

### **Streszczenie pracy doktorskiej mgr Dorota Ochońska**

**Temat pracy doktorskiej: „*Molecular epidemiology of clinical strains Klebsiella pneumoniae, population clonal structure, virulence and antibiotic resistance*”**

**(„*Epidemiologia molekularna szczepów klinicznych Klebsiella pneumoniae, struktura klonalna populacji, wirulencja i antybiotykooporność*”) – cykl publikacji**

**Promotor: prof. dr hab. Monika Brzychczy-Włoch**

**WSTĘP.** *Klebsiella pneumoniae* jest powszechnie występującym mikroorganizmem. Miejscami jej naturalnego bytowania są wody powierzchniowe, gleba, rośliny oraz ścieki. Pałeczki te wchodzą w skład mikrobiomu człowieka oraz zwierząt. W środowisku szpitalnym *K. pneumoniae* pozostaje wciąż jednym z najważniejszych patogenów alarmowych. Wielolekooporne oraz hiperwirulentne szczepy *K. pneumoniae* (hvKP) są przyczyną zakażeń szpitalnych. Drobnoustrój ten powoduje głównie zapalenia płuc, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, zakażenia septyczne oraz zakażenia dróg moczowych. powodujących zagrożające życiu zakażenia. Poza szpitalem na zakażenia najbardziej narażone są wcześniaki, noworodki, osoby w podeszłym wieku, chorzy z obniżoną odpornością i alkoholicy. Aktualnie jednym z najpoważniejszych zagrożeń dla zdrowia publicznego jest dynamiczne, globalne rozprzestrzenianie się *K. pneumoniae* wytwarzających karbapenemazy (CPE). Bezobjawowa kolonizacja szczepem CPE jest źródłem rozprzestrzeniania się pałeczek w populacjach pacjentów hospitalizowanych i poddawanych długotrwałej antybiotykoterapii, ponadto, wiąże się z wysokim ryzykiem (70%) rozwoju zakażenia o etiologii *K. pneumoniae* u tych chorych. Na oddziałach szpitalnych poza szczepami *K. pneumoniae* opornymi na karbapenemy (CRKP) ciągle zagrożenie powodują szczepy wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L. Konsekwencje kliniczne i epidemiologiczne zakażeń szczepami *K. pneumoniae* (CPE) oraz o fenotypie ES $\beta$ L sprawiają, że istnieje potrzeba stałego nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska narastającej lekooporności oraz szybkiego rozprzestrzeniania się tych szczepów.

**CEL.** Głównym celem pracy było przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki szpitalnych szczepów *K. pneumoniae* izolowanych z przypadków nosicielstwa/kolonizacji i/lub zakażeń objawowych wykrytych u chorych hospitalizowanych na wybranych oddziałach trzech szpitali specjalistycznych w Polsce. Cele szczegółowe pracy obejmowały: 1) fenotypową charakterystykę szczepów *K. pneumoniae* pod względem profili lekooporności z określeniem fenotypów oporności typu AmpC, ES $\beta$ L, KPC i OXA48, 2) detekcję genów oporności w badanych szczepach klinicznych *K. pneumoniae*, 3) analizę epidemiologiczną i określenie struktury klonalnej badanej populacji szczepów klinicznych *K. pneumoniae* z zastosowaniem analizy makrorestrykcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym

polu elektrycznym (REA-PFGE), a także określenie typów sekwencyjnych (STs) oraz kompleksów klonalnych (CCs) izolatów przy zastosowaniu metody MLST, 4) wykrywanie genów 4 kodujących wybrane czynniki wirulencji, w tym bakteryjne systemy pobierania żelaza (siderofory) takie jak: aerobaktyna (gen *iutA*), enterobaktyna (gen *entB*) oraz jersiniabaktyna (gen *ybtS*), ponadto, regulator syntezy polisacharydów otoczkowych (gen *rmpA*), białka adhezyjne fimbrii typu 1 (geny: *fimA*, *fimH*), białka adhezyjne fimbrii typu 3 (geny: *mrkA*, *mrkD*), białka adhezyjne fimbrii ECP (gen *ecpA*), serotyp otoczkowy K1 i fenotyp mukoidalny (gen *magA*), serotyp otoczkowy K2 (gen *K2*), system transportu żelaza i funkcje fosfotransferazy (gen *kfu*), a także metabolizm alantoiny (gen *allS*), 5) ocenę stopnia tworzenia biofilmu przez *K. pneumoniae* przy zastosowaniu metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym (CV) oraz obrazowanie biofilmu bakteryjnego utworzonego na powierzchni różnych biomateriałów na przykładzie polietylenu i polichlorku winylu wykorzystywanych do produkcji rurek tracheostomijnych za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM).

**MATERIAŁ I METODY.** Badaniem objęto 172 szczepy *K. pneumoniae* zebrane w latach 2016-2019 od pacjentów hospitalizowanych w trzech szpitalach zlokalizowanych na terenie Polski Południowej to jest: Krakowskim Szpitalu Specjalistycznym imienia Jana Pawła II (n=139 pacjentów), 5 Wojskowym Szpitalu Klinicznym z Polikliniką Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej (SPZOZ) w Krakowie (n=18 pacjentów) oraz Górnośląskim Centrum Medycznym imienia profesora Leszka Gieca Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach (n=15 pacjentów). Badane izolaty pochodziły z różnych materiałów klinicznych, w tym zarówno z przypadków nosicielstwa/kolonizacji (wymazy z odbytu), jak i zakażeń objawowych. Materiał diagnostyczny stanowiły: krew, płwocina, aspirat tchawiczy, popłuczyny oskrzelowopęcherzykowe (BAL), płyn opłucnowy, wymaz z rurki tracheostomijnej, wymaz z rany oraz moc. Identyfikacja gatunkowa izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzona została za pomocą automatycznych systemów do identyfikacji bakterii, w tym między innymi VITEK® 2 Compact. Oznaczenia profili lekooporności badanych izolatów *K. pneumoniae* dla następujących grup antybiotyków: penicylin, cefalosporyn, karbapenemów, fluorochinolonów, aminoglikozydów oraz antybiotyków z innych grup, w tym: aztreonamu, fosfomycyny, kolistyny, nitrofurantoiny, tetracykliny, trimetoprimu z sulfametoksazolem (kotrimoksazolu) i tygecykliny dokonano zgodnie z rekomendacjami Europejskiego Komitetu do spraw Oznaczania Lekowrażliwości (EUCAST) wersja 9.0, 2019-01-01 przy zastosowaniu metod gradientowo-dyfuzyjnych z użyciem E-testów. Oznaczenia fenotypów oporności zrealizowano za pomocą testów

przesiewowych w kierunku wykrywania:  $\beta$ -laktamaz o rozszerzonym spektrum substratowym i/lub 5 warunkujących oporność na karbapenemy takich jak:  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L w teście dwóch krążków DDST,  $\beta$ -laktamazy typu AmpC w zmodyfikowanym teście dwóch krążków z cefepimem,  $\beta$ -laktamazy typu MBL w teście z 0,5M EDTA,  $\beta$ -laktamazy typu KPC w teście z kwasem boronowym (PBA) oraz  $\beta$ -laktamazy typu OXA-48 w teście z krążkiem z temocyliną. Wykrywanie genów oporności takich jak: *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub> dokonano przy zastosowaniu metody PCR oraz multipleks PCR (mPCR). Typowanie molekularne badanych izolatów *K. pneumoniae* przeprowadzono przy zastosowaniu metody REAPFGE opartej na analizie makrorestrikcyjnej chromosomalnego DNA połączonej z elektroforezą w zmiennym polu elektrycznym oraz metody analizy wielu loci - MLST opartej na sekwencjonowaniu genów metabolizmu podstawowego w tym *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* oraz *tonB*. Detekcji genów kodujących wybrane czynniki wirulencji (*iutA*, *entB*, *ybtS*, *rmpA*, *magA*, *K2*, *kfu*, *allS*) dokonano za pomocą reakcji mPCR. Występowanie genów kodujących adhezyny fimbrialne (*fimA*, *fimH*, *mrkA*, *mrkD*, *ecpA*) potwierdzono za pomocą reakcji PCR. Ocenę tworzenia biofilmu przez badane *K. pneumoniae* dokonano z użyciem metody kolorymetrycznej z fioletem krystalicznym (CV). Obserwacje biofilmu *K. pneumoniae* na powierzchni rurek tracheostomijnych polietylenowych (PE) oraz wykonanych z polichlorku winylu (PVC) zrealizowano na podstawie obrazowania w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM).

**WYNIKI.** W utworzonej kolekcji 172 szczepów klinicznych *K. pneumoniae* zidentyfikowano 142 izolaty (82,6%) wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L oraz 15 (8,7%) izolatów CRKP wytwarzających karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48. Wszystkie izolaty o fenotypie oporności typu ES $\beta$ L zostały sklasyfikowane jako wielolekooporne i reprezentowały fenotyp MDR, 6 izolatów CRKP (3,5%) charakteryzował fenotyp XDR. Wśród szczepów prezentujących fenotyp ES $\beta$ L dominującym był gen *bla*<sub>SHV</sub> wykryty w 117 izolatach (82,4%), w dalszej kolejności gen *bla*<sub>CTX-M-type</sub> wykryty w 115 izolatach (81%), gen *bla*<sub>TEM</sub> w 111 izolatach (78,2%), *bla*<sub>CTX-M-9</sub> w 109 izolatach (76,8%) oraz gen *bla*<sub>CTX-M-1</sub> w 5 izolatach (3,5%). Dla wszystkich badanych izolatów CRKP potwierdzono obecność genów: *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub>. Na podstawie uzyskanych wyników typowania molekularnego w badanej populacji szczepów o fenotypie oporności typu ES $\beta$ L zidentyfikowano 4 główne klonalności (A-D), wskaźnik zróżnicowania klonalnego badanych izolatów *K. pneumoniae* został określony na poziomie  $\geq 98\%$ . Ponadto, w toku przeprowadzonego genotypowania wykazano, że wszystkie badane izolaty CRKP prezentowały jeden typ REA-PFGE 6 oznaczony jako klon A, dodatkowo za pomocą metody

MLST przyporządkowano je do typu sekwencyjnego ST147 i kompleksu klonalnego CC147. Z kolei analiza REA-PFGE, przeprowadzona wśród izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z wydzielin tchawiczych z rurek tracheostomijnych użytkowanych przez pacjentów po przebytych zabiegu tracheotomii wykazała większe zróżnicowanie genetyczne i przynależność szczepów do szesnastu unikatowych profili restrykcyjnych (A-P). W badanej puli szczepów *K. pneumoniae* o fenotypie oporności ES $\beta$ L najczęstszymi genami kodującymi wybrane czynniki wirulencji były: *entB* (91,4%), *ybtS* (55,4%), *iutA* (55,4%), *magA* (53,2%), *kfu* (14,4%), *K2* (11,5%), *mrkD* (10,1%), *rmpA* (7,9%) i *allS* (5%). Wykryto 39 kombinacji genów kodujących badane czynniki wirulencji z wyraźną dominacją zestawienia genów *ybtS+entB+iutA* zidentyfikowana w 23 (16,5%) izolatach. Zaobserwowano duży zakres zmienności udziału genów kodujących struktury białkowe fimbrii typu 1, fimbrii typu 3 oraz fimbrii ECP. Blisko połowa (44,4%) izolatów *K. pneumoniae* pochodzących z rurek tracheostomijnych pozyskanych od pacjentów poddanych zabiegowi tracheotomii tworzyło biofilm w badaniach *in vitro*. Zdolność do tworzenia biofilmu potwierdzono w obrazowaniu SEM.

**WNIOSKI.** Wśród przebadanych szczepów klinicznych *K. pneumoniae* wykryto izolaty wytwarzające  $\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L w tym CTX-M-type, CTX-M-1, CTX-M-9, CTXM-15, SHV i TEM oraz karbapenemazy typu KPC-2, VIM-1 i OXA-48 co wskazuje, że identyfikacja fenotypów oporności na antybiotyki ma kluczowe znaczenie dla monitorowania ich w populacjach pacjentów hospitalizowanych oraz stanowi istotny element kontroli i profilaktyki zakażeń patogenami alarmowymi. Określenie częstości występowania w badanych izolatach *K. pneumoniae* genów oporności, w tym genów kodujących  $\beta$ -laktamazy typu: ES $\beta$ L (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>), CTX-M (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>) oraz genów kodujących karbapenemazy typu: MBL (*bla*<sub>VIM-1</sub>), KPC (*bla*<sub>KPC-2</sub>) i OXA-48 (*bla*<sub>OXA-48</sub>), dostarcza istotnych informacji o molekularnych uwarunkowaniach tych mechanizmów oraz przyczynia się do nadzoru i monitorowania obserwowanego zjawiska narastającej lekooporności. Oznaczenie w badanej populacji izolatów *K. pneumoniae* typu sekwencyjnego ST147, charakteryzującego się wielolekoopornością i wysoką wirulencją potwierdza jego występowanie w Polsce oraz globalny zasięg. Ocena pokrewieństwa badanych szczepów *K. pneumoniae*, przeprowadzona techniką analizy restrykcyjnej chromosomalnego DNA połączoną z elektroforezą pulsową (REA-PFGE), wykazała występowanie lokalnych klonów, które utrzymywały się w populacji pacjentów oraz w środowisku szpitalnym w badanym okresie. Wykazano duże zróżnicowanie genów kodujących wybrane czynniki wirulencji, wśród izolatów *K. pneumoniae* wytwarzających

$\beta$ -laktamazy typu ES $\beta$ L, przy czym w najwyższym odsetku szczepów wykryto geny kodujące siderofory, w tym enterobaktynę (*entB*) - 91,4%, jersiniabaktynę (*ybtS*) - 55,4%, aerobaktynę (*iutA*) - 55,4% oraz otoczkowy serotyp K1 (*magA*) - 53,2%. Analiza współwystępowania genów oporności oraz genów kodujących czynniki wirulencji wykazała słabą korelację pomiędzy współwystępowaniem badanych czynników, co wskazuje na odmienny mechanizm rozprzestrzeniania się tych genów w populacji *K. pneumoniae*. W badaniach *in vitro* potwierdzono zdolność szczepów klinicznych *K. pneumoniae* izolowanych od pacjentów po przebyciu zabiegu tracheotomii do tworzenia struktur biofilmu na rurkach tracheotomijnych użytkowanych przez tych pacjentów, co wskazuje na fakt, iż szczepy te mogą nieść ryzyko zakażeń związanych z jego wytworzeniem.

## SUMMARY

**INTRODUCTION:** *Klebsiella pneumoniae* is a common microorganism. This bacterium is found in the hospital and community environment. The places of its natural existence are surface waters, sewage, soil and plants. These rods are part of the microbiome of humans and animals. *K. pneumoniae* remains one of the most important alarm pathogens causing life-threatening infections, especially in young children, the elderly and immunocompromised patients. Multidrug-resistant and hypervirulent strains of *K. pneumoniae* (hvKP) are the cause of nosocomial infections developing in hospitalized patients. This pathogen mainly causes pneumonia, meningitis, septic infections and urinary tract infections. Currently, one of the most serious threats to public health is the dynamic, global spread of this species of intestinal bacteria that produce carbapenemases (so-called CPE strains). Carriage/colonization of these microorganisms in the gastrointestinal tract is the source of the spread of CPE strains in the populations of hospitalized patients. In hospital wards, in addition to carbapenem-resistant strains of *K. pneumoniae* (CRKP) strains producing ES $\beta$ L  $\beta$ -lactamases are a constant threat. The clinical and epidemiological consequences of infections with strains with the ES $\beta$ L phenotype and CPE strains, including *K. pneumoniae* isolates, make it necessary to constantly monitor and supervise this phenomenon.

**AIM:** The main objective of the study was to perform a detailed characterization of hospital *K. pneumoniae* strains isolated from cases of carrier/colonization and/or symptomatic infections detected in patients hospitalized in selected wards of three specialist hospitals in Poland. The specific objectives of the study included: 1) phenotypic characterization of *K. pneumoniae* strains in terms of drug resistance profiles, including determination of resistance phenotypes such as AmpC, ES $\beta$ L, KPC, OXA-48; 2) detection of resistance genes in the tested clinical strains of *K. pneumoniae*; 3) epidemiological analysis and determination of the clonal structure of the studied population of clinical strains of *K. pneumoniae* using macrorestriction analysis of chromosomal DNA combined with alternating electric field electrophoresis (REA-PFGE), as well as determination of sequence types (STs) and clonal complexes (CCs) of isolates at using the MLST method; 4) detection of genes encoding selected virulence factors, including bacterial iron uptake systems (siderophores) such as aeroactin (gene *iutA*), enterobactin (gene *entB*) and yersinobactin (gene *ybtS*), also a regulator of capsular polysaccharide synthesis (gene *rmpA*), fimbrial adhesion proteins type 1 (genes: *fimA*, *fimH*), fimbrial adhesion proteins type 3 (genes: *mrkA*, *mrkD*), fimbrial adhesion proteins ECP (gene *ecpA*), envelope serotype K1 and mucoid phenotype (gene *magA*), envelope serotype K2 (gene: *K2*), iron transport system and phosphotransferase functions (gene *kfu*) and allantoin metabolism (gene *allS*); 5)

assessment of the degree of biofilm formation by *K. pneumoniae* using the crystal violet (CV) colorimetric method and imaging of the bacterial biofilm formed on the surface of various biomaterials used for the production of tracheostomy tubes using scanning electron microscopy (SEM).

**MATERIALS AND METHODS:** The study covered 172 strains of *K. pneumoniae* collected in 2016-2019 from patients hospitalized in three hospitals located in Southern Poland, i.e.: John Paul II Specialist Hospital in Krakow (n=139 patients), 5th Military Clinical Hospital with a Polyclinic of the Independent Public (SPZOZ) in Krakow (n=18 patients) and the Upper Silesian Medical Center named after Professor Leszek Giec of the Medical University of Silesia in Katowice (n=15 patients). The tested isolates came from a variety of clinical materials, including both cases of carrier/colonization (rectal swabs) and symptomatic infections. The diagnostic material consisted of blood, sputum, tracheal aspirate, bronchoalveolar lavage (BAL), pleural fluid, tracheostomy tube swab, wound swab and urine. Species identification of *K. pneumoniae* isolates was carried out using automatic bacterial identification systems, including VITEK<sup>®</sup>2 Compact. The drug resistance profiles of the tested *K. pneumoniae* isolates for the following groups of antibiotics: penicillins, cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones, aminoglycosides and antibiotics from other groups, including aztreonam, fosfomicin, colistin, nitrofurantoin, tetracycline, trimethoprim with sulfamethoxazole and tigecycline, were performed in accordance with the recommendations of the European for Drug Susceptibility Testing (EUCAST) version 9.0, 2019-01-01 using gradient-diffusion methods using E-tests. Resistance phenotypes were determined by screening for: extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or carbapenem resistance, i.e. ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases in the DDST two-disc assay, AmpC-type  $\beta$ -lactamases in a modified cefepime two-disk test, MBL-type  $\beta$ -lactamases in the z-test 0.5M EDTA, KPC type  $\beta$ -lactamases in the boronic acid (PBA) test and OXA-48 type  $\beta$ -lactamases in the temocillin disc test. Detection of resistance genes including *bla*<sub>CTX-M-type</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub> i *bla*<sub>OXA-48</sub> was performed by PCR and multiplex PCR (mPCR). Molecular typing of the tested *K. pneumoniae* isolates was carried out using the REA-PFGE method based on macro-restriction analysis of chromosomal DNA combined with electrophoresis in an alternating electric field and the MLST method based on the sequencing of housekeeping genes including *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* and *tonB*. Detection of genes encoding selected virulence factors in siderophores: aerobactin (gene: *iutA*), enterobactin (gene: *entB*), yersinobactin (gene: *ybtS*); regulator of capsular polysaccharide synthesis (gene *rmpA*); K1 capsular serotype and mucoid phenotype (gene *magA*); capsular serotype K2 (gene *K2*); iron transport system 6 and phosphotransferase functions (gene *kfu*) and allantoin metabolism (gene *allS*) were performed by mPCR. The

detection of genes encoding fimbrial adhesins type 1 (genes: *fimA*, *fimH*), fimbrial adhesins type 3 (genes: *mrkA*, *mrkD*) and ECP fimbriae (gene *ecpA*) was performed by PCR. The assessment of biofilm formation by the tested *K. pneumoniae* was performed using the crystal violet (CV) colorimetric method. Observations of *K. pneumoniae* biofilm on the surface of polyethylene (PE) and polyvinyl chloride (PVC) tracheostomy tubes from patients were made on the basis of scanning electron microscopy (SEM) imaging.

**RESULTS:** In the created collection of 172 clinical strains of *K. pneumoniae*, 142 isolates (82.6%) producing  $\beta$ -lactamases of the type (ES $\beta$ L) and 15 (8.7%) isolates resistant to carbapenems (CRKP) producing carbapenemases of the type KPC-2, VIM-1 and OXA-48. All 142 isolates (82.6%) with the ES $\beta$ L resistance phenotype were classified as multidrug resistant and represented the MDR phenotype, six CRKP isolates (3.5%) were characterized by the XDR phenotype. Among the strains presenting the ES $\beta$ L phenotype, the *bla*<sub>SHV</sub> gene was dominant in 117 isolates (82.4%); followed by the *bla*<sub>CTX-M-type</sub> gene detected in 115 isolates (81%); *bla*<sub>TEM</sub> gene in 111 isolates (78.2%); *bla*<sub>CTX-M-9</sub> in 109 isolates (76.8%) and the *bla*<sub>CTX-M-1</sub> gene in 5 isolates (3.5%). The presence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>VIM-1</sub> genes was confirmed in all tested CRKP strains. Based on the results of molecular typing, 4 main clones (A-D) were identified in the studied population of strains with the ES $\beta$ L phenotype, and the clonal diversity index of the tested *K. pneumoniae* isolates was determined at the level of  $\geq 98\%$ . Moreover, in the course of genotyping, it was shown that all tested CRKP isolates presented one type of REA-PFGE marked as clone (A), additionally, using the MLST method, they were assigned to the ST147 sequence type and the CC147 clonal complex. On the other hand, the REA-PFGE analysis conducted among *K. pneumoniae* isolates obtained from tracheal secretions from tracheostomy tubes from patients with tracheostomy showed greater genetic diversity and strains belonging to sixteen unique restriction profiles (A-P). In the studied pool of *K. pneumoniae* strains with the ES $\beta$ L resistance phenotype, the most common genes encoding selected virulence factors were *entB* (91.4%); *ybtS* (55.4%); *iutA* (55.4%); *magA* (53.2%); *kfu* (14.4%); *K2* (11.5%); *mrkD* (10.1%); *rmpA* (7.9%) and *allS* (5%). Thirty-nine combinations of genes encoding the studied virulence factors were detected with a clear dominance of the *ybtS+entB+iutA* gene combination identified in 23 (16.5%) isolates. A large range of variability in the share of genes encoding protein structures of fimbriae type 1, fimbriae type 3 and ECP fimbriae was observed. Nearly half (44.4%) of *K. pneumoniae* isolates from tracheal secretions from tracheostomy tubes from patients undergoing tracheostomy formed a biofilm in *in vitro* studies.

**CONCLUSIONS:** Among the tested clinical strains of *K. pneumoniae*, isolates producing ES $\beta$ L  $\beta$ -lactamases of types CTX-M-type, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-15, SHV and TEM



(82.5% ) and KPC-2, VIM-1 and OXA-48 type carbapenemases (8.7%), which indicates that the identification of antibiotic resistance phenotypes is of key importance for monitoring them in hospitalized patient populations and is an important element in the control and prevention of infections with alert pathogens. Determination of the frequency of resistance genes, including genes encoding ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>), genes coding CTX-M-type  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M-type</sub>; *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>; *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>), genes encoding KPC-type carbapenemases (*bla*<sub>KPC-2</sub>), MBL-type carbapenemases (*bla*<sub>VIM-1</sub>) and OXA-48 type carbapenemases (*bla*<sub>OXA-48</sub>) provide important information about the molecular determinants of these mechanisms and contributes to the supervision and monitoring of the observed phenomenon of increasing drug resistance. The determination of *K. pneumoniae* isolates of the sequential type ST147 in the studied population, characterized by multidrug resistance and high virulence, confirms its presence in Poland and its global range. The relationship assessment of the tested strains of *K. pneumoniae*, performed using the technique of chromosomal DNA restriction analysis combined with pulsed electrophoresis (REA-PFGE), showed the presence of local clones that persisted in the patient population and in the hospital environment during the study period. A great diversity of genes encoding selected virulence factors was found among *K. pneumoniae* isolates producing ES $\beta$ L-type  $\beta$ -lactamases, with the highest percentage of strains showing genes encoding siderophores, including enterobactin (*entB*) - 91.4%, yersinobactin (*ybtS*) - 55.4%, aeroactin (*iutA*) - 55.4% and capsular serotype K1 (*magA*) - 53.2%. The analysis of the co-occurrence of resistance genes and genes encoding virulence factors showed a weak correlation between the co-occurrence of the studied factors, which indicates a different mechanism of the spread of these genes in the *K. pneumoniae* population. In vitro studies have confirmed the ability of clinical strains of *K. pneumoniae* isolated from patients with a tracheostomy to form biofilm structures, which indicates that these strains may carry the risk of infection in this group of patients associated with the formation of biofilm on the tracheostomy tubes in use.