

DOI: 10.32751/2310-4910-2021-28-1-13

УДК 616-082-083

**В. М. ГАНЮК¹, В. Ю. ХІЛЬ¹, В. М. КОНДРАТЮК²,
А. А. ФРАНЦІШКО¹, Л. М. ПОЛІЩУК¹**

¹ – Національний військово-медичний клінічний центр

«Головний військовий клінічний госпіталь», м. Київ, Україна

² – Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, м. Вінниця, Україна.

Аналіз фенотипів та генетичних детермінант антибактеріальної резистентності *Klebsiella pneumoniae*, що спричиняють інфекційні ускладнення, пов'язані з наданням медичної допомоги у відділенні реанімації та інтенсивної терапії для хірургічних хворих

Мета роботи: вивчити фенотип стійкості до антибіотиків та генетичні механізми, які його зумовлюють, серед ізолятів *Klebsiella pneumoniae* відділення реанімації та інтенсивної терапії.

Матеріали і методи. Локальний мікробіологічний моніторинг проведено у відділенні реанімації та інтенсивної терапії (для хірургічних хворих) Національного військово-медичного клінічного центру «Головний військовий клінічний госпіталь» (НВМКЦ «ГВКГ») протягом 2014–2020 рр. Для дослідження генетичного матеріалу методом секвенування нового покоління (next-generation sequencing) 5 клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae* направлені до репозиторію полірезистентних мікроорганізмів Військового інституту досліджень ім. Волтера Ріда (США).

Результати та їх обговорення. В аналіз включено 631 результат мікробіологічного дослідження клінічного матеріалу від 88 хворих, в яких виділено 383 мікроорганізми. *Klebsiella pneumoniae* склала найбільшу частку – 26,1% (100/383). *Klebsiella pneumoniae* виявилась домінуючим мікроорганізмом у гемокультурах – 24 ізоляти (26%). У посівах сечі 56 ізолятів (21%) та у мокроті 20 ізолятів (21%) *Klebsiella pneumoniae* посіли друге місце. Збудники *Klebsiella pneumoniae* виявили абсолютну стійкість до амінопеніцилінів, цефалоспоринів третього покоління, захищених цефалоспоринів, фторхінолонів, гентаміцину. Ефективними на рівні близько 30–40% були амікацин, фосфоміцин та досліджені карбапенеми. Тайгециклін зберігав ефективність до більше ніж 77% досліджених ізолятів. Ізоляти були стійкими одразу до кількох класів антибіотиків. Генетичні дослідження 5 ізолятів *Klebsiella pneumoniae* встановили наявність у їх геномі 23 різних генів резистентності. Стійкість до карбапенемів корелювала з наявністю *blaOXA-48*. Гени *ESBL blaCTX-M-15*, *blaSHV*, *blaTEM* виявлені у чотирьох з п'яти ізолятів. Один штам містив як метало-бета-лактамазу *blaNDM-1*, так і

метилтрансферазу *rntC 16S*. Методом *MLST* ізоляти було віднесено до трьох різних *sequence types*.

Висновки: схеми емпіричної антибактеріальної терапії хворих відділень реанімації та інтенсивної терапії обов'язково повинні включати комбінації антибіотиків. Найефективнішим є поєднання амікацину з карбапенемами. Застосування фосфоміцину та тайгецикліну необхідно регулювати для збереження ефективності цих препаратів на майбутнє.

Ключові слова: бактерії, секвенування цілого геному, фенотип, множинна стійкість, стійкість до антибіотиків, внутрішньолікарняна інфекція, *Klebsiella pneumoniae*.

Частота інфекцій, пов'язаних з наданням медичної допомоги (ІПНМД), коливається від 5 до 30% серед пацієнтів відділень реанімації та інтенсивної терапії (ВРІТ). Хоча ВРІТ складають менше 5% усіх лікарняних ліжок, вони є джерелом від 20 до 25% усіх внутрішньолікарняних інфекцій [7]. За оцінками ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), у країнах ЄС щороку реєструється понад 2,8 мільйонів стійких до антибіотиків інфекцій, внаслідок яких помирає понад 35 000 людей [3]. Зрозуміло, що розповсюдження стійких до протимікробних препаратів мікроорганізмів у ВРІТ пов'язане з широким використанням антибіотиків. Багато зусиль з нагляду спрямовані на сповільнення розповсюдженості антибіотикорезистентності [2]. Рівень антибактеріальної стійкості у ВРІТ в кілька разів вищий ніж в умовах лікарні взагалі. Пацієнти, які тривалий термін перебували у ВРІТ, мали вищі показники інфікування та смертності [7]. *Klebsiella pneumoniae* є найпоширенішим етіологічним чинником ІПНМД і може спричинити широкий спектр інфекційних захворювань. Крім того, поява та поширення карбапенем-резистентних штамів *Klebsiella pneumoniae* є надзвичайно актуальною глобальною загрозою здоров'ю людства. Стійкість до карбапенемів у *Klebsiella pneumoniae* в основному зумовлена генами карбапенемаз, що локалізовані на плазмідах. Більш того, повідомляється про штами *Klebsiella pneumoniae*, що характеризуються множинною стійкістю до антибіотиків, а саме до більшості β-лактамів, включаючи карбапенеми, та інші не-β-лактамі антибіотики. Це суттєво обмежує терапевтичні можливості і впливає на клінічний результат лікування інфекцій [1]. Досліджень, що спрямовані на вивчення особливостей стійкості клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, а тим паче генетичних механізмів, в Україні ніколи не проводили.

Мета дослідження – вивчити фенотип стійкості до антибіотиків та генетичні механізми, які його зумовлюють, серед ізолятів *Klebsiella pneumoniae*, виділених у відділенні реанімації та інтенсивної терапії для хірургічних хворих Національного військово-медичного клінічного центру «Головний військовий клінічний госпіталь» (НВМКЦ «ГВКГ»), з

метою вибору препаратів емпіричної терапії та сповільнення розвитку антибактеріальної резистентності.

Матеріали та методи

Локальний мікробіологічний моніторинг проведено у ВРІТ (для хірургічних хворих) НВМКЦ «ГВКГ» протягом 2014–2020 рр. Дослідженню підлягали кров, сеча, мокрота та ендотрахеальний аспірат. Збір матеріалу здійснювали планово двічі на тиждень (понеділок і четвер) від пацієнтів, що знаходились у відділенні довше 3-х діб та у яких, за критеріями CDC, діагностовано ПНМД [4]. Відділення розраховане на 12 ліжок хірургічного профілю, хоча на лікуванні могли знаходитись пацієнти, яким ще не виконали хірургічне втручання, але в них діагностовано захворювання, що потребувало лікування в умовах ВРІТ. Вік пацієнтів від 18 років.

Клінічний матеріал протягом двох годин доставляли до лабораторного відділення центру. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили за морфологічними характеристиками колоній, результатами фарбування за Грамом та біохімічними ознаками на панелях Erba-Lachema, MIKROLATEST® ID: ENTEROtest 24 N, STAPHYtest 24, EN-COCCUStest, NEFERMtest 24. Дислово-дифузійним методом визначали чутливість до антибіотиків на агарі Мюллера-Хінтона (Біомері, Франція) відповідно до національних стандартів. Досліджені ізоляти класифікували як чутливі або стійкі (включаючи проміжні) відповідно до міжнародної угоди [6].

Для дослідження генетичного матеріалу культури направляли до репозиторію полірезистентних мікроорганізмів Військового інституту досліджень ім. Волтера Ріда (США). Обмін культурами проводили в рамках «Згоди на подальший розвиток співробітництва та передачу матеріалів під час спільного дослідження» № W81XWH-17-0315 між Вінницьким національним медичним університетом ім. М. І. Пирогова та Військовим інститутом досліджень ім. Волтера Ріда (США).

Для аналізу було надіслано 5 клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*. Дослідження проводили методом секвенування «нового покоління» (next-generation sequencing) на платформі Applied biosystems/life technologies (SOLiD system). Порівняння виділених нуклеотидних послідовностей проводили по базі GenBank® у Національному центрі біотехнології та інформації (National Center for Biotechnology Information). Для порівняння використовували технологію BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Методом мультилокусного секвенування встановлювали належність клінічних ізолятів до глобальних типів послідовностей. Статистичну обробку проводили за допомогою програми Microsoft Excel 2016.

Результати та їх обговорення

В аналіз включено 631 результат мікробіологічного дослідження клінічного матеріалу від 88 хворих, а саме 240 обстежень крові від 88 хворих, 269 посівів сечі від 77 хворих, 97 посівів ендотрахеального вмісту/харкотиння, отриманих у 16 хворих. Встановлено наступні локуси без росту – 206 (33%) серед них 148 (62%) зразків крові, 49 (18%) зразків сечі та 4 (4%) посіви ендотрахеального вмісту/харкотиння. В проведеному дослідженні від хворих ВРІТ виділено 383 мікроорганізми.

Klebsiella pneumoniae виявилась домінуючим мікроорганізмом у гемокультурах – 24 ізоляти (26%). В посівах сечі 56 ізолятів (21%) *Klebsiella pneumoniae* посіли друге місце за *Enterococcus* spp. Також, *Klebsiella pneumoniae* виявилась другим за значенням патогеном у мокроті 20 ізолятів (21%) після *P. aeruginosa* 23 (24%). Як представлено у таблиці 1, у загальній кількості клінічних ізолятів без урахування джерела інфекції *Klebsiella pneumoniae* складала найбільшу частку – 26,1% (100/383).

Таблиця 1

Загальна характеристика збудників у ВРІТ (для хірургічних хворих)

Збудник	Кількість	
	Абс.	%
Грамнегативні бактерії		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80	19
<i>Proteus mirabilis</i>	18	4
<i>Escherichia coli</i>	18	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	1
Грампозитивні бактерії		
<i>Enterococcus</i> spp	65	15
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19	4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	13	3
<i>Streptococcus mitis</i>	8	2
<i>Corynebacterium</i>	4	1
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	1
Гриби роду <i>Candida</i>	34	8
Інші	52	12

Як представлено у таблиці 2, в загальній структурі збудники *Klebsiella pneumoniae* виявили абсолютну стійкість до амінопеніцилінів, цефалоспо-

ринів третього покоління, захищених цефалоспоринові, фторхінолонів другого покоління, гентаміцину. Ефективними на рівні близько 30–40% були амікацин, фосфоміцин та досліджені карбапенеми. Тільки тайгециклін зберігав ефективність до більше ніж 77% досліджених ізолятів. Не виявлено суттєвої різниці між поширеністю стійких ізолятів до певних антибіотиків залежно від анатомічного локусу виділення.

Таблиця 2

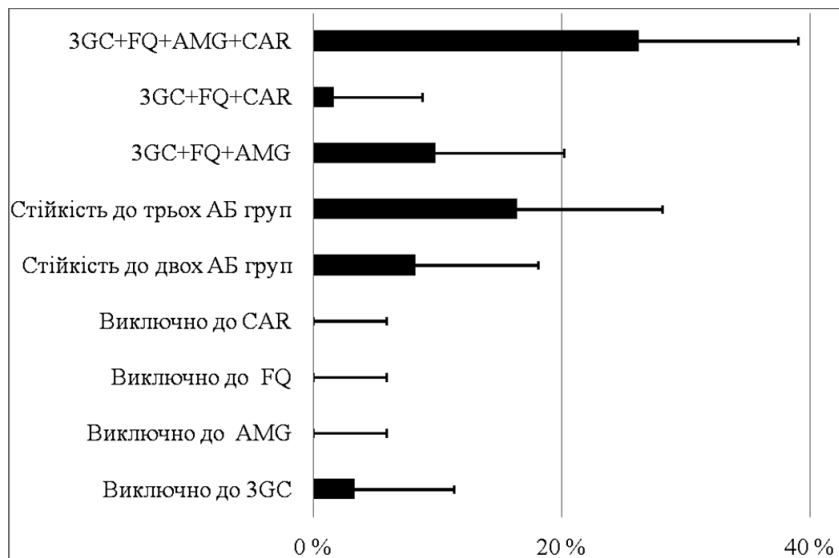
**Резистентність клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*
до антибіотиків**

Антибіотики	Кров (n=24)		Мокрота (n=20)		Сеча (n=56)		Узагальнена стійкість без урахування локусу (100)	
	С/П	%	С/П	%	С/П	%	С/П	%
AMP	13/13	100	20/20	100	50/50	100	83/100	100
AMK	15/24	62,5	10/20	50	31/49	63	56/93	60
SAM	4/5	80	20/20	100	51/51	100	75/76	99
AMC	–		20/20	100	51/51	100	71/71	100
GEN	–		13/13	100	32/35	91	45/45	100
CTX	–		20/20	100	39/39	100	59/59	100
CTR	17/17	100	20/20	100	45/45	100	82/82	100
CFP	–		11/11	100	17/17	100	28/28	100
OFX	–		20/20	100	42/43	97	62/63	98
CIP	18/18	100	8/8	100	46/46	100	72/72	100
FOM	9/17	53	10/18	56	27/50	54	46/85	54
IPM	–/5,		6/13	46	25/31	81	31/49	63
MEM	13/22	59	10/20	50	35/49	71	58/91	64
CFP	9/12	75	11/17	65	32/37	86	52/66	79
TCG	4/12	33	–/3,		–/16		4/31	13
TZP	14/18	78	–		–		14/18	78

Примітка:

AMP – Ампіцилін, AMK – Амікацин, SAM – Ампіцилін-Сульбактам,
 AMC – Амоксицилін-клавулонова кислота, GEN – Гентаміцин, CTX – Цефатоксим,
 CTR – Цефтріаксон., CFP – Цефоперазон, OFX – Офлоксацин, CIP – Ципрофлоксацин,
 FOM – Фосфоміцин, IPM – Іміпенем, MEM – Меропенем, CFP – Цефоперазон-сульбактам, TCG – Тайгециклін, TZP – Піперацилін-тазобактам,
 С/П – Стійких/Протестовано

Аналіз комбінованої стійкості до антибактеріальних препаратів виявив, що монотерапія таких інфекцій має бути визнана неефективною. Найчастіше окремі ізоляти були стійкими одразу до трьох або чотирьох основних класів антибіотиків, що показано на рисунку.



Примітка:

AMG – аміноглікозиди; 3GC – цефалоспорин третього покоління; FQ – фторхінолони; CAR – карбапенеми; АБ – антибактеріальних; T-bars – 95% довірчий інтервал

Рисунок. Аналіз комбінованої стійкості до різних груп антибіотиків

Генетичні дослідження 5-ти ізолятів *Klebsiella pneumoniae* встановили наявність у їх геномі 23 різних генів резистентності. В цілому, визначені гени цілком відповідали встановленим фенотипам. Стійкість до карбапенемів у *Klebsiella pneumoniae* корелювала з наявністю *blaOXA-48*, в одному випадку на трансмісивній плазміді. Потужні гени ESB� *blaCTX-M-15*, *blaSHV*, *blaTEM* були виявлені у чотирьох з п'яти ізолятів. Один штам містив як метало-бета-лактамазу *blaNDM-1*, так і метилтрансферазу *rmtC 16S*, що робить його нечутливим до всіх клінічно значимих аміноглікозидів та фторхінолонів. Методом MLST ізоляти були віднесені до трьох різних sequence types (ST), а саме один штам, сприйнятливий до багатьох антибіотиків, до ST-23, два інших – високостійкі штами – були віднесені

до ST-392, ще один – до ST-395, а один не був пов'язаний з будь-яким іншим ST.

За масштабом охоплення дане дослідження є локальним мікробіологічним наглядом. Детально описані фенотипи стійкості та встановлені комбінації антибіотиків, що зумовлюють множинну стійкість клінічних ізолятів *Klebsiella pneumoniae*. Більш того, *Klebsiella pneumoniae* у НВМКЦ «ГВКГ» виявилася одним з основних патогенів за частотою виділення з локусів ПНМД. Методом повного геномного секвенування підтверджені виявлені профілі стійкості, що є сильною стороною роботи.

Множинна стійкість до антибіотиків – на сьогодні загальноновизнаний феномен у світі [2], що показано і нашим спостереженням. Цей результат пов'язаний, швидше за все, з широким використанням малоефективних цефалоспоринових третього покоління та хінолонів у відділеннях хірургічного профілю НВМКЦ «ГВКГ». На відміну, фосфоміцин, який продемонстрував хорошу ефективність до вивчених бактерій, зберігає свою активність через обмеження його застосування у інших відділеннях. Його ефективність була вищою порівняно з імipенемом та меропенемом. Другим чинником, що ймовірно зумовлює таку множинну стійкість, є тривале перебування хворого у стаціонарі. Адже пацієнти майже ніколи не потрапляють безпосередньо до ВРІТ (для хірургічних хворих) з приймального відділення, а частіше переводяться з інших лікарняних палат, перебуваючи в стаціонарі понад 48 год. Також, це обтяжується попередньою антибактеріальною терапією протягом декількох діб до моменту надходження до ВРІТ, що є одним з визнаних чинником інфікування резистентною флорою [8].

Найтривожнішими знахідками є одночасна продукція ізолятами кількох потужних ферментів, що інактивують навіть антибіотики резерву. В світі дуже рідко повідомляють про одночасне виділення метало-бета-лактамаз типу NDM-1 і метилтрансферази *rmtC* 16S [5]. Враховуючи, що спостереження охопило кілька років, слід визнати, що ці ізоляти є циркулюючими у стаціонарі, а критично обмежені можливості їх ерадикації становлять не абияку загрозу хворому. Цей факт повинен бути усвідомлений всіма фахівцями, що призначають антибіотики у свої практиці. Регулюючі заходи, що обмежують призначення та встановлюють циркуляцію антибіотиків, можуть бути запроваджені за результатами цього огляду.

Встановлені результати чутливості слід використовувати у протоколах емпіричної антибактеріальної терапії, оскільки вони враховують локальні особливості лікувального процесу, притаманні багатопрофільному спеціалізованому госпіталю.

Обмеженням дослідження є його зосередженість тільки на клінічних ізолятах *Klebsiella pneumoniae*, виділених в одному ВРІТ. Проте, цей вид належить до індикаторних патогенів за визначенням ВООЗ, що підлягають нагляду, і певно, результати можуть бути інтерпольовані ширше.

Висновки

1. *Klebsiella pneumoniae* є другим за значенням патогеном, асоційованим з ІПНМД у ВРІТ для хірургічних хворих НВМКЦ «ГВКГ».
2. Серед ізолятів, що циркулюють у закладі, встановлені небезпечні і потужні комбінації генів резистентності, здатні забезпечити виживання патогена під впливом основних класів антибіотиків.
3. Схеми емпіричної антибактеріальної терапії обов'язково повинні включати комбінації антибіотиків, найперспективнішою з яких є поєднання амікацину з одним з карбапенемів.
4. Застосування препаратів фосфоміцину та тайгецикліну повинно суворо регулюватись та обмежуватись для збереження ефективності цих препаратів на майбутнє.

Перспективи наступних наукових досліджень в раціональному призначенні емпіричної схеми антибіотикотерапії у ВРІТ та зниженні резистентності флори до протимікробних препаратів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Список використаної літератури

1. Avgoulea K., Di Pilato V., Zarkotou O., Sennati S., Politi L., Cannatelli A., Themeli-Digalaki K., Giani T., Tsakris A., Rossolini G. M., Pournaras S. Characterization of Extensively Drug-Resistant or Pandrug-Resistant Sequence Type 147 and 101 OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections in Patients in an Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018. Vol. 62(7).
2. Djordjevic Z. M., Folic M. M., Jankovic S. M. Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. *J. Infect. Public Health.* 2017. Vol. 10(6). P. 740–744.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC, 2019. URL: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf (дата звернення 20.11.2020).

4. Horan T. C., Andrus M., Dudeck M. A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control.* 2008. Vol. 36(5). P. 309–332.
5. Hu Y., Liu C., Shen Z., Zhou H., Cao J., Chen S., Lv H., Zhou M., Wang Q., Sun L., Sun Q., Hu F., Wang Y., Zhang R. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008–2018. *Emerging microbes & infections.* 2020. Vol. 9(1). P. 1771–1779.
6. Magiorakos A. P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli Y., Falagas M. E., Giske C. G., Harbarth S., Hindler J. F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D. L., Rice L. B., Stelling J., Struelens M. J., Vatopoulos A., Weber J. T., Monnet D. L. Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. Vol. 8(3). P. 268–281.
7. Vincent J. L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C. D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y., Reinhart K. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA.* 2009. Vol. 302(21). P. 2323–2329.
8. Yu X., Zhang W., Zhao Z., Ye C., Zhou S., Wu S., Han L., Han Z., Ye H. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance. *BMC Genomics.* 2019. Vol. 20(1). P. 822.

References

1. Avgoulea, K., Di Pilato, V., Zarkotou, O., Sennati, S., Politi, L., Cannatelli, A., ... Pournaras, S. (2018). Characterization of Extensively Drug-Resistant or Pandrug-Resistant Sequence Type 147 and 101 OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Bloodstream Infections in Patients in an Intensive Care Unit. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(7).
2. Djordjevic, Z. M., Folic, M. M. & Jankovic, S. M. (2017). Distribution and antibiotic susceptibility of pathogens isolated from adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. *J. Infect. Public Health*, 10(6), 740–744.
3. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017 (2019). Stockholm: ECDC. URL: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER_for_2017-HAI.pdf
4. Horan, T. C., Andrus, M. & Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control*, 36(5), 309–332.
5. Hu, Y., Liu, C., Shen, Z., Zhou, H., Cao, J., Chen, S., ... Zhang, R. (2020). Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008–2018. *Emerging microbes & infections*, 9(1), 1771–1779.

6. Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.*, 8(3), 268–281.

7. Vincent, J. L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., ... Reinhart, K. (2009). International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 302(21), 2323–2329.

8. Yu, X., Zhang, W., Zhao, Z., Ye, C., Zhou, S., Wu, S., ... Ye, H. (2019). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates with focus on antimicrobial resistance. *BMC Genomics*, 20(1), 822.

V. GANIUK¹, V. KHIL¹, V. KONDRATIUK²,
A. FRANCISHKO¹, L. POLISHCHUK¹

¹–National Military Medical Clinical Center «Main Military Clinical Hospital», Kyiv, Ukraine

²–National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ukraine

Analysis of phenotypes and genetic determinants of the antibacterial resistance of *Klebsiella pneumoniae*, which causes infectious complications associated with the provision of medical care in the intensive care unit for surgical patients

Summary

Purpose of the work: to study the phenotype of antibiotic resistance and the genetic mechanisms that conditioning it among isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit (ICU).

Materials and methods: local microbiological monitoring was carried out in the ICU (for surgical patients) if the National Military Medical Clinical Center «Main Military Clinical Hospital» during 2014–2020. For the study of genetic material by the next-generation sequencing method, 5 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* were sent to the repository of multi-resistant microorganisms of the Military Research Institute Walter Reed, USA.

Results and discussion: the analysis included 631 results of microbiological research of clinical material from 88 patients, in whom 383 microorganisms were isolated. *Klebsiella pneumoniae* accounted for the largest share of 26.1% (100/383). *Klebsiella pneumoniae* appeared to be the dominant microorganism in blood culture – 24 isolates (26%). We found *Klebsiella pneumoniae* in 56 isolates urine cultures (21%) and 20 isolates (21%) in sputum, thus, making *Klebsiella pneumoniae* ranked second. The causative agents of *Klebsiella pneumoniae* have shown absolute resistance to aminopenicillins, third generation cephalosporins, protected cephalosporins, fluoroquinolones, gentamycin. Amikacin, phosphomycin, and the studied carbapenems were effective at around 30–40%. Tigecycline remained effective in more than 77% of the investigated isolates. The isolates were resistant to several classes of antibiotics at once. Genetic studies of 5 *Klebsiella pneumoniae* isolates have established the presence of 23 different resistance genes in their genome. Resistance to carbapenems was correlated

with the presence of blaOXA-48. The ESBL genes blaCTX-M-15 blaSHV, blaTEM were found in four out of five isolates. One strain contained both the blaNDM-1 metal beta-lactamase and rmtC 16S methyltransferase. The isolates were assigned to three different sequence types by MLST.

Conclusions: empiric antibiotic therapy regimens must necessarily include antibiotic combinations. The most effective is the combination of amikacin with carbapenems. The use of fosfomycin and tigecycline must be regulated to maintain the effectiveness of these drugs in the future.

Keywords: microbial, whole genome sequencing, phenotype, bacterial multiple drug resistance, nosocomial, *Klebsiella pneumoniae*.

**В. М. ГАНЮК¹, В. Ю. ХИЛЬ¹, В. М. КОНДРАТЮК²,
А. А. ФРАНЦИШКО¹, Л. М. ПОЛИЩУК¹**

¹ – Національний військово-медичинський клінічний центр
«Главный военный клинический госпиталь», г. Киев, Украина

² – Винницький національний медичинський університет ім. Н. І. Пирогова,
г. Винница, Украина

Анализ фенотипов и генетических детерминант антибактериальной резистентности *Klebsiella pneumoniae*, вызывающие инфекционные осложнения, связанные с оказанием медицинской помощи в отделении реанимации и интенсивной терапии для хирургических больных

Резюме

Цель работы: изучить фенотип устойчивости к антибиотикам и генетические механизмы, которые его обуславливают, среди изолятов *Klebsiella pneumoniae* отделения реанимации и интенсивной терапии.

Материалы и методы: локальный микробиологический мониторинг проведения в ОРИТ (для хирургических больных) Национального военно-медицинского клинического центра «Главный военный клинический госпиталь» (НВМКЦ «ГВКГ») в течение 2014–2020 гг. Для исследования генетического материала методом секвенирования «нового поколения» (next-generation sequencing) 5 клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* направлены в репозиторий полирезистентных микроорганизмов Военного института исследований им. Уолтера Риды, США.

Результаты и их обсуждение. В анализ включены 631 результат микробиологического исследования клинического материала от 88 больных, у которых выделено 383 микроорганизма. *Klebsiella pneumoniae* составила наибольшую долю 26,1% (100/383). *Klebsiella pneumoniae* оказалась доминирующим микроорганизмом в гемокультуре – 24 изолята (26%). В посевах мочи – 56 изолятов (21%) и в мокроте – 20 изолятов (21%) *Klebsiella pneumoniae* заняли второе место. Возбудители *Klebsiella pneumoniae* обнаружили абсолютную устойчивость к аминопенициллинам, цефалоспорином третьего поколения, защищенным цефалоспорином, фторхинолонам, гентамицину. Эффективными на уровне около 30–

40% были амикацин, фосфомицин и исследованные карбапенемы. Тайгциклин сохранял эффективность в более чем 77% исследованных изолятов. Изоляты были устойчивыми сразу к нескольким классам антибиотиков. Генетические исследования 5-ти изолятов *Klebsiella pneumoniae* установили наличие в их геноме 23 различных генов резистентности. Устойчивость к карбапенемам коррелировала с наличием *blaOXA-48*. Гены *ESBL blaCTX-M-15 blaSHV, blaTEM* обнаружены в четырех из пяти изолятов. Один штамм содержал как металл-бета-лактамазу *blaNDM-1*, так и метилтрансферазу *rmtC 16S*. Методом *MLST* изоляты были отнесены к трем различным *sequence types*.

Выводы: схемы эмпирической антибактериальной терапии обязательно должны включать комбинации антибиотиков. Наиболее эффективной является сочетание амикацина с карбапенемами. Применение фосфомицина и тайгциклина должно регулироваться для сохранения эффективности этих препаратов на будущее.

Ключевые слова: бактерии, секвенирование целого генома, фенотип, множественная стойкость, устойчивость к антибиотикам, внутрибольничная инфекция, *Klebsiella pneumoniae*.

Стаття надійшла до редакції 25.03.2021.