала новорожденных, в том числе недоношенных детей.

Значимость гена *uge* в реализации факторов патогенности, согласно исследованиям M.A. Regué (2004), заключается в кодировании фермента уридин-дифосфат-галактуронат-4-эпимеразы, необходимого для синтеза липополисахарида — компонента клеточной стенки грамотрицательных бактерий. При этом показано, что инактивация гена *uge* приводит к формированию авирулентных для лабораторных животных штаммов [12]. Распространенность генов в штаммах *K. pneumoniae* варьирует, по данным разных авторов, от 80% [12, 13] до 90% [14]. У детей с гастроинтестинальными расстройствами данный показатель составляет 83,3% [15].

Ген *fimH* определяет синтез фимбрий, нитевидных структур белковой природы, расположенных на поверхности бактерий и обеспечивающих адгезию штаммов к клеткам хозяина [16]. Прикрепление к поверхности слизистых оболочек способствует бактериальной колонизации, формированию резистентности к факторам иммунной защиты и реализации патогенного потенциала за счет механического соединения с субстратом. Данный ген играет важную роль в развитии инфекций мочевыводящих путей [10].

В настоящее время недостаточно данных о том, какова частота встречаемости штаммов *K. pneumoniae* с генами факторов вирулентности *uge* и *fim* среди женщин, планирующих беременность, беременных, рожениц и родильниц, а также новорожденных. Это диктует необходимость проведения дальнейшего исследования распространенности *K. pneumoniae* (*uge*⁺, *fim*⁺) и определения степени гетерогенности выделенной популяции бактерий среди детей и взрослых. Оценить степень генетического разнообразия штаммов позволит филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей указанных генов.

Цель исследования — провести филогенетический анализ генов *ige* и *fim* штаммов *K. pneumoniae* для оценки гетерогенности изучаемой популяции и возможной кластеризации по локусу колонизации, временной и территориальной принадлежности.

Материалы и методы

Всего исследовано 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от 39 новорожденных и 24 женщин из проб фекалий (38), крови (2), мочи (3), последа (1), отделяемого цервикального канала (19), зева (1), шва (1). Две гемокультуры получены от одного пациента с интервалом в 2 нед, и 2 изолята выделены из отделяемого цервикального канала и шва одной пациентки. Биологический материал поступил в бактериологическую лабораторию от недоношенных детей, рожденных от матерей с различным сроком гестации (25–36 нед ± 3 дня), 3 женщин, планирующих беременность, 13 беременных, 5 рожениц и 3 родильниц.

Сбор клинического материала для исследования осуществляли в стерильные лабораторные контейнеры для взятия проб объемом 60 мл с завинчивающейся крышкой и ложкой. Пробы биологического материала транспортировали и хранили в соответствии с СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». Для культивирования бактерий посев материала выполняли на среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия), кровяно-сыровоточный агар (основа — «Conda»; эритроциты барана — «ЭКОлаб»; сыворотка крови крупного рогатого скота — «БиолоТ»). Идентификацию штаммов *K. pneumoniae* и определение их антибиоточувствительности проводили с использованием автоматического анализатора «VITEK 2 compact» («Bio Mérieux»).

ДНК бактериальных клеток выделяли из взвеси суточной культуры с использованием набора ДНК-экстран-2 («Синтол») согласно инструкции производителя. Наличие генов *ige* определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием реагентов, праймеров для гена *ige* 5'-TCTTACGCCTTCTCACT-3', 5'-GATCATC-CGGTCTCCCTGTA-3' и для *fimH* (кодирует белок фимбрий первого типа) 5'-TGCTGCTGGGCTG-GTTCGATG-3', 5'-GGGAGGGTGACGGTGACATC-3' производства ООО «Синтол». Визуализацию ПЦР продуктов осуществляли в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I в режиме реального времени на детектирующем амплификаторе «iCycler iQ5» («Bio Rad»). В состав смеси для амплификации входили 50 мкл реакционной смеси: 2,5× ПЦР буфер Б (KCl, ТрисHCl pH 8,8, 6,25 mM MgCl₂), Syp-Taq ДНК-полимеразы, глицерол, Твин 20; дезоксинуклеозидтрифосфаты, 5 мкл dd H₂O, 25 mM MgCl₂, по 1 мкл каждого праймера и 3,5 мкл

образца ДНК. Режим амплификации: первоначальная денатурация — 5 мин при 95°C, последующие 35 циклов — 15 с при 94°C; отжига праймеров — 20 с при 55°C для *ige* и 60°C для *fim*; элонгации — 30 с при 72°C. Завершающим этапом каждого цикла была детекция продуктов амплификации.

Для оценки статистической значимости различий частоты встречаемости генов *ige* и *fim* в штаммах *K. pneumoniae* использовали программу статистической обработки данных SPSS, критерии χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса, V Крамера.

Секвенирование генов *ige* и *fim* проводили по методу Сэнгера [17]. Типирование полученных последовательностей осуществляли с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)¹.

Выравнивание, филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA), версия 6 [18].

Филограммы были построены по алгоритму «ближайшего соседа» с использованием нуклеотидных последовательностей, депонированных в GenBank.

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

Результаты

При исследовании 65 штаммов *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов учреждения родовспоможения, частота встречаемости гена *ige* составила 53,8% (35 из 65), *fim* — 23,1% (15 из 65), что свидетельствует о большей распространенности в изученных штаммах гена *ige*, чем *fim* ($p < 0,001$). Частота встречаемости гена *ige* ниже, чем в результатах, опубликованных в литературе [12–14], что может быть связано с характеристикой исследуемой выборки пациентов, которые были госпитализированы в многопрофильные или специализированные стационары с нозологической формой клебсиеллезной этиологии. Сравнительный анализ *K. pneumoniae*, выделенных от новорожденных детей и женщин, не продемонстрировал статистически значимых различий в частоте встречаемости вышеуказанных генов. Так, в группе штаммов, выделенных у детей, *ige* детектирован в 62,5% случаев (25 из 40), у женщин — в 40% (10 из 25; $p = 0,130$). Ген *fim* обнаружен в 17,5% штаммов (7 из 40), выделенных от детей, и в 32% штаммов (8 из 25), выделенных от женщин ($p = 0,295$). Оба

¹ URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

гена были выявлены в 18,4% случаев (12 из 65), из них в 28% штаммов, выделенных от женщин, и в 12,5%, выделенных от детей ($p = 0,216$).

Для определения степени генетического родства проанализировано 18 нуклеотидных последовательностей гена *uge*, полученных в результате секвенирования по Сэнгеру. Проведенный филогенетический анализ показал, что все штаммы распределились по 7 кластерам (рис. 1).

В первый кластер вошли два штамма, выделенные из проб фекалий от пациентов двух педиатрических отделений в апреле и марте 2019 г., и близкородственные им штаммы, выделенные на Тайване в 2014 г. (AB924589), в США в 2006 г. (CP000647) и Таиланде в 2012 г. (CP035210).

Во второй кластер распределились два штамма, выделенные также из проб фекалий новорожденных детей из отделения патологии новорождённых

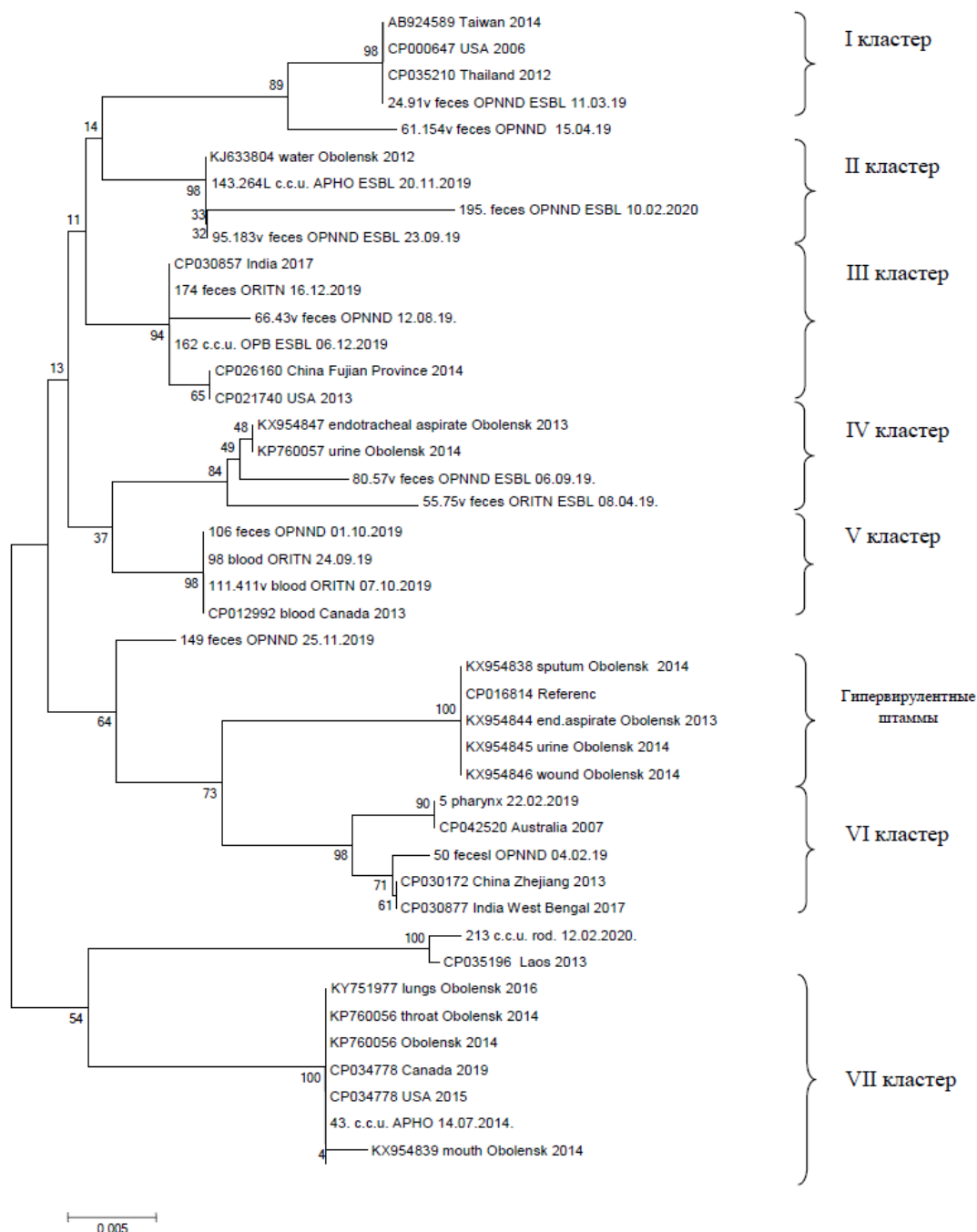


Рис. 1. Филогенетическое дерево штаммов *Klebsiella pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *uge* (435 н.т.).

Fig. 1. Phylogenetic tree for nucleotide sequences of *uge* gene of *Klebsiella pneumoniae* strains (435 n.t.).

недоношенных детей (ОПННД) в сентябре 2019 г. и феврале 2020 г., один штамм, полученный при исследовании пробы из цервикального канала от пациентки акушерско-физиологического отделения (ноябрь 2019 г.) после родоразрешения способом кесарева сечения. Следует отметить, что все штаммы, по данным бактериологического анализа, продуцировали бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС). Наиболее генетически близкий штамм был выделен в Оболенске в 2012 г. (KJ633804).

Третий кластер включал в себя последовательности гена *uge* *K. pneumoniae*, выделенные из проб кала двух недоношенных детей и проб из цервикального канала (декабрь 2019 г.). Один ребенок со сроком гестации 31 нед в возрасте 5 сут находился в отделении реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН) (декабрь 2019 г.). Другой пациент в возрасте 11 сут сроком гестации 36 нед был госпитализирован в ОПННД (август 2019 г.). Генетически близкие штаммы обнаружены в Индии (2017 г. — CP030857), Китае (2014 г. — CP026160) и США (2014 г. — CP021740).

Четвертый кластер представлен БЛРС-продуцирующими штаммами, выделенными из проб кала недоношенных детей из ОРИТН (апрель 2019 г.) и ОПННД (сентябрь 2019 г.). В него же вошли изоляты, выделенные из эндотрахеального аспирата в 2013 г. (KX954847) и пробы мочи в 2014 г. (KR760057) в Оболенске.

В пятый кластер сгруппировались 3 штамма, выделенные от 2 детей из тройни. Два из них получены из гемокультуры одного ребёнка в возрасте 41 и 63 сут. При этом отсутствие микробного роста в крови в 1-е сутки жизни может свидетельствовать об исключении внутриутробного сепсиса. Другой штамм изолирован из кала второго ребёнка. Третий ребенок из тройни также выделял с калом *K. pneumoniae*, однако детектировать ген *uge* в нем не удалось. Установлена идентичность между штаммами, выделенными из крови одного ребёнка и из кала другого ребёнка. При этом в штамме, выделенном из пробы кала ребёнка с положительной гемокультурой, ген *uge* не обнаружен. На основании полученных результатов исследования можно с высокой долей вероятности предполагать экзогенную инфекцию кровотока, а не транзитоз бактерий через стенку кишечника недоношенного новорождённого (эндогенную инфекцию). Следует также отметить, что наиболее генетически близкий штамм, найденный BLAST, также был получен из гемокультуры в 2013 г. в Канаде (CP012992). Полученные результаты свидетельствуют о возможном присутствии в разных локусах макроорганизма бактерий одного вида с отличающимся набором генов. Молекулярно-генетический мониторинг, направленный на выявление циркуляции штаммов с определенными генетическими детерминантами виру-

лентности, способствует обнаружению источника инфицирования.

Два штамма *K. pneumoniae*, один из которых выделен из пробы зева женщины 33 лет, планирующей беременность, а другой — из кала новорождённого в возрасте 8 сут, вместе с изолятами, зарегистрированными в Австралии в 2007 г. (CP042520), Китае в 2013 г. (CP030172) и Индии в 2017 г. (CP030877), образовали шестой кластер.

Седьмой кластер представлен штаммом, выделенным из пробы цервикального канала беременной женщины в возрасте 26 лет со сроком гестации 30 нед. Наиболее генетически близкие штаммы были выделены в Оболенске в 2014 г. (KX954839), в США в 2015 г. (CP034778) и в Канаде в 2019 г. (CP034778).

Следует отметить, что все выделенные в настоящем исследовании штаммы генетически отличались от гипервирулентных, описанных в исследовании А.И. Лев и группирующихся отдельным кластером [16].

Из 14 штаммов, имеющих ген *fim*, в 4 случаях нуклеотидные последовательности были успешно секвенированы. Филогенетический анализ показал, что все штаммы распределились по 4 кластерам (рис. 2).

В первый кластер вошел штамм 5, выделенный в феврале 2019 г. из зева женщины, планирующей беременность. Он группировался вместе с гипервирулентным штаммом CP034778, обладающим плазмидой вирулентности, выявленным в Канаде в 2018 г. в пробе фекалий пациента в возрасте старше 90 лет [19].

Во втором кластере сгруппировались штаммы, выделенные из цервикального канала в ноябре 2019 г., пробы крови пациентов в Великобритании в 2018 г. (CP034200) и Индии в 2017 г. (CP036327).

В третий кластер распределились штаммы, выделенные из отделяемого шва пациентки послеродового отделения в январе 2020 г., крови в Китае в 2017 г. (CP050275, CP050280) и пробы мочи в Чехии в 2018 г. (CP050371).

Штаммы, выделенные из цервикального канала в феврале 2020 г. в послеродовом отделении, в Китае в 2013 г. (CP026017), из мокроты в Непале в 2018 г. (AP021880), в Чехии в 2018 г. из пробы фекалий (CP050360), образовали четвертый кластер.

Из 65 штаммов 17 продуцировали БЛРС. Устойчивых к карбапенемам и аминогликозидам бактерий не выявлено. Для описания связи между геновариантами *uge*⁺/*fim*⁻, *uge*⁺/*fim*⁺, *uge*⁻/*fim*⁻, *uge*⁻/*fim*⁺ и антибиотикорезистентностью строили таблицы сопряженности и рассчитывали критерии χ^2 и V Крамера (поскольку оценивали более одной градации переменных). Статистический анализ показал, что $\chi^2 = 3,641$; V Крамера = 0,237; $p = 0,303$, что свидетельствует об отсутствии связи между выявленными геновариантами штаммов и антибиотико-

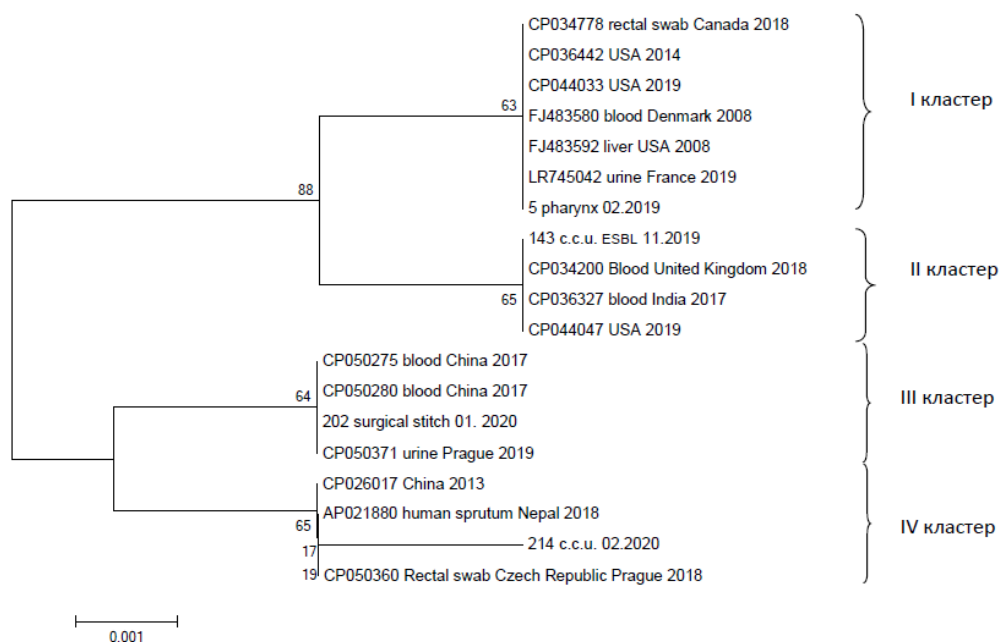


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов *Klebsiella pneumoniae*, построенное при анализе нуклеотидных последовательностей гена *fim* (460 н.т.).

Fig. 2. Phylogenetic tree for nucleotide sequences of *fim* gene of *Klebsiella pneumoniae* strains (460 n.t.).

резистентностью за счёт БЛРС. Таким образом, с высокой долей вероятности можно утверждать, что гены *ige* и *fim* не обеспечивают молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамам антибиотикам.

Проведенный генетический анализ показал, что все штаммы в изучаемой популяции *K. pneumoniae* можно разделить на 4 группы:

- 1) штаммы, не имеющие генов *ige* и *fim* ($n = 27$);
- 2) изоляты, в которых детектирован ген *ige* ($n = 23$);
- 3) штаммы с геном *fim* ($n = 3$);
- 4) бактерии, содержащие оба гена ($n = 12$).

Таким образом, с целью дифференциации бактерий внутри каждой группы необходимы дополнительные методы исследования.

Обсуждение

Для оценки внутривидового разнообразия бактерий может быть использован метод мультилокусного сиквенса-типирования, при котором анализируют нуклеотидные последовательности 7 генов «домашнего хозяйства», присутствующих у всех штаммов *K. pneumoniae*, и выявляют клональные комплексы эпидемических генетических линий [20]. Однако указанный метод не позволяет анализировать гены факторов вирулентности. Использование для оценки степени родства детекции и анализа генетических детерминант вирулентности позволит не только определить субтипологию штаммов, но и оценить их патогенный потенциал.

Учитывая, что ген *ige* среди изучаемой популяции *K. pneumoniae* встречается чаще, чем *fim*, он может быть выбран для индикации и проведения молекулярно-генетического мониторинга, направленного на предупреждение распространения в стационаре бактерий, обладающих патогенным потенциалом, и профилактику инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Результаты филогенетического анализа последовательностей генов *ige* и *fim* демонстрируют гетерогенность изучаемой популяции штаммов *K. pneumoniae*, что подтверждено широкой географией и временем выявления наиболее генетически близких бактериальных изолятов. Отсутствие четкой кластеризации по временному и территориальному признаку, возрасту пациента и биологическому материалу исключает наличие общих молекулярно-генетических признаков, объединяющих группу штаммов из изучаемой популяции, отвечающих за тропность бактерий к определенным тканям человеческого организма. В то же время монофилитическое происхождение гипервирулентных штаммов, напротив, может указывать на мутации в гене *ige*, определяющие более выраженные вирулентные свойства. Следовательно, детекция вышеуказанного гена предоставляет ценную дополнительную информацию для клинических суждений и является перспективным направлением для дальнейших исследований.

Отсутствие одновременного выявления на протяжении длительного времени штаммов одного субварианта свидетельствует, с одной стороны,

о проведении эффективных противоэпидемических мероприятий, препятствующих длительной циркуляции штаммов среди пациентов стационара, с другой — о возможном существовании разных источников инфицирования.

Также необходимо отметить, что в международной базе генетической информации содержится недостаточное количество задепонированных нуклеотидных последовательностей изучаемых генов для оценки генетического родства штаммов *K. pneumoniae*, выделенных на территории России. Для выявления региональных особенностей циркуляции штаммов необходимо создание локальных баз данных. Использование таких подходов к определению идентичности и сравнению нуклеотидных последовательностей генов факторов вирулентности позволит разработать алгоритм проведения молекулярно-генетического мониторинга за циркуляцией штаммов в лечебном учреждении и оценки распространенности бактерий, обладающих разным патогенным потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

- Lu B., Lin C., Liu H., Zhang X., Tian Y., Huang Y., et al. Molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from outpatients in sentinel hospitals, Beijing, China, 2010-2019. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 85. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00085>
- Mukherjee S., Bhattacharjee A., Naha S., Majumdar T., Debbarma S.K., Kaur H., et al. Molecular characterization of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST29, ST347, ST1224, and ST2558 causing sepsis in neonates in a tertiary care hospital of North-East India. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69: 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.024>
- Wang B., Pan F., Wang C., Zhao W., Sun Y., Zhang T., et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 93: 311–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.009>
- Сергеевич В.И., Кудрявцева Л.Г., Пегушина О.Г., Волкова Э.О., Решетникова Н.И. Групповая заболеваемость гнойно-септическими инфекциями клебсиеллезной этиологии пациентов кардиохирургического стационара. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020; 19(1): 90–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-90-98>
- Aslanov B., Lubimova A., Dolgiy A., Pshenichnaya N. Bacteriophages for the control of *Klebsiella* outbreak in the neonatal intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 73(5): 295. (in German)
- Кузьменко С.А., Шамакова М.А., Брусина Е.Б. Факторы риска инфицирования *Klebsiella pneumoniae* пациентов детских медицинских организаций. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2020; 19(2): 40–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-20-2-40-47>
- Дубоделов Д.В., Любасовская Л.А., Шубина Е.С., Мукошей И.С., Коростин Д.О., Кочеткова Т.О. и др. Генетические детерминанты резистентности к β-лактамам антибиотикам госпитальных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных. *Генетика.* 2016; 52(9): 1097–102. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090046>
- Козловских Д.Н., Романов С.В., Диконская О.В. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Свердловской области в 2019 году». Екатеринбург; 2020.

- Shah R.K., Ni Z.H., Sun X.Y., Wang G.Q., Li F. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. *Pol. J. Microbiol.* 2017; 66(4): 501–8. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>
- Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019; 5(6): e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
- Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., et al. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* 2003; 185(24): 7213–21. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003>
- Regué M., Hita B., Piqué N., Izquierdo L., Merino S., Fresno S., et al. A gene, uge, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* 2004; 72(1): 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>
- Ikeda M., Mizoguchi M., Oshida Y., Tatsuno K., Saito R., Okazaki M., et al. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *Int. J. Gen. Med.* 2018; 11: 293–9. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s166940>
- Zhang S., Zhang X., Wu Q., Zheng X., Dong G., Fang R., et al. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8: 166. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0615-2>
- Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Иванова Е.И., Немченко У.М., Савельяева М.В. Детекция генетических детерминант патогенности у штаммов *Klebsiella* spp., выделенных из кишечного биотопа детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. *Acta Biomedica Scientifica.* 2018; 3(5): 60–5. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.5.9>
- Лев А.И. Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. 2018; Оболенск.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Mataseje L.F., Boyd D.A., Mulvey M.R., Longtin Y. Two hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a bla KPC-2 carbapenemase from a Canadian patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e00517-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00517-19>
- Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 4178–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>

REFERENCES

- Lu B., Lin C., Liu H., Zhang X., Tian Y., Huang Y., et al. Molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from outpatients in sentinel hospitals, Beijing, China, 2010-2019. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 85. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00085>
- Mukherjee S., Bhattacharjee A., Naha S., Majumdar T., Debbarma S.K., Kaur H., et al. Molecular characterization of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST29, ST347, ST1224, and ST2558 causing sepsis in neonates in a tertiary

- care hospital of North-East India. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 69: 166–75. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.024>
3. Wang B., Pan F., Wang C., Zhao W., Sun Y., Zhang T., et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a paediatric hospital in China. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 93: 311–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.02.009>
 4. Sergevnin V.I., Kudryavtseva L.G., Pegushina O.G., Volkova E.O., Reshetnikova N.I. Group incidence by purulent-septic infections of clebsiellous etiology in cardiosurgical patients. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2020; 19(1): 90–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-1-90-98> (in Russian)
 5. Aslanov B., Lubimova A., Dolgiy A., Pshenichnaya N. Bacteriophages for the control of *Klebsiella* outbreak in the neonatal intensive care unit. *Int. J. Infect. Dis.* 2018; 73(5): 295. (in German)
 6. Kuz'menko S.A., Shmakova M.A., Brusina E.B. Risk factors of *Klebsiella pneumoniae* infections in pediatric healthcare settings. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2020; 19(2): 40–7. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-20-2-40-47> (in Russian)
 7. Dubodelov D.V., Lyubasovskaya L.A., Shubina E.S., Mukosey I.S., Korostin D.O., Kochetkova T.O., et al. Genetic determinants of resistance of hospital-associated strains of *Klebsiella pneumoniae* to β -lactam antibiotics isolated in neonates. *Genetika.* 2016; 52(9): 993–8. <https://doi.org/10.1134/S1022795416090040>
 8. Kozlovskikh D.N., Romanov S.V., Dikonskaya O.V. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Sverdlovsk region in 2019». Ekaterinburg; 2020. (in Russian)
 9. Shah R.K., Ni Z.H., Sun X.Y., Wang G.Q., Li F. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients. *Pol. J. Microbiol.* 2017; 66(4): 501–8. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.7042>
 10. Vargas J.M., Moreno Mochi M.P., Nuñez J.M., Cáceres M., Mochi S., Del Campo Moreno R., et al. Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon.* 2019; 5(6): e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
 11. Izquierdo L., Coderch N., Piqué N., Bedini E., Corsaro M.M., Merino S., et al. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* 2003; 185(24): 7213–21. <https://doi.org/10.1128/jb.185.24.7213-7221.2003>
 12. Regué M., Hita B., Piqué N., Izquierdo L., Merino S., Fresno S., et al. A gene, uge, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infect. Immun.* 2004; 72(1): 54–61. <https://doi.org/10.1128/iai.72.1.54-61.2004>
 13. Ikeda M., Mizoguchi M., Oshida Y., Tatsuno K., Saito R., Okazaki M., et al. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan. *Int. J. Gen. Med.* 2018; 11: 293–9. <https://doi.org/10.2147/ijgm.s166940>
 14. Zhang S., Zhang X., Wu Q., Zheng X., Dong G., Fang R., et al. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* 2019; 8: 166. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0615-2>
 15. Grigorova E.V., Rychkova L.V., Ivanova E.I., Nemchenko U.M., Savel'kaeva M.V. Detection of genetic determinants of pathogenicity of strains of *Klebsiella* spp. isolated from the intestinal biotope of children with functional gastrointestinal disorders. *Acta Biomedica Scientifica.* 2018; 3(5): 60–5. <https://doi.org/10.29413/ABS.2018-3.5.9> (in Russian)
 16. Lev A.I. Molecular genetic characteristics of clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*: virulence and antimicrobial resistance: Diss. 2018; Obolensk. (in Russian)
 17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 18. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
 19. Mataseje L.F., Boyd D.A., Mulvey M.R., Longtin Y. Two hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a bla KPC-2 carbapenemase from a Canadian patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(7): e00517-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00517-19>
 20. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(8): 4178–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.8.4178-4182.2005>

Информация об авторах

Устюжанин Александр Владимирович[✉] — к.м.н., с.н.с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-7652>.
E-mail: ust103@yandex.ru

Чистякова Гузель Нуховна — д.м.н., проф., рук. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0852-6766>.

Ремизова Ирина Ивановна — к.б.н., с.н.с. научного отделения иммунологии, микробиологии, патоморфологии и цитодиагностики ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт охраны материнства и младенчества», 620028, Екатеринбург, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4238-4642>.

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors

Aleksander V. Ustyuzhanin[✉] — Ph.D. (Med.), senior researcher, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8521-7652>.
E-mail: ust103@yandex.ru

Guzel' N. Chistyakova — D. Sci. (Med.), Prof., Head, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0852-6766>.

Irina I. Remizova — Ph.D. (Biol.), senior researcher, Scientific department of immunology, microbiology, pathomorphology and cytodiagnosics, Ural Scientific Research Institute of Maternity and Child Care, 620028, Yekaterinburg, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4238-4642>.

Contribution: the authors contributed equally to this article.