

Чулкова Полина Сергеевна

**Конвергенция вирулентности и антимикробной
резистентности у *Klebsiella pneumoniae***

1.5.11. Микробиология
(Биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель:

Сидоренко Сергей Владимирович — чл.-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», научно-исследовательский отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, заведующий отделом.

Официальные оппоненты:

Марданов Андрей Владимирович — доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики «Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Шитиков Егор Александрович — доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «11» октября 2024 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) – микроорганизм, который на протяжении последних десятилетий, по данным ряда исследований, стабильно входит в тройку ведущих патогенов в этиологии широкого круга внебольничных и госпитальных инфекций, представляя серьезную проблему для здравоохранения (GBD Antimicrobial Resistance Collaborators 2022).

Варианты взаимоотношений хозяин-паразит между клебсиеллами и человеком варьируют в широких пределах от бессимптомного носительства до патогенности. На сегодняшний день у клебсиелл, как и других возбудителей инфекционных болезней, можно выделить два основных свойства, определяющих их значимость для здравоохранения: вирулентность и антимикробную резистентность. С момента описания двух патотипов возможность совмещения этих свойств в одной генетической линии была темой научных дискуссий и рассматривалась как одна из фундаментальных проблем микробиологии. Долгий период времени преобладало мнение о низкой вероятности подобного сценария, в том числе, и в отношении *K. pneumoniae* с учетом того, что в значительной части случаев детерминанты вирулентности и антимикробной резистентности локализованы на подвижных генетических элементах, и приобретение большого количества дополнительного генетического груза неизбежно приведет к снижению адаптивности и конкурентоспособности микроорганизма. Во многом это определяется геномикой и популяционной структурой *K. pneumoniae*. Геном типичных штаммов *K. pneumoniae* представлен 5000-6000 генами, из которых приблизительно 1 700 относятся к «ядерному» геному, а остальные, в том числе и большинство генов резистентности и вирулентности – к вспомогательному. Вспомогательный геном у отдельных изолятов *K. pneumoniae* крайне вариабелен, благодаря чему размер пан-генома (сумма ядерных и всех известных вспомогательных генов) может достигать 30 000 (К. Е. Holt, et al. 2015).

На основании филогенетического анализа глобальной популяции *K. pneumoniae*, в ней удастся выделить несколько сотен обособленных генетических линий, обозначаемых как CG (clonal groups – клональные группы) (К. L. Wyres, et al. 2020). По выраженности таких свойств, как вирулентность и антимикробная резистентность, среди отдельных CG наблюдается широкая вариативность, однако при этом проявляется четкая тенденция: у представителей отдельных групп проявляется либо повышенная вирулентность, либо резистентность. С генотипическим разделением популяции *K. pneumoniae* в значительной степени совпадает и фенотипическая дифференцировка популяции *K. pneumoniae* на два патотипа: классические *K. pneumoniae* (сКр) и гипервирулентные (hvКр).

Исторически, первое описание возбудителя тяжелых пневмоний с высоким уровнем летальности, именуемого бациллой Фридендера, относят к 1882 г. В рамках современной микробиологии первые упоминания о hvКр датируются 1986 годом (Liu, Cheng et al. 1986). Долгое время hvКр считались специфичными для

внебольничной среды в странах тихоокеанского региона. Для hvKp характерны низкие летальные дозы в мышинной модели сепсиса ($LD_{50} < 10^3$ КОЕ/мл), обусловленные наличием неконъюгативной консервативной плазмиды pLVPK, а также сохранение чувствительности к антибиотикам. HvKp вызывают заболевания, характеризующиеся многоочаговым поражением с метастатическим распространением из первичного очага инфекции, могут быть причиной инвазивного абсцесса печени, гнойно-воспалительных заболеваний, поражения центральной нервной системы, некротического фасциита или эндофтальмита у исходно здоровых лиц (Kong, Yu et al. 2017). Для нормального метаболизма клебсиелл необходима продукция сидерофоров, связывающих ионы железа из внешней среды. К хромосомным сидерофорам относят энтеробактин, продуцируемый всеми клебсиеллами, и иерсиниобактин. HvKp чаще относятся к капсульным типам K1 и K2 и характеризуются наличием двух дополнительных плазмидно-локализованных сидерофоров – сальмохелина и аэробактина.

СКр, характерные для внутрибольничной среды, обладают низкой вирулентностью, но часто проявляют множественную устойчивость к антибиотикам (multiple drug resistance – MDR). В 2013 г. центр по контролю и профилактике заболеваний США (Centre for disease control – CDC) опубликовал список возбудителей, представляющих непосредственную угрозу здоровью населения, в число которых вошли *Enterobacteriaceae*, устойчивые к карбапенемам, считающимся на сегодняшний день препаратами выбора при лечении наиболее тяжелых инфекций. В 2017 году ВОЗ подтвердила распространяющуюся угрозу карбапенем-устойчивых *Enterobacteriaceae*, а также ряда других патогенов, требующих приоритетности в разработке новых антибиотиков.

Принципиальное изменение ситуации произошло в 2018 году, когда в Китае была описана внутрибольничная вспышка, вызванная множественно резистентной клебсиеллой, но с уровнем летальности, характерным для hvKp (Gu, Dong et al. 2018). С тех пор стало появляться всё больше и больше сообщений по распространению конвергентных изолятов *K. pneumoniae*, объединяющих оба патотипа, которые могут вызывать высокую летальность в том или ином лечебном учреждении.

Существует несколько эволюционных путей формирования генетических линий *K. pneumoniae*, демонстрирующих высокую вирулентность и устойчивость к карбапенемам, и все они связаны с горизонтальным переносом генов: приобретение каноническими вирулентными линиями плазмид с генами резистентности или же приобретение плазмид с основными маркерами гипервирулентности генетическими линиями, характеризующимися множественной резистентностью. На сегодняшний день растет число публикаций о случаях обнаружения *K. pneumoniae*, несущих несколько плазмид, каждая из которых содержит либо гены вирулентности, либо резистентности, однако данные о гибридных плазмидах, несущих одновременно детерминанты резистентности к карбапенемам и гены вирулентности, крайне ограничены.

Остается открытым вопрос о роли отдельных генов вирулентности в экспрессии гипервирулентного и конвергентного патотипов.

Степень разработанности

Ретроспективный анализ коллекций клебсиелл (Liu and Guo, 2019) показал, что появление гипервирулентных карбапенем-устойчивых клебсиелл (CR-hvKp) относят к 2008 г., тем не менее, конвергенция свойств двух патотипов клебсиелл представляет собой относительно новое явление, многие детали проявления которого не ясны.

В Великобритании описано 12 изолятов *K. pneumoniae*, несущих гибридные плазмиды, относящихся к внутрибольничным генетическим линиям (ST15, 48, 101, 147 и 383). Идентичные плазмиды были обнаружены в Швейцарии (у семи изолятов) и Тоскане во время описания вспышки в 2018-2021 гг., вызванной теми же генетическими линиями клебсиелл. Плазмиды, идентичные двум другим английским гибридным плазмидам, также были выявлены в Египте (ST11, 383), Чехии и на Среднем Востоке (ST15, 377). Таким образом, мы наблюдаем распространение «английских» плазмид по европейскому континенту, юго-западу и России. Также, гибридные плазмиды, несущие комбинацию признаков двух патотипов клебсиелл, на сегодняшний день были описаны в Германии (ST307), Китае (ST11), Японии (ST147).

До момента проведения данного исследования (Starkova, Lazareva et al. 2021), в России не публиковались данные о конвергентных изолятах *K. pneumoniae* с подтвержденными гибридными плазмидами, несущими гены карбапенемазы и гипервирулентности одновременно. Однако в 2023 г. были описаны CR-hvKp ST39, 512, несущие гибридную плазмиду, причём в первом случае, три изолята, также несли две другие плазмиды с карбапенемазами NDM-1 и KPC-2.

Цель исследования

Оценить распространение и охарактеризовать генетические линии *K. pneumoniae*, обладающие признаками конвергентного патотипа.

Задачи исследования:

1. Сформировать коллекцию изолятов *K. pneumoniae* с признаками классического, гипервирулентного и конвергентного патотипов.
2. Провести фенотипическую и генотипическую характеристику изолятов *K. pneumoniae*, включенных в коллекцию, отобрать изоляты с признаками конвергентного патотипа.
3. Провести секвенирование геномов отобранных изолятов на платформах Illumina и Oxford Nanopore, охарактеризовать их резистом и вирулом.
4. Расшифровать структуру гибридных плазмид, одновременно несущих гены устойчивости к карбапенемным антибиотикам и вирулентности.

Научная новизна

Установлено, что одним из направлений эволюции *K. pneumoniae* в госпитальных условиях является формирование конвергентного патотипа – генетических линий, обладающих одновременно фенотипическими признаками и генетическими маркерами повышенной вирулентности и множественной антимикробной резистентности. Показано, что ведущим и потенциально наиболее опасным механизмом возникновения конвергентного патотипа *K. pneumoniae* является формирование гибридных плазмид, несущих одновременно гены антимикробной резистентности и повышенной вирулентности и обладающих способностью к конъюгативному переносу.

Однотипные гибридные плазмиды длиной более 300 т.п.о., несущие одновременно гены карбапенемаз NDM-типа и гены, связанные с повышенной вирулентностью, обнаружены среди *K. pneumoniae*, относящихся к генетическим линиям ST395, ST147, ST15, ST874. Сравнительный генетический анализ выявил распространение указанных генетических линий на значительных географических территориях, включающих Азиатские и Европейские регионы Российской Федерации, Европу, Северную Африку и Серную Америку. На фоне формирования гибридных плазмид продолжается эволюция карбапенемаз NDM-типа, проявившаяся в формировании нового варианта - карбапенемазы NDM- 29.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в выявлении нового биологического феномена – формирования стабильных гибридных плазмид, несущих одновременно гены антимикробной резистентности, и их распространения среди различных генетических линий *K. pneumoniae*. Распространение гибридных плазмид является наиболее важным механизмом формирования конвергентного патотипа *K. pneumoniae*, сочетающего свойства классического и гипервирулентного патотипов. Угроза распространения гибридных плазмид может представлять принципиальную опасность для других бактерий. Это основано на опыте быстрого распространения генов антибиотикорезистентности, а также появления изолятов *Escherichia coli*, несущих плазмиды с генами карбапенемаз и детерминант вирулентности одновременно.

Практическая значимость работы состоит в выявлении в России высокой частоты распространения среди CRKp, генов биосинтеза аэробактина (80%), являющихся основными маркерами гипервирулентности, что свидетельствует о широком распространении конвергентного патотипа, представляющего серьезную угрозу здравоохранению в связи с потенциально повышенной летальностью при соответствующих инфекциях. Полученные данные о новой биологической угрозе должны быть основой для разработки мер по сдерживанию распространения подобных генетических линий. Получен патент «Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемый в качестве тест-культуры при детекции гена NDM методом полимеразной цепной реакции для точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиеллёзных инфекций».

Полученные результаты внедрены в практическую работу ФГБУ НИИДИ ФМБА России (акт внедрения от 9.04.2024), ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе (акт внедрения от 21.05.2024).

Методология и методы исследования

Работа выполнена на основе микробиологического исследования культур *K. pneumoniae*. В работе использовались культуральные, молекулярно-генетические, биоинформатические и статистические методы анализа. Оценка LD₅₀ в септической модели подкожного инфицирования аутбредных CD1 мышей проводилась на базе Брянской межрегиональной ветеринарной лаборатории.

Положения, выносимые на защиту:

1. Распространенные на территории Российской Федерации изоляты *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа, продуцирующие карбапенемазы NDM-, OXA-48- и KPC-типов, а также несущие маркер вирулентности (*iucA*), относятся к 19-ти различным сиквенс-типам, среди которых ST395 и ST147 принадлежат к генетическим линиям, доминирующим в Европе, и ST23, ST11, ST86 – в Азии.

2. Проявление конвергентного патотипа *K. pneumoniae* связано с распространением в различных генетических линиях консервативных гибридных плазмид IncFIB/IncHI1B типа, содержащих одновременно гены карбапенемаз и гены вирулентности.

3. Плазмиды, на которых одновременно локализованы гены карбапенемаз и *h_v*, представляют собой генетические конструкции, содержащие два или три репликона и состоящие преимущественно из фрагментов плазмиды pNDM-MAR, с которой связано распространение генов *bla*_{NDM}-типа, начиная с 2012 года, и фрагментов плазмиды pLVPK, описанной в 1986 году в тихоокеанском регионе, что позволяет называть их «гибридными». Впервые в мире было продемонстрировано распространение стабильной сформировавшейся гибридной структуры, не ограниченное отдельными генетическими линиями *K. pneumoniae*.

Степень достоверности и апробация результатов работ

Результаты исследований доложены на: Российско-китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии, клинической микологии и иммунологии, XXII Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2019); XXV Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2022); XXVI Кашкинские чтения (Санкт-Петербург, 2023); XXXXII Итоговая научно-практическая конференция «Актуальные вопросы инфекционных заболеваний у детей» (Санкт-Петербург, 2020); The 30rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID, Paris, France, 2020); 31st ECCMID (Vienna, Austria, 2021); 32th ECCMID (Lisbon, Portugal, 2022); 33th ECCMID (Copenhagen, Denmark, 2023); Сириус.Биотех, Саммит разработчиков лекарственных препаратов, конференция

для молодых ученых «Будущее антимикробной терапии» (Сочи, 2023); Молекулярная Диагностика 2023 (MOLDx), (Москва, 2023).

Диссертация одобрена на заседании Локального Этического Комитета ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России.

Личный вклад соискателя

Аналитическая и экспериментальная и часть диссертационной работы выполнены самостоятельно, за исключением экспериментов на мышах, которые проводились Брянской межрегиональной ветеринарной лабораторией. Работа проводилась в рамках гранта Российского научного фонда в период 2018-2021 гг. «Механизмы формирования успешных генетических линий множественно резистентных гипервирулентных *Klebsiella pneumoniae*», руководитель Агеев И.В. (номер проекта: 18-75-10117). Отдельные этапы работы выполнены совместно с коллегами НИО медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России. Часть работы по полногеномному секвенированию была проведена совместно с сотрудниками ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, а работы по клонированию проведены совместно с коллегами из Центра трансгенеза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ.

Публикации результатов исследований

По результатам исследований опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикаций материалов диссертационного исследования. Получен патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Список литературы включает 177 источников литературы, в том числе 6 отечественных и 171 иностранных. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами и 23 рисунками.

2. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

2.1 Материалы и методы исследования

В работу включено 1290 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с разными формами внутрибольничных инфекций и с поверхностями внутрибольничной среды. Коллекция была составлена из нескольких сборов, отвечающих различным критериям. Критериями включения изолятов в результирующую коллекцию являлись продукция карбапенемаз и/или устойчивость к карбапенемным антибиотикам меропенему/эртапенему/дорипенему в соответствии с эпидемиологическими точками отсечения EUCAST, и/или гипермукоидный фенотип. Изоляты были собраны в период 2016-2022 годов из 25 лечебно-профилактических учреждений в 8-ми городах России. Из них

потенциально конвергентными, гипервирулентными и CRKp, были 444 изолята *K. pneumoniae*.

Идентификацию культур, выращенных на агаре Мюллера-Хинтона, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT. Все изоляты депонировались в музей культур и хранились при -70 °С.

Антибиотикочувствительность оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в соответствии с рекомендациями и критериями EUCAST. Дополнительно у трансформантов определяли МПК в условиях ограниченного содержания цинка в соответствии с рекомендациями Института клинических лабораторных стандартов (CLSI).

Для определения гипермукоидности изолятов *K. pneumoniae* использовался стринг-тест, описанный (Hadano 2013).

Для детекции трёх основных типа карбапенемаз, NDM, OXA-48 и KPC, использовали мультиплексную ПЦР в режиме реального времени.

Полногеномное секвенирование коротких прочтений было проведено с помощью генетического анализатора MiSeq (Illumina), длинных прочтений – на платформе Oxford Nanopore MinION. Всего было отсеквенировано 318 геномов клебсиелл, из которых 286 изолятов секвенировали методом коротких прочтений на платформе Illumina MiSeq, 65 – методом длинных прочтений на платформе Oxford Nanopore Technologies GridION. Среди них гибридная сборка была получена для девяти изолятов коллекции. Биоинформатический анализ данных проводился с использованием сервисов Unipro Ugene, SnapGene, VectorNTI-9, Центра геномной эпидемиологии, ABRicate, blastn, Kleborate, SLING, PATRIC, ISFinder, CRISPRFinder, parsnp, IQ-TREE, а также баз данных NCBI и Института Пастера. Для визуализации использовали инструменты BRIG, Easyfig, IToL. Также данные анализировались с помощью программных обеспечений Unipro Ugene, SnapGene, VectorNTI-9.

Фрагмент, содержащий промотор и ген *bla*_{NDM-29} и *bla*_{NDM-1} в качестве контроля, был лигирован в вектор pJET (AmpR) и pEGFP-N3(KanR) и клонирован в штамм XL10-Gold *Escherichia coli*.

Вирулентность отдельных изолятов гипермукоидных карбапенем-резистентных *K. pneumoniae* была проверена на мышах в модели сепсиса с последующим подсчетом LD₅₀ методом Рида и Мюнха (Reed 1938). Для инфекционной модели поводилось внутрибрюшинное заражение в дозах 10³, 10⁵, 10⁷ КОЕ/животное. Эксперимент на животных одобрен биоэтической комиссией ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия, и Брянской межрегиональной ветеринарной лаборатории, Брянск, Россия.

Все данные обработаны методами описательной статистики с использованием пакета программ MS Excel 2010, Statistica.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика коллекции изолятов *K. pneumoniae*

Изоляты коллекции *K. pneumoniae* характеризовались множественной устойчивостью к антибиотикам разных групп, что согласуется с результатами молекулярно-генетического типирования, демонстрирующего наличие в среднем 13-ти различных аллелей приобретенных генов устойчивости к восьми классам антибиотиков на изолят (Таблица 1).

подавляющее большинство изолятов проявляли резистентность к карбапенемам и цефалоспорином, что объясняется наличием генов β -лактамаз, включая карбапенемазы и БЛРС, а также мутаций мажорных поринов. Наиболее распространенными карбапенемазами были ОХА-48 (39,6%) и NDM-1 (26,1%), а также их сочетанный вариант (10,4%). Превалирование ко-продукторов NDM+ОХА-48 является логичным следствием отдельного распространения их моно-продукторов. В меньшей степени в коллекции были представлены моно- (2,8%) и ко-продукторы карбапенемазы КРС (2,2% для КРС+ОХА-48 и 0,6% для КРС+NDM). При этом большая доля продуцентов сериновых β -лактамаз (83%) проявляла резистентность к меропенему по сравнению с металло-ферментами (66%). Тем не менее, большая доля изолятов *K. pneumoniae* проявляла чувствительность в отношении комбинации ингибитор-защищенного цефалоспорином, цефтазидим-авибактам, исключение составляют продуценты МБЛ вследствие неэффективности действия авибактама против последних (20% чувствительных изолятов).

Таблица 1. Антибиотикочувствительность изолятов *K. pneumoniae*.

Антибиотик	Кол-во	%R	%I	%S	МПК ₅₀	МПК ₉₀	МПК (мкг/мл)		% изолятов с генами резистентности
							C _{геом.}	Диапазон	
Ципрофлоксацин	441	94,8	0,5	4,8	32	64	26,7	0,06 - 512	71
Цефепим	423	94,1	2,8	3,1	32	32	26,8	0,06 - 512	
Цефтазидим	433	91,9	2,1	6,0	64	128	39,8	0,06 - 512	
Меропенем	441	65,8	16,1	18,1	32	32	9,4	0,004 - 128	90 ^A , 83 ^B , 86 ^C , 84 ^D
Цефтазидим-авибактам	412	38,8	0	61,2	2	16	3,4	0,03 - 256	
Азтреонам-авибактам	433	4,6	3,0	92,4	0,25	1	0,3	0,008 - 64	
Триметоприм-сульфаметоксазол	441	84,1	2,9	12,9	64	64	29,3	0,06 - 256	90 ^E , 84 ^F
Тигециклин	441	76,6	0	23,4	2	8	1,7	0,03 - 256	0
Амикацин	441	66,7	0	33,3	64	64	22,2	0,25 - 512	98
Гентамицин	441	35,4	0	64,6	1	64	2,4	0,06 - 512	
Колистин	441	11,8	0	88,2	0,25	8	0,4	0,004 - 256	6 ^G

Примечание: C_{геом.} – средняя геометрическая; ^AГены карбапенемазы; ^B β -лактамазы и БЛРС; ^CУсечения и мутации поринов OmpK35 и OmpK36; ^DМутации генов *bla_{SHV}*; ^EГены резистентности к сульфонидам; ^FГены резистентности к триметоприму; ^GУсечения регуляторного трансмембранного белка, кодируемого геном *mgrB*.

Большая доля изолятов также проявляла устойчивость к фторхинолонам и триметоприм-сульфаметоксазолу, что подтверждается наличием соответствующих детерминант устойчивости. Несмотря на отсутствие генов устойчивости к колистину, выявлены усечения регуляторного трансмембранного белка, кодируемого геном *mgrB* (6%), что ассоциируется с резистентностью *K. pneumoniae* к данному антибиотику и подтверждается чувствительным фенотипом у 88% изолятов коллекции. Несмотря на выявление детерминант устойчивости к аминогликозидам у 98% штаммов, микробиологически изоляты проявляли переменный фенотип к амикацину и гентамицину (66,7%, 35,4% устойчивых, соответственно). При этом продуценты МБЛ проявляли меньшую чувствительность к последним (27% чувствительных изолятов к гентамицину, 16% – к амикацину), нежели продуценты СБЛ (42% чувствительных изолятов к гентамицину, 52% – к амикацину). По результатам полногеномного секвенирования были также обнаружены гены резистентности к макролидам (50%), хлорамфениколу (85%), тетрациклам (55%), рифампицину (12%).

Наибольший уровень чувствительности наблюдали к комбинации азтреонама-авибактама.

Изоляты коллекции *K. pneumoniae* несли различные аллели детерминант вирулентности. Все изоляты продуцировали сидерофор энтеробактин (биосинтез энтеробактина – *entABCDEFGHI*, транспорт энтеробактина – *ferABCDG*), фимбрии 1 и 3 типа (*fimABCDEFGHIK* и *mrkABCDEFGHIJ* соответственно), а также предполагаемый фимбриальный шаперон (*yagVWXYZ/espEDCBA*) и токсин внешней мембраны клетки, который опосредует инвазию клеток иммунитета (*ompA*). Учитывая данные (Russo, Olson et al., 2018), что ген аэробактин синтетазы является одним из пяти маркеров, с точностью 97% определяющих hvKp, обнаружение сидерофора аэробактина (биосинтез аэробактина – *iucABCD*, рецептор – *iutA*) у 80% изолятов свидетельствует о преобладании потенциально вирулентных изолятов *K. pneumoniae* в коллекции. Маркеры вирулентности, такие как иерсиниобактин (биосинтез иерсиниобактина *ybtAEPQSTUX*, рецепторный локус – *fyuA*, гены регуляторного белка железа – *irp1,2*) обнаружен у 69% изолятов *K. pneumoniae*. К другим маркерам вирулентности, характерным для коллекции, относился метаболический транспортер (*peg-344*), выявленный у 35% изолятов коллекции, и гены устойчивости к теллуриту (*terABCDEFGHIJK*) – у 75%.

Традиционно одним из признаков, отличающих hvKp от cKp, является гипермукоидный фенотип. Результаты стринг-теста показали, что 54% всей коллекции собранных изолятов и только 26% изолятов *K. pneumoniae*, имеющих ген биосинтеза аэробактина, *iucA*, проявляли гипермукоидный фенотип. При этом гены активации капсулы (*rmpADC*, *rmpA2*), которые связывают с формированием гипермукоидного фенотипа, обнаружены у 32 и 41% изолятов *K. pneumoniae* соответственно. Различия между группами не являются статистически значимыми ($p > 0,05$), из чего можно сделать вывод об отсутствии взаимосвязи между гипермукоидным фенотипом и наличием генов вирулентности в коллекции изолятов *K. pneumoniae*.

2.2.2.1 Функциональный анализ *bla*_{NDM-29}

При анализе гибридных сборок был обнаружен новый вариант МБЛ NDM-типа, NDM-29, в изоляте 1970_Kpn, выделенном в апреле 2018 года из мочи мужчины, наблюдавшегося в онкологическом центре Санкт-Петербурга. Кластерный анализ аминокислотных последовательностей всех вариантов NDM показал, что NDM-1 в эволюционном плане является наиболее близким к NDM-29. Новый вариант NDM-29 отличался от NDM-1 одной аминокислотой (D130N, 388(G→A)). Аналогичные замены присутствуют в NDM-7 и NDM-19. На основании последовательностей плазмид *K. pneumoniae* (n=244), содержащих *bla*_{NDM} (доступных в генбанке NCBI на момент исследования), вероятность мутации в 388-ом нуклеотиде гена *bla*_{NDM} составила 4%.

*Bla*_{NDM-29} локализуется на Tn125-подобном транспозоне. На плазмиде phvKpST147_NDM-29 *bla*_{NDM-29} в направлении 5' фланкирован последовательностями вставки ISAbal25-ISspu2-ISAbal25 и в направлении 3' – IS26, приобретая вид IS26-зависимого составного транспозона. Направление 5' гена *bla*_{NDM-29}, состоящее из последовательности генов *ble-iso-tat-dct*, было усечено вставкой IS26 в ген *dct*.

Было проведено исследование антимикробной чувствительности трансформантов, несущих два типа векторов с последовательностями генов *bla*_{NDM-1} и *bla*_{NDM-29} в классических условиях и в условиях имитации дефицита цинка (II) путем включения хелатора металлов – ЭДТА. В результате оценка влияния замены D130N на гидролитическую активность по отношению к β-лактамам показала, что трансформанты, несущие *bla*_{NDM-29}, проявляют такую же устойчивость к β-лактамам, как и трансформанты, несущие *bla*_{NDM-1}.

Изменение стабильности фолдинга белка в позиции 130 аминокислотной последовательности ($\Delta\Delta G_u = -0,3330$) является нейтральным по сравнению с NDM-1.

2.2.3 Анализ клональной структуры изолятов *K. pneumoniae*

В исследуемую коллекцию *K. pneumoniae* вошли изоляты 19 генетических линий, включающих однолокусные варианты, что свидетельствует о значительном генетическом разнообразии изолятов *K. pneumoniae*, циркулирующих в России. Большинство из представленных сиквенс типов относились к внутрибольничным генетическим линиям ST395, ST147, часть изолятов была представлена международными клонами повышенного риска, такими как европейские линии, ассоциированные с MDR-фенотипом ST512, ST11, ST15, ST307, ST101, что может объясняться географическим расположением России, находящейся между Европой и Азией. Кроме глобально распространенных, было выявлено несколько генетически изолированных линий ST39, ST48, ST870, ST874, ST2461, ST336, ST377, ST3551, ST4023, ST5351. Среди обнаруженных генетических линий к гипервирулентным линиям относились ST23, ST86. Превалирующей группой коллекции являются карбапенем продуцирующие изоляты, несущие гены биосинтеза аэробактина и иерсиниобактина. В частности, преобладали ST395/KL2 продуценты NDM, ST395/KL39 продуценты OXA-48.

Принимая во внимание тот факт, что гены, связанные с hv, так же, как и гены, кодирующие карбапенемазы, наиболее часто обнаруживаются на плаزمиде и переносятся горизонтально, для оценки эпидемиологии CR-hvKp, был проведен анализ распространения плазмидных репликонов. В ходе проведенного исследования, с использованием базы данных PlasmidFinder среди всех изолятов коллекции было выявлено 30 различных вариантов репликонов плазмид. Как и в случае MDR-Kp, для изолятов в коллекции характерно большое разнообразие репликонов плазмид – в среднем 6,2 репликона на изолят (от 1 до 22). Наибольшей представленностью обладал репликон IncH1B_1_pNDM-MAR (n=258), другими распространенными репликонами были репликоны F-типа, в которые входили IncFIB(Mar)_1_pNDM-Mar (n=183), IncFIB(K)_1_Kpn3 (n=120), IncFII_1_pKP91 (n=137), а также репликоны группы IncR_1 (n=183) и небольшие плазмиды Col-типа (Col440I_1, n=242; Col440II_1, n=221; ColRNAI_1, n=168). Проведенный анализ показал, что как детерминанты резистентности (генов карбапенемаз, БЛРС) и вирулентности (гены аэробактина, иерсиниобакина), как правило, не проявляют строгой ассоциированности с конкретными типами плазмид, так и определенные репликоны плазмид – с генетическими линиями. Выявлено присутствие у 81% изолятов, несущих основные маркеры вирулентности, репликона IncFIB, включая IncFIB(K), IncFIB(Mar) и IncFIB(pQil), IncFIB(pKPHS1).

На основании данных полногеномного секвенирования уточненными критериями отнесения изолятов коллекции к CR-hvKp является наличие кластера генов биосинтеза аэробактина, и как минимум одного гена, кодирующего карбапенемазы. Таким образом, среди отсеквенированной коллекции изолятов *K. pneumoniae* к CR-hvKp относились 239 изолятов. На их основе была построена филогенетическая структура популяции отсеквенированной коллекции *K. pneumoniae* по принципу SNP-анализа ядерного генома методом максимального правдоподобия. Клональное дерево демонстрирует гетерогенность коллекции, так, разнообразие популяции в отдельном городе может складываться как из двух распространенных генетических линий, так и состоять из специфических линий для каждого региона. Помимо повсеместного распространения клебсиелл, несущих одновременно маркеры вирулентности и гены устойчивости к карбапенемам, наблюдается характерный набор детерминант и репликонов для каждой ветви.

Среди популяции *K. pneumoniae* выявлено широкое распространение с одной стороны генов резистентности среди азиатских генетических линий, так и основных генов вирулентности, которые описаны (Russo, Olson et al., 2018) как маркеры, с высокой специфичностью связанные с гипервирулентным патотипом, у генетических линий, для которых характерен исключительно MDR фенотип (Таблица 3).

Глобальное распространение признаков, ассоциированных с гипервирулентностью, также подтверждается картированием ($\geq 50\%$ покрытия) генома у 78% изолятов коллекции *K. pneumoniae* на каноническую вирулентную плазмиду pLVPK.

Таблица 3. Доля изолятов *K. pneumoniae*, несущих маркеры вирулентности (*iucA*, *ybt*, *rmpA*, *rmpA2*, *iroB*), гены карбапенемаз (*bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*), типов репликаонов плазмид (IncFIB(K), IncFIB(Mar), IncHI1B).

ST	общее кол-во, шт	Доля изолятов, несущих маркер, %										
		<i>iucA</i>	<i>ybt</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	<i>iroB</i>	<i>bla_{NDM}</i>	<i>bla_{OXA-48}</i>	<i>bla_{KPC}</i>	IncFIB(K)	IncFIB(Mar)	IncHI1B
395	152	80,3	92,1	28,3	33,6	0	29,6	71,7	0	4,6	53,9	78,9
147	31	64,5	19,4	48,4	48,4	0	83,9	25,8	6,5	29	61,3	93,5
874	22	95,5	0	63,6	90,9	0	86,4	50	0	81,8	100	95,5
39	21	90,5	100	47,6	52,4	0	61,9	42,9	19,0	66,7	47,6	90,5
11	16	50	0	0	0	0	100	62,5	0	81,3	0	50
23	14	100	100	57,1	92,9	0	7,1	85,7	7,1	92,9	7,1	21,4
377	12	100	83,3	25	33,3	0	16,7	75	0	100	100	91,7
15	11	81,8	0	45,5	63,6	0	90,9	9,1	0	72,7	81,8	100
307	10	80	70	0	0	0	40	50	0	100	80	80
101	7	57,1	100	14,3	14,3	0	0	28,6	100	57,1	42,9	100
3551	7	100	100	0	0	0	0	100	0	0	71,4	100
512	6	33,3	50	0	33,3	0	0	33,3	66,7	100	33,3	66,7
336	2	100	100	0	50	0	0	100	0	100	0	100
48	2	100	0	100	100	0	100	0	0	0	100	100
2461	1	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	100
4023	1	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	100
5351	1	100	100	100	100	0	100	0	0	0	100	100
86	1	100	100	100	100	100	0	0	0	100	0	100
870	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0

2.2.4 Характеристика гибридных плазмид представителей *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа

Для плазмидного анализа, в частности, характеристики плазмидных структур, а также локализации детерминант резистентности и вирулентности, из исходной коллекции были отобраны девять стринг-тест положительных и *bla_{NDM}*-продуцирующих изолятов *K. pneumoniae* (один из них не продуцировал NDM). На основании МЛСТ три изолята *K. pneumoniae* принадлежали к линии ST147-KL20 (CC147), четыре – к линии ST395-KL2 (CG395), один – к линии ST874-KL45 (CG258) и один – к линии ST15-KL19 (CG15). При этом два изолята (1657_Крп, 1659_Крп), относящихся к разным клональным линиям (ST395, ST147), были выделены с разницей в один день от одного пациента с летальным исходом.

Все изоляты несли от одной до четырех плазмид, в том числе крупную (~311-422 т.п.н.) плазмиду, несущую маркеры вирулентности (Рисунок 1). Анализ

последовательностей плазмид показал, что гибридная плазида содержала два типа репликонов IncFIB и IncHI1B, которые несли гены MDR и вирулентности, соответственно. У гибридных плазмид phvKpST395_2024, phvKpST395_NDM-1_1657 и phvKpST395_NDM-1_2512 обнаруживался дополнительный IncR тип-репликона. Наиболее близкими плазмидами из глобальной базы данных NCBI были pKpvST383L изолята *K. pneumoniae* KpvST383_NDM_OXA-48 (NCBI CP034201.2) и pKpvST147B_virulence (CP040726.1) изолята *K. pneumoniae* KpvST147B_SE1_1_NDM из двух разных стационаров Лондона, а также p51015_NDM_1 (CP050380.1) изолята *K. pneumoniae* 51015, выделенного в Чехии, относящиеся к такому же коинтегрированному типу репликона (IncFIB/IncHI1B).

Гибридные плазмиды типа IncFIB/IncHI1B анализируемых изолятов содержали ключевые маркеры вирулентности, такие как кластер генов биосинтеза аэробактина (*iucABCD*), его рецептор (*iutA*), гены синтеза капсульных полисахаридов (*rmpA*, *rmpA2*), метаболический транспортер (*peg-344*, *pagO*), другие гены, связанные с гипервирулентностью (*cobW*, *luxR*, *shiF* и *udjA*) и гены, кодирующие устойчивость к тяжелым металлам, такие как *terBEDWXZ* (устойчивость к теллуриду).

В отличие от остальных изолятов, 2024_Kpn нёс наименьший набор генов вирулентности на гибридной плазмиде IncFIB/IncHI1B/IncR. В частности, у него отсутствовали *iucBCD*, *iutA*, *rmpA2*, *pagO* и *udjA*, которые наблюдались у остальных анализируемых изолятов. Кроме того, все гибридные плазмиды содержали гены, кодирующие белки конъюгативного переноса, что свидетельствует о возможности горизонтального переноса плазмид. В дополнение, во всех плазмидах IncFIB/IncFII были обнаружены гены устойчивости к тяжелым металлам, такие как *silABCEFGPRS* (к серебру), *arsABC DR* (к мышьяку) и *rsoABC DERS* (к меди), а также в нескольких плазмидах IncR были обнаружены гены устойчивости к ртути – *merARCTP*.

Таким образом, локализация генов вирулентности и MDR на одной гибридной плазмиде (IncFIB/IncHI1B, для изолята 2024_Kpn на плазмиде типа IncFIB/IncFII) для всех изолятов коллекции соответствует характеристике мозаичных плазмид, несущих детерминанты вирулентности и MDR.

Для стабильного наследования, а также эффективного горизонтального переноса подобных МГЭ плазмиды кодируют собственные механизмы поддержания. Помимо плазмидной несовместимости, ассоциированной с различными типами репликонов, к таким системам, кодируемым гибридными плазмидами относятся, токсин-антитоксिन-системы (ТА – *vapBC*, *higAB*), а также системы рестрикции-модификации (РМ – ДНК-цитозинметилтрансфераза). В ходе анализа последовательностей плазмид был обнаружен локус CRISPR, содержащий 16 спейсеров. Соответствующих этому локусу генов *cas* в последовательностях плазмид обнаружено не было.

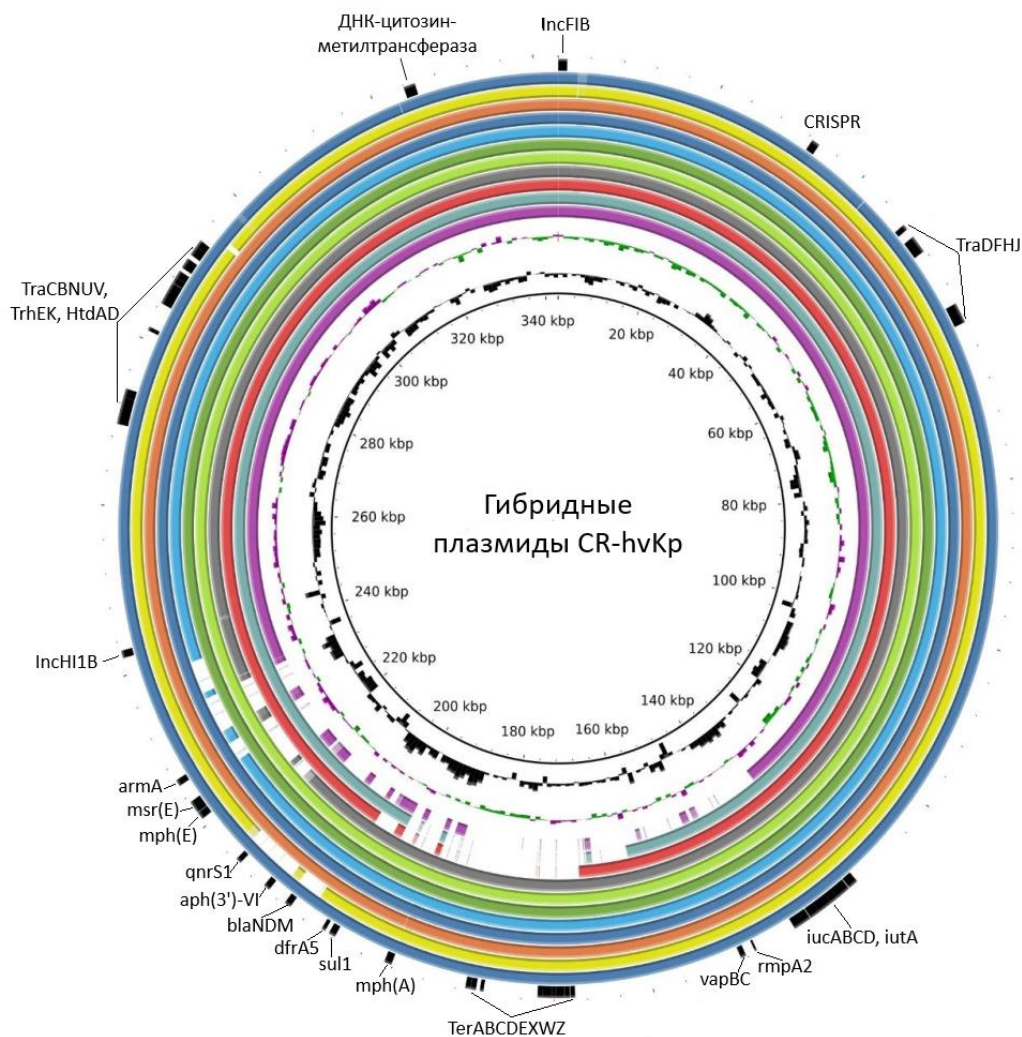


Рисунок 1 – Круговая карта гибридных плазмид *K. pneumoniae*. От внутреннего круга к внешнему расположены последовательности плазмид phvKpST395_NDM-1_2024, phvKpST147_NDM-29, phvKpST15_NDM-1_2501, phvKpST395_NDM-1_1657, phvKpST147_NDM-1_1659, phvKpST395_NDM-1_1971 (референс), phvKpST874_NDM-1_2471, phvKpST395_NDM-1_2512, phvKpST147_NDM-1_2566, и плазмиды из Великобритании – pKpST147B_virulence, pKpST383L, и Чехии – p51015_NDM_1

Примечание: На внутренних кругах отклонения GC состава обозначены темно-зеленым и фиолетовым цветом, GC контент – черным. На внешнем круге отмечены гены устойчивости к антибиотикам, гены вирулентности, трансконъюгации, систем PM, TA и CRISPR локуса.

Для определения глобального механизма формирования гибридных плазмид английского типа было представлено линейное выравнивание её последовательности вместе с последовательностью канонической вирулентной плазмиды pLVPK, а также плазмиды pNDM-MAR, несущей кластер генов, отвечающих за конъюгацию и резистентность. Гибридная плаزمиды была идентична на 31% плазмиде группы pLVPK и на 61% - pNMD-MAR, что иллюстрирует её гибридную структуру. Исходя из идентичности данных генетических структур можно предположить, что гибридные плазмиды возникли в результате инсерции генов вирулентности в плазмиду с генами резистентности.

2.2.5 Оценка вирулентности представителей *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа на модели сепсиса у мышей

Вирулентность 16 отобранных изолятов, имеющих различный набор основных маркеров вирулентности (от 0 до 5) и принадлежащих к восьми различным генетическим линиям, представлена в таблице 4. В качестве референса использовали изолят 96_Kpn, у которого отсутствовали основные маркеры вирулентности и гены карбапенемаз. По результатам экспериментов на инфекционной модели два изолята ST395/KL2 (48_Kpn, 156_Kpn), несущие четыре основных маркера вирулентности кроме генов *iroB*, проявляли минимальный уровень вирулентности ($LD_{50} = 10^7$ КОЕ). Напротив, изоляты, относящиеся к той же линии ST395/K2 (2512, 1657), с таким же составом маркеров вирулентности проявляли максимальную вирулентность ($LD_{50} = 10^3, 10^2$ КОЕ соответственно). Другие изоляты той же линии (1971_Kpn, 2024_Kpn), несущие по два разных основных маркера вирулентности проявляли низкий уровень вирулентности ($LD_{50} = 10^5$ КОЕ). Средним уровнем вирулентности ($LD_{50} = 10^4$ КОЕ) обладали изоляты линии ST147/K20 (1659_Kpn, 1970_Kpn, 2566_Kpn), несущие четыре основных маркера вирулентности, кроме сальмокселина. Изолят, относящийся к азиатской генетической линии ST23, с которым изначально связывают *hvKp*, был авирулентен. Изоляты, несущие только гены биосинтеза аэробактина и различный набор карбапенемаз (7_Kpn, 11_Kpn), также проявляли максимальную вирулентность. Несмотря на полный набор основных маркеров вирулентности, изолят ST86 проявлял средний уровень вирулентности ($LD_{50} = 10^5$ КОЕ).

Таблица 4. Молекулярно-генетическая характеристика и значения LD_{50} для 16 изолятов *K. pneumoniae*.

Изолят	ST	KL	<i>iucA</i>	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	<i>peg-344</i>	<i>iroB</i>	КОЛ-ВО маркеров hv	<i>bla</i> _{OXA-48-like}	<i>bla</i> _{NDM}	LD_{50}
86	86	2	+	+	+	+	+	5	-	-	10^5
61	23	57	+	+	+	+	-	4	+	-	$>10^7$
48	395	2	+	+	+	+	-	4	+	-	10^7
156	395	2	+	+	+	+	-	4	-	+	10^7
1657	395	2	+	+	+	+	-	4	-	+	10^2
2512	395	2	+	+	+	+	-	4	-	+	10^3
1659	147	20	+	+	+	+	-	4	-	+	10^4
2566	147	20	+	+	+	+	-	4	-	+	10^4
1970	147	20	+	+	+	+	-	4	-	+	10^4
2501	15	19	+	+	+	+	-	4	-	+	10^4
2471	874	45	+	+	+	+	-	4	-	+	10^4
1971	395	2	+	-	+	-	-	2	-	+	10^5
2024	395	2	-	+	-	+	-	2	-	-	10^5
7	147	64	+	-	-	-	-	1	+	-	$>10^7$
55	11	23	+	-	-	-	-	1	+	+	10^7
96	1662	49	-	-	-	-	-	0	-	-	$>10^7$

ВЫВОДЫ

1. На территории Российской Федерации выявлено распространение генетических линий *K. pneumoniae*, проявляющих одновременно свойства гипервирулентности и множественной антимикробной резистентности (конвергентный патотип). Более половины изученных изолятов относятся к генетической линии ST395, которая включает две сублинии с различными капсульным серотипами: KL2 и KL39. Для сублинии KL2 характерно наличие генов *bla*_{NDM}-типа, а для сублинии KL39 – *bla*_{OXA-48}-типа.

2. У 78% изолятов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы, выявлены маркеры вирулентности, ассоциированные с фрагментом, составляющим более 50% от длины канонической вирулентной плазмиды rLVPK.

3. Анализ полных геномов репрезентативных изолятов *K. pneumoniae* отдельных генетических линий ST395, ST147, ST15, ST874 показал распространение близких по нуклеотидной последовательности гибридных плазмид, на которых одновременно локализованы гены карбапенемаз и гены вирулентности.

4. Гибридные плазмиды несут локусы CRISPR, не примыкающие к генам *cas*; токсин-антитоксиновые системы II типа – VarBC; и системы рестрикции-модификации – ДНК-цитозинметилтрансфераза, что может способствовать их поддержанию и распространению.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В стационарах необходимо проводить мониторинг инвазивных форм клебсиеллёзных инфекций, а также внутрибольничной среды в помещениях, где оказывается помощь пациентам с инвазивными инфекциями. Практическим микробиологическим лабораториям целесообразно внедрять стринг-тест как фенотипический маркер для подтверждения гипервирулентного патотипа *K. pneumoniae*. При положительном стринг-тесте следует проводить молекулярную детекцию основных генов резистентности и вирулентности.

В лабораторной практике для выявления генов карбапенемаз рекомендовано проведение ПЦР на три гена *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}.

В процессе эпидемиологического надзора по распространению CR-hvKp целесообразно проводить анализ плазмидного состава с углубленным изучением репликонов плазмид, который может служить основой для разработки мер по сдерживанию распространения генетических линий высокого риска.

Для оценки эпидемиологической ситуации и обоснования мероприятий по своевременному сдерживанию распространения *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа в медицинских учреждениях рекомендовано выявлять, с одной стороны, клинические особенности, характерные для hvKp (первичный абсцесс печени, абсцессы головного мозга, другие абсцессы любой локализации, бактериемия с множественными очагами инфекции), с другой – проводить скрининг на бессимптомное носительство CR-hvKp (выявление гипермукоидного

фенотипа, карбапенемаз, маркеров hv). Своевременная изоляция пациентов, дезинфекция медицинского персонала, контактирующего с носителями, дезинфекция боксов также будут способствовать сдерживанию распространения *K. pneumoniae* с признаками конвергентного патотипа.

Список работ, опубликованных по теме диссертации в рецензируемых журналах, входящих в наукометрические базы данных, из списка ВАК и приравненных к ним:

1. Лазарева, И.В. Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию / И. Лазарева, **П. Старкова**, В. Агеевец, М. Волкова, М. Лебедева, А. Навацкая, Е. Мясникова, Г. Митрошина, С. Сидоренко // Антибиотики и химиотерапия – 2018. – Т. 63, № 11-12. – С. 18-23.

2. Lazareva, I. The emergence of hypervirulent *bla*_{NDM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital / I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, M. Lebedeva, **P. Starkova**, D. Likholetova, V. Gostev, V. Moiseenko, V. Egorenkov, A. Navatskaya, G. Mitroshina, E. Myasnikova, I. Tsvetkova, Y. Lobzin, S. Sidorenko // Infection, Genetics and Evolution – 2020. – V.85. – P. 1-6.

3. **Starkova, P.** Emergence of hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia / P. Starkova, I. Lazareva, A. Avdeeva, O. Sulian, D. Likholetova, V. Ageevets, M. Lebedeva, V. Gostev, J. Sopova, S. Sidorenko // Antibiotics – 2021. – V. 10, № 6. – P. 1-13.

4. Агеевец, В.А. Сравнительная активность карбапенемных антибиотиков в отношении грамотрицательных продуцентов карбапенемаз различных групп / Агеевец В. А., Сулян О. С., Авдеева А. А., **Чулкова П. С.**, Гостев В. В., Агеевец И. В., Голикова М. В., Алиева К. Н., Гладин Д. П., Сидоренко С. В. // Антибиотики и химиотерапия – 2022. – Т. 67, № 1-2. – С. 9-15.

5. Пат. 2797025 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 (2006.01). Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, используемый в качестве тест-культуры при детекции гена NDM методом полимеразной цепной реакции для точной диагностики и назначения антибактериальной терапии клебсиелёзных инфекций / **Чулкова П.С.**, Агеевец И. В., Авдеева А. А., Сулян О. С., Лихолетова Д. В., Агеевец В. А., Лебедева М. С., Гостев В. В., Сопова Ю. В., Сидоренко С. В. ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства». – № 2022120911; заявл. 29.07.2022; опубли. 30.05.2023, Бюл.№16. – 3с.: ил.

Другие публикации в рецензируемых журналах:

Оценка распространения ректального носительства генов вирулентности и карбапенемаз у пациентов, поступивших на плановую госпитализацию в один из специализированных стационаров Санкт-Петербурга / **Старкова П.**, Лазарева И.В., Агеевец В.А., Волкова М., Лебедева М., Навацкая А., Мясникова Е., Митрошина Г., Сидоренко С. // Материалы «Российско-Китайского Конгресса по

медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии»; XXII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 12-15 июня 2019 г. // Проблемы медицинской микологии. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 132-133.

Результаты исследований, опубликованные в материалах конференций:

1. Эпидемиологическая и микробиологическая характеристика *Klebsiella pneumoniae*, циркулирующих в многопрофильном стационаре Санкт-Петербурга / Мироненко О.В., Сельничева В.В., Сопрун Л.А., Шмушкевич Е.Н., Алексеев А.Ю., Иванов А.С., Тованова А.А., **Старкова П.С.**, Набока В.А. // Материалы «Российско-Китайского Конгресса по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии»; XXIII Кашкинские чтения, Санкт-Петербург, 9-11 ноября 2019 г. // Антибиотики и химиотерапия – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 105.

2. The emergence of new STs of *bla*_{NDM}-positive hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in an oncology hospital, Russia / **P.S. Starkova**, O.S. Sulyan, D.V. Likholetova, V.A. Ageevets, I.V. Lazareva, J.V. Sopova, S.V. Sidorenko // 30th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, 18-21 April 2020 // 30th ECCMID 2020 abstract book. – С. 3397.

3. Detection of the novel variant of NDM-type metallo- β -lactamase: significance of D130N amino acid substitution / **P. Starkova**, I. Lazareva, V. Ageevets, J. Sopova, V. Gostev, I. Tsvetkova, M. Lebedeva, S. Sidorenko // 30th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Paris, 18-21 April 2020 // 30th ECCMID 2020 abstract book. – С. 4307.

4. Клинические синдромы, характерные для инфекции, вызываемой гипервирулентными полирезистентными штаммами *K. pneumoniae*, циркулирующими в Санкт-Петербурге / Агеевец И.В., **Старкова П.С.**, Агеевец В.А., Цветкова И.А., Гостев В.В., Никитина Е.В., Калиногорская О.С., Сидоренко С.В. // Материалы «XII Всероссийского ежегодного конгресса «Инфекционные болезни у детей: диагностика, лечение и профилактика», Санкт-Петербург, 11-12 октября 2021 г. // Журнал инфектологии. – 2021. – Т. 13, № 4. – С. 27-28.

5. Emergence of the hybrid resistance and virulence plasmids harboring New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Russia / **P. Starkova**, A. Avdeeva, D. Likholetova, I. Lazareva, V. Ageevets, V. Gostev, J. Sopova, S. Sidorenko // 31th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Vienna, 9-12 July 2021. – P3760. – URL: https://elibrary.escmid.org/download/16388865100108_P3760.pdf

6. Multiclonal dissemination of multi-drug resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in Moscow and Saint Petersburg hospitals / V. Ageevets, I. Ageevets, **P. Chulkova**, M. Dyachkova, A. Matsvay, V. Shapovalova, Y. Savochkina, O. Sulian, I. Tsvetkova, G. Shipulin, S. Sidorenko // 32th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Lisbon, 23-26 April 2022. – P0522. – URL: https://elibrary.escmid.org/download/16666066859697_P0522.pdf

7. Emergence of *Escherichia coli* harboring mosaic (hypervirulent and multidrugresistant) plasmids that may have been acquired from *Klebsiella pneumoniae* / **P. Chulkova**, V. Ageevets, O. Sulian, A. Avdeeva, V. Shapovalova, A. Matsvay, V. Nurmukanova, G. Shipulin, T. Chernenkaya, S. Sidorenko // 33th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Copenhagen, 15-18 April 2023. – P0431. – URL: https://elibrary.escmid.org/download/16972023268565_P0431.pdf