

Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели

А.А.Самойлова¹, Л.А.Краева^{1,2}, И.В.Лихачев¹, Н.В.Михайлов^{1,3}, Д.Д.Светлов¹

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Минобороны России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Гипервирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (hvKp), в отличие от классических (сKp), способны вызывать инвазивные инфекции у здоровых взрослых людей. Опасность распространения hvKp, особенно в медицинских учреждениях, требует разработки методов дифференциации hvKp и сKp с помощью биомаркеров на модели животных *in vivo*.

Цель работы – доказать вирулентность штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели, оценить возможность прогнозирования вирулентности молекулярно-генетическими и фенотипическими методами.

Материалы и методы. Для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* использовали самок белых аутбредных мышей. Летальность, связанную с клебсиеллезной инфекцией, подтверждали выделением чистых культур из крови и паренхиматозных органов мышей. Значение LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева. Патоморфологические изменения органов оценивали у животных на гистологических срезах. Все данные подвергали статистическому анализу.

Результаты. По результатам эксперимента клинические штаммы *K. pneumoniae* были разделены на три группы: гипервирулентные (LD₅₀ ≤ 10² КОЕ/животное), вирулентные (LD₅₀ от 10³ до 10⁵ КОЕ/животное) и авирулентные (LD₅₀ ≥ 10⁶ КОЕ/животное). Гипервирулентные штаммы принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65. По результатам статистического анализа достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих капсульных типов и генов: K1 ($p = 0,0134$), K2 ($p = 0,0084$), K57 ($p = 0,0050$) и *iucA* ($p = 0,0042$), *iroB* ($p = 0,0002$). Достоверная связь между наличием фенотипического признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ($p = 0,0044$).

Заключение. Единичные признаки обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем совокупность признаков. Наибольшая чувствительность и специфичность была выявлена для совокупности признаков капсульных типов K1 и K2, типов последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и гена синтеза сидерофора сальмохелина *iroB* – 100 и 92,8% соответственно.

Ключевые слова: гипервирулентность, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, сKp

Для цитирования: Самойлова А.А., Краева Л.А., Лихачев И.В., Михайлов Н.В., Светлов Д.Д. Изучение гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae* на биологической модели. Бактериология. 2024; 9(2): 21–28. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-21-28

Evaluation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a biological model

A.A.Samoilova¹, L.A.Kraeva^{1,2}, I.V.Likhachev¹, N.V.Mikhailov^{1,3}, D.D.Svetlov¹

¹Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

²S.M.Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russian Federation;

³V.A.Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russian Federation

Hypervirulent strains of *Klebsiella pneumoniae* are capable of causing invasive infections in healthy adults. To date, no biomarkers have been identified that can accurately differentiate hypervirulent strains from classical ones. *In vivo* experiments are needed for a more complete understanding of infectious processes.

Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, доцент, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова» Минобороны России

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Статья поступила 13.11.2023, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Ludmila A. Kraeva, MD, PhD, DSc, associate Professor, Head of the laboratory of medical bacteriology, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Professor, Department of Microbiology, S.M.Kirov Military Medical Academy, Ministry of Defense

Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

The article was received 13.11.2023, accepted for publication 28.06.2024

The purpose of the work is to study the virulence of *K. pneumoniae* strains using a biological model, to evaluate the possibility of predicting virulence using molecular genetic and phenotypic methods.

Materials and methods. White outbred mice were used to assess the virulence of *K. pneumoniae* strains. The LD₅₀ value was calculated using the Kerber method modified by Ashmarin and Vorobiev. All data were subjected to statistical analysis.

Results. Clinical *K. pneumoniae* strains were divided into three groups: hypervirulent (LD₅₀ ≤ 10² CFU/animal), virulent (LD₅₀ 10³ to 10⁵ CFU/animal) and avirulent (LD₅₀ ≥ 10⁶ CFU/animal). Hypervirulent strains belonged to the capsule type K2, sequence types ST-86 and ST86-1LV, ST395, ST65. Significant relationship between the presence of the gene and the virulence of the strain was identified for the following capsular types K1 (*p* = 0.0134), K2 (*p* = 0.0084), K57 (*p* = 0.0050) and genes: *iucA* (*p* = 0.0042), *iroB* (*p* = 0.0002).

Conclusions. String test had high reliability (*p* = 0.0044), but the sensitivity and specificity are relatively low (87.5% and 64.3%, respectively). The highest sensitivity and specificity were revealed for a set of features of capsular types K1 and K2, siderophore yersiniabactin sequence types *ybt14*, *ybt16*, colibactin siderophore *clb3* sequence types and the siderophore salmochelin synthesis gene *iroB* – 100% and 92.8%, respectively.

Key words: hypervirulence, *Klebsiella pneumoniae*, hvKp, cKp

For citation: Samoilova A.A., Kraeva L.A., Likhachev I.V., Mikhailov N.V., Svetlov D.D. Evaluation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in a biological model. Bacteriology. 2024; 9(2): 21–28. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-21-28

Гипервирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) впервые были обнаружены в середине 1980-х гг. на Тайване [1]. Этот новый вариант гипервирулентных изолятов отличается от классических штаммов *K. pneumoniae* (сKp) способностью вызывать инвазивные инфекции даже у здоровых взрослых. Штаммы hvKp имеют тенденцию к образованию абсцессов печени и способны метастазировать из первичного очага инфекции в отдаленные органы, включая чаще всего глаза, легкие и центральную нервную систему [2–4]. Помимо абсцессов печени, hvKp также вызывает бактериемию, пневмонию и инфекции мягких тканей [5].

Генетические детерминанты гипервирулентности часто обнаруживаются на больших плазидах вирулентности, а также на хромосомных мобильных генетических элементах, которые можно использовать в качестве биомаркеров для отличия клинических изолятов hvKp от сKp [6–7]. В настоящее время не существует единой категоризации, охватывающей все штаммы hvKp. Клинические проявления, капсульное типирование, сиквенс-типирование, гипермукоидный фенотип и наличие генов, ассоциированных с вирулентностью, могут быть использованы для дифференциации штаммов hvKp и сKp [5, 8].

Гипервирулентность *K. pneumoniae* можно охарактеризовать как способность бактерий вызывать инвазивные инфекции (метастатическое распространение) как осложнение первичного очага инфекции у практически здоровых взрослых [8]. Инфекции, вызванные гипервирулентной формой *K. pneumoniae*, часто диагностируются на основании клинической картины, поскольку не существует универсально согласованного маркера гипервирулентности [2]. Большинство hvKp-штаммов фенотипически проявляет гипермукоидность, которая считается одним из основных маркеров hvKp-штаммов. Гипермукоидный фенотип часто определяют при помощи стринг-теста – тест является положительным, если нить длиной >5 мм тянется за бактериологической петлей от колонии бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде [9].

Понятия «гипермукоидный» и «гипервирулентный» часто используются в литературе как синонимы; однако не все гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* имеют гипермукоидный фенотип, и не все гипермукоидные изоляты приводят к инвазивному синдрому [8, 10].

Изначально штаммы hvKp были обнаружены в основном в Азии и лишь изредка были устойчивы к антимикробным препаратам (АМП). Однако недавние статьи указывают на их появление в новых географических регионах и распространение множественной лекарственной устойчивости среди гипервирулентных штаммов [11]. Появление изолятов *K. pneumoniae* с комбинированной гипервирулентностью и устойчивостью к резервным АМП, таким как карбапенемы, представляет серьезную опасность. При объединении устойчивости к АМП и вирулентности hvKp-штаммы могут вызывать инфекции, трудно поддающиеся лечению, у ранее здоровых взрослых. В случае если штаммы hvKp распространяются в медицинских учреждениях, вызывая инфекции у лиц с ослабленным иммунитетом, можно ожидать еще более высокую заболеваемость и смертность [11].

Несколько исследований *in vitro* охарактеризовали патогенность штаммов *K. pneumoniae* и описали лежащие в их основе молекулярные механизмы и их стратегии уклонения от иммунитета [12]. Разработка инновационных моделей *in vitro* многообещающа, но сложность физиологии хозяина (иммунитет, микробиота и динамика физико-химических условий) часто трудно воспроизвести в одной модели *in vitro* [13]. Эти данные часто необходимо дополнять экспериментами *in vivo*, чтобы лучше понять взаимодействие хозяина и патогена [14]. Хотя этические нормы, применяемые к моделям *in vivo*, требуют строгого контроля и ограничения их использования, они, тем не менее, необходимы для более полного понимания инфекционных процессов [14]. Наиболее часто используются модели млекопитающих из-за их надежности в имитации инфекций человека, связанных с *K. pneumoniae* [14].

Цель данной работы – изучить вирулентность штаммов *K. pneumoniae* на биологической модели и оценить возможность прогнозирования вирулентности доступными молекулярно-генетическими и фенотипическими методами.

Материалы и методы

Эксперимент на животных одобрен биоэтической комиссией НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. Все мыши содержались в стандартных условиях в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского союза по

защите животных, используемых в научных целях, от 22 сентября 2010 г.

На первом этапе исследования беспородным самкам мышей (19–24 г) ($n = 90$) внутрибрюшинно вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозе $1 \cdot 10^6$. Указанной дозой заражали трех мышей. Бактериальные суспензии готовили с использованием физиологического раствора из суточных культур. В работе исследовали 30 изолятов *K. pneumoniae*, отобранных по следующим параметрам: капсульный тип (K1, K2, K57, характерные для вирулентных штаммов), наличие положительного стринг-теста. Три изолята с индексом вирулентности 0 были выбраны в качестве контрольных.

За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения. Смертность, связанную с *K. pneumoniae*, подтверждали выделением чистых культур *K. pneumoniae* из крови и паренхиматозных органов мышей (печень, селезенка, легкие) и гистологическим исследованием пораженных органов.

Для определения среднелетальной дозы (LD_{50}) штаммов *K. pneumoniae* для мышей отобрали изоляты, которые вызвали гибель животных в дозе $1 \cdot 10^6$ КОЕ/животное. На втором этапе исследования самкам мышей ($n = 102$) вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозах $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения. LD_{50} рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина и Воробьева [15].

Патоморфологические изменения печени и селезенки оценивали у животных контрольной и опытной групп на гистологических срезах, окраска гематоксилин/эозин, увеличение $\times 40$, $\times 90$. Контрольная группа включала животных, зараженных авирулентным штаммом ($n = 3$), а опытная – вирулентными ($n = 3$).

Статистический анализ производили с помощью программного пакета Microsoft Excel. Изучали связь между признаками вирулентности, определенными молекулярно-генетическими и фенотипическими методами, и вирулентностью штаммов, определенной методом биологической пробы на мышах. Связь между наличием признака и вирулентностью штамма оценивали двумя статистическими критериями – точным тестом Фишера и рангово-бисериальным коэффициентом корреляции (с последующим вычислением критерия Стьюдента) – и считали достоверной при полученном критическом уровне значимости $p < 0,05$. Для рангово-бисериального коэффициента корреляции критический уровень значимости $p < 0,05$ при данном объеме выборки достигается в случае, если полученный критерий Стьюдента $t > 2,05$. Для расчета критерия Фишера исследуемые штаммы по результатам биологической пробы на мышах были разделены на 2 группы – вирулентные (включая гипервирулентные) и авирулентные. Для расчета рангово-бисериального коэффициента корреляции все штаммы были проранжированы в порядке возрастания вирулентности в соответствии с LD_{50} (более вирулентному штамму присваивался более высокий ранг). Таким образом, значение рангово-бисериального коэффициента корреляции зависело от степени вирулентности штамма.

С целью оценки возможности применения в качестве диагностического теста для прогнозирования вирулентности наиболее статистически значимые признаки (согласно зна-

чению рангово-бисериального коэффициента) были скомбинированы в группы. Внутри каждой группы признаки вирулентности были ранжированы по убыванию значения критического уровня значимости (признакам, имеющим большую статистическую значимость, присваивался более высокий ранг). Для каждого штамма вычисляли сумму рангов всех признаков, включенных в изучаемую комбинацию. Среднее арифметическое между минимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у вирулентных штаммов, и максимальным значением суммы рангов всех признаков, выявленным у авирулентных штаммов, было принято за дискриминатное (разделяющее штаммы на вирулентные и авирулентные). Если при расчете ранга выявлялись авирулентные штаммы, имеющие ранг равный или больший, чем самый низкий из вирулентных, их не включали в расчет дискриминатного значения. Это позволяло получить дискриминатное значение, обеспечивающее максимальную чувствительность теста. Специфичность теста при этом снижалась, но при выявлении вирулентных штаммов показатель чувствительности является более важным.

Чувствительность рассчитывали как долю штаммов, классифицированных как вирулентные по результатам исследования фенотипическими и/или молекулярно-генетическими методами, от штаммов, определенных как вирулентные по результатам биологической пробы. Специфичность рассчитывали как долю штаммов, классифицированных как авирулентные по результатам исследования фенотипическими и/или молекулярно-генетическими методами, от штаммов, определенных как авирулентные по результатам биологической пробы.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования мышей заражали дозой $1 \cdot 10^6$ КОЕ/животное. Если животные не погибали в течение периода наблюдения, штаммы считали авирулентными. В случае гибели мышей штаммы *K. pneumoniae* относили к категории вирулентных для мышей, и для них определяли LD_{50} на втором этапе эксперимента.

Из крови и паренхиматозных органов всех погибших мышей была высеяна культура *K. pneumoniae* в концентрации 10^6 – 10^7 КОЕ/мл. С целью дополнительного подтверждения причины летального исхода было выполнено патоморфологическое исследование. Для этого были изготовлены гистологические срезы из фрагментов печени и селезенки от животных контрольной и опытной групп.

У погибших животных на поверхности печени располагались обильные скопления фибрина, инфильтрированного полиморфноядерными лейкоцитами, среди которых были расположены скопления микробной флоры (рис. 1 Б1, Б3), в субкапсулярных отделах перенхимы печени имелись крупные фокусы некроза со скудной перифокальной инфильтрацией полиморфноядерными лейкоцитами (рис. 1 Б3, Б4), а также очаговая лимфогистиоцитарная с примесью полиморфноядерных гепатоцитов инфильтрация, расположенная среди групп погибших гепатоцитов, и скопления незрелых миелоидных клеточных элементов в синусоидах (рис. 1 Б2). У животных из контрольной группы патологических наложений на поверхности капсулы печени не

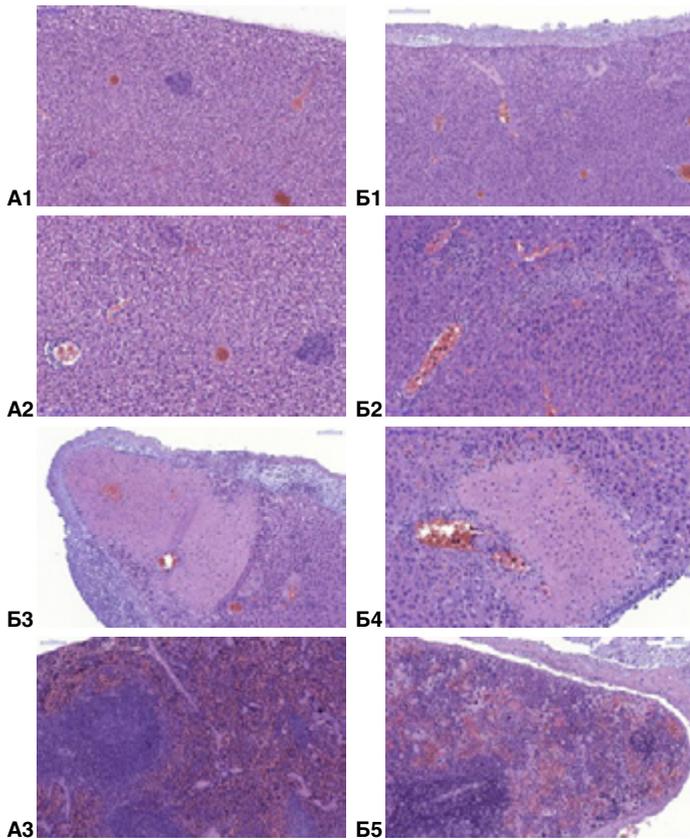


Рис. 1. Патологические изменения печени и селезенки у животного из контрольной (А) и опытной (Б) групп. Окрашивание гематоксилином и эозином, длина масштабного отрезка А1, А2, А3, Б2, Б3, Б4, Б5 – 100 мкм, Б1 – 200 мкм.

Fig. 1. Pathological changes in the liver and spleen in an animal from the control (A) and experimental (B) groups. Staining with hematoxylin and eosin, length of scale segment A1, A2, A3, B2, B3, B4, B5 – 100 μm, B1 – 200 μm.

было, имелись мелкие гистиоцитарные гранулемы в паренхиме печени и распространенная белковая дистрофия гепатоцитов (рис. 1 А1, А2).

Патологические изменения селезенки обнаруживались у животных из опытной группы в виде обильных фибриново-лейкоцитарных наложений на поверхности капсулы селезенки, выраженного полнокровия и миелоидной инфильтрации незрелыми миелоидными клеточными элементами красной пульпы, а также в виде неравномерного лимфоидного опустошения с сохранением немногочисленных мелких лимфоидных фолликулов без герминативных центров (рис. 1 Б5). Нормальное строение селезенки у животных из контрольной группы было сохранено (рис. 1 А3).

Таким образом, у животных опытной группы было установлено наличие фибринозно-гнояного перигепатита, крупноочаговых некрозов печени и очагового паренхиматозного гепатита, а также фибринозно-гнояного периспленита и реактивных изменений селезенки в виде миелоидной инфильтрации красной пульпы и лимфоидного опустошения. У животных из группы контроля были установлены белковая дистрофия гепатоцитов и очаговый гранулематозный гепатит.

На втором этапе исследования животным вводили по 0,1 мл бактериальной суспензии в дозах $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное и наблюдали в течение 14 дней после заражения.

Из крови и паренхиматозных органов всех погибших мышей была высеяна культура *K. pneumoniae*, что подтверждает смерть животного от исследуемого штамма.

Результаты расчета значений LD_{50} и характеристика исследованных в ходе эксперимента штаммов (капсульный тип и ST-тип, стринг-тест, диагноз и индекс вирулентности) представлены в таблице.

По результатам эксперимента клинические штаммы *K. pneumoniae* были разделены на 3 группы: гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ/животное), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ/животное) и авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ/животное).

Гипервирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 6$) принадлежали к капсульному типу K2, сиквенс-типам ST-86 и ST86-1LV, ST395, ST65 и были выде-

Таблица. Результаты определения значений LD_{50} и характеристика исследованных штаммов
Table. Results of determining LD_{50} values and characteristics of the studied strains

№	Штамм / Strain	К-тип / K-type	ST-тип / ST-type	Стринг-тест, мм / String test, mm	LD_{50}
1	172	K1	ST23	15	$0,22 \cdot 10^3$
2	64	K1	ST23	40	$0,46 \cdot 10^4$
3	844	K1	ST23	40	$0,22 \cdot 10^5$
4	894	K1	ST23	100	$0,22 \cdot 10^3$
5	880	K1	ST23	20	$1 \cdot 10^3$
6	184	K1	ST23	120	$0,46 \cdot 10^4$
7	138	K2	ST380	50	-
8	1	K2	ST65	17	$0,46 \cdot 10^2$
9	2399	K2	ST395	0	$1 \cdot 10^5$
10	480	K2	ST86	0	$1 \cdot 10^1$
11	933	K2	ST395	30	$0,46 \cdot 10^2$
12	396	K2	ST395	10	$1 \cdot 10^1$
13	847	K57	ST23	0	-
14	956	K57	ST23	0	-
15	958	K57	ST23	0	-
16	2943	K57	ST23	0	-
17	2946	K57	ST23	0	-
18	2947	K57	ST23	0	-
19	537	K2	ST86	10	$0,46 \cdot 10^4$
20	67	K2	ST86-1LV	55	$0,46 \cdot 10^2$
21	766	K2	ST86	15	$1 \cdot 10^3$
22	830	K2	ST86	55	$1 \cdot 10^1$
23	962	K24	ST20	50	-
24	60	K45	ST874	0	-
25	336	KL107	ST512	10	-
26	988	KL107	ST512	20	-
27	913	K2	ST395	50	$1 \cdot 10^5$
28	778	K24	ST11	0	-
29	146	K2	ST395	20	-
30	506	K62	ST556	0	-

«-» – штамм в максимальной дозе не вызывал гибель животных.
“-” – the strain at the maximum dose did not cause death in animals.

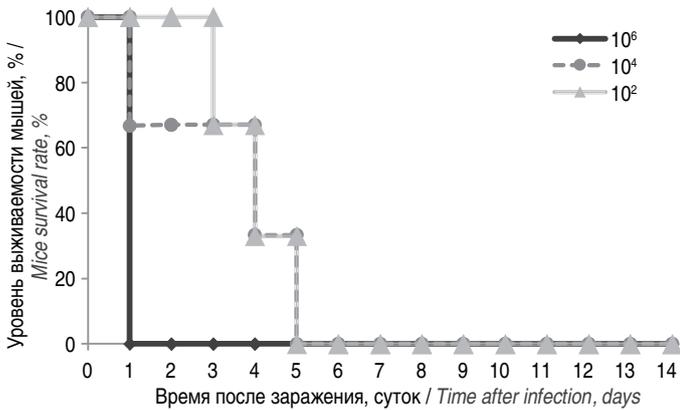


Рис. 2. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 480 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ КОЕ/животное).
 Fig. 2. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 480 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ CFU/animal).

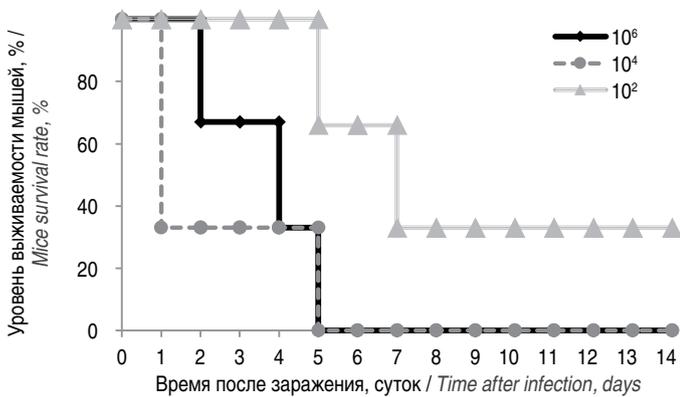


Рис. 3. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 67 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное).
 Fig. 3. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 67 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ CFU/animal).

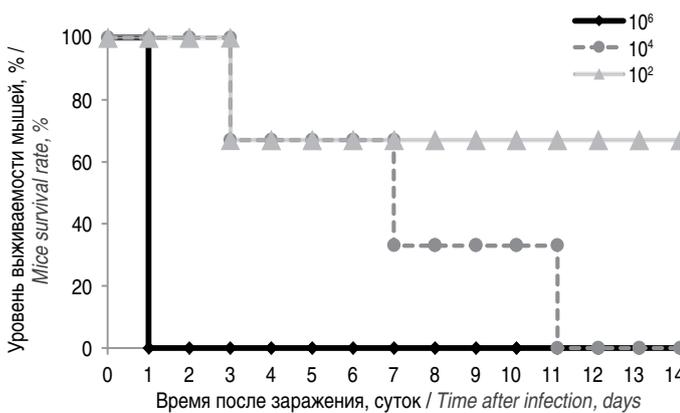


Рис. 4. Выживаемость мышей при заражении бактериями *K. pneumoniae* штамма 172 в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное ($LD_{50} 1 \cdot 10^3$ КОЕ/животное).
 Fig. 4. Survival of mice infected with *K. pneumoniae* strain 172 at doses of 10^6 , 10^4 , 10^2 CFU/animal ($LD_{50} 1 \cdot 10^3$ CFU/animal).

лены от пациентов с некротической раной культы, панкреатитом, флегмоной рубца ($LD_{50} 1 \cdot 10^1$ КОЕ/животное), а также флегмоной поясничной области, синовитом коленного сустава ($LD_{50} 1 \cdot 10^2$ КОЕ/животное). У 100% гипервирулентных

штаммов присутствовал ген аэробактина *iuc1*, гены регулятора мукоидного фенотипа *rmpA*, *rmpA2*, *wzyK2*, *peg-344*. Гены синтеза сидерофоров иерсиниабактина и сальмохелина были характерны для 67 и 33% гипервирулентных штаммов соответственно. Один штамм показал отрицательный результат стринг-теста.

Вирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 10$) принадлежали к капсульным типам K1 и K2, сиквенс-типам ST23, ST86, ST395 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: флегмоны различной локализации, перитонит, ишемическая болезнь сердца, пневмония, сепсис, синовит правого коленного сустава. Один штамм показал отрицательный результат стринг-теста.

Авирулентные штаммы (по результатам биопробы) *K. pneumoniae* ($n = 13$) принадлежали к капсульным типам K2, K24, K45, K57, K62, KL107, сиквенс-типам ST20, ST23, ST512, ST874 и были выделены от пациентов со следующими диагнозами: сепсис, трофическая язва стопы, флегмона левой голени, гангрена левого легкого, атеросклероз.

Выживаемость мышей при внутрибрюшинном заражении штаммами *K. pneumoniae* в дозах 10^6 , 10^4 , 10^2 КОЕ/животное показана на рис. 2–4.

По результатам статистического анализа на основании точного теста Фишера положительная достоверная связь между наличием гена и вирулентностью штамма была выявлена для следующих капсульных типов и генов: K1 ($p = 0,0134$), K2 ($p = 0,0084$), K57 ($p = 0,0050$); *iucA* ($p = 0,0042$), *iroB* ($p = 0,0002$). Положительная достоверная связь между наличием фенотипического признака и вирулентностью штамма была выявлена для стринг-теста ($p = 0,0044$). Чувствительность стринг-теста для исследуемой группы штаммов составила 87,5%, специфичность – 64,3%. Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей, определенных на основании полногеномного секвенирования, и вирулентностью штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности *ybt1* ($p = 0,0135$), *clb2* ($p = 0,0134$), *iro1* ($p = 0,0002$) и плазмид ICEKp3 ($p = 0,0050$), ICEKp10 ($p = 0,0273$).

Не было выявлено достоверной связи между наличием гена и вирулентностью штамма для следующих генов: *iutA* ($p = 0,2092$), *rmpA* ($p = 0,2125$), *rmpA2* ($p = 0,4666$), *peg-344* ($p = 0,2092$), *terB* ($p = 0,2092$), *peg-589* ($p = 0,0896$), а также плазмид ICEKp5 ($p = 0,5333$), ICEKp12 ($p = 0,0664$). Не было выявлено достоверной связи между наличием типов последовательностей, определенных на основании секвенирования, и вирулентностью штамма для следующих типов последовательностей различных локусов вирулентности: *irp2* ($p = 0,3112$), *ybt12* ($p = 0,4666$), *ybt14* ($p = 0,5333$), *ybt16* ($p = 0,0664$), *ybt17* ($p = 0,5333$), *clb1* ($p = 0,4666$), *clb3* ($p = 0,5333$), *iuc1* ($p = 0,1123$), *iuc2* ($p = 0,4666$), *iro2* ($p = 0,4666$).

По результатам статистического анализа на основании оценки рангово-бисериального коэффициента корреляции была определена связь между наличием признака и степенью вирулентности штамма (значением LD_{50}), оцененная с помощью *t*-критерия Стьюдента (*t*). Достоверная положительная связь была выявлена для капсульных типов K1

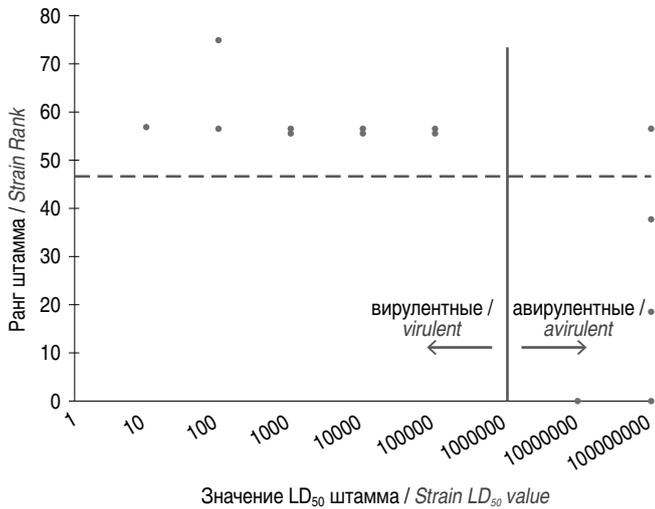


Рис. 5. Зависимость ранга штамма от степени вирулентности (по шести признакам).

На диаграмме точки обозначены штаммы: справа от сплошной линии ($LD_{50} = 1 \cdot 10^6$) – авирулентные, слева – вирулентные. Пунктирная линия, обозначающая дискриминантное значение (согласно значению рангово-бисериального коэффициента), отделяет вирулентные штаммы (сверху) от авирулентных (снизу). Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на вышеуказанных признаках, составила 100%, специфичность – 92,8%.

Fig. 5. Dependence of strain rank on the degree of virulence (based on six characteristics).

On the diagram, the dots indicate strains: to the right of the solid line ($LD_{50} = 1 \cdot 10^6$) are avirulent, to the left are virulent. The dotted line, indicating the discriminant value (according to the value of the rank-biserial coefficient), separates virulent strains (top) from avirulent strains (bottom). The sensitivity of a potential diagnostic test based on the above characteristics was 100%, specificity – 92.8%.

($t = 2,281$), K2 ($t = 2,281$), генов *iucA* ($t = 2,625$), *iutA* ($t = 3,685$), *iroB* ($t = 3,224$), *rmpA* ($t = 2,681$), *rmpA2* ($t = 3,500$), *peg-344* ($t = 3,685$), *terB* ($t = 3,685$), *peg-589* ($t = 3,893$) и плазмид ICEKp35 ($t = 13,500$), ICEKp12 ($t = 2,901$).

Положительная достоверная связь между наличием типов последовательностей и степенью вирулентности штамма была выявлена для типов последовательностей различных локусов вирулентности *ybt1* ($t = 2,281$), *ybt14* ($t = 13,500$), *ybt16* ($t = 2,901$), *ybt17* ($t = 5,556$), *clb2* ($t = 2,281$), *clb3* ($t = 5,556$), *iuc1* ($t = 3,088$), *iro1* ($t = 4,293$).

Для прогнозирования вирулентности штаммов на основе молекулярно-генетических признаков были рассмотрены капсульные типы K1 и K2. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2, составила 100%, специфичность – 85,7%.

С целью более точного прогнозирования вирулентности штаммов на основе молекулярно-генетических признаков были рассмотрены капсульные типы K1 и K2, типы последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, тип последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и ген синтеза сидерофора сальмокселина *iroB*. Зависимость ранга штамма от степени вирулентности представлена на точечной диаграмме на рис. 5.

Для оценки вирулентности штаммов *K. pneumoniae* биологическим методом используют экспериментальную инфекционную модель на белых аутбредных мышах. При

оценке изолятов на модели инфицирования мышей были выявлены три группы штаммов в зависимости от величины летальной дозы: гипервирулентные ($LD_{50} \leq 10^2$ КОЕ), вирулентные (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ) и авирулентные ($LD_{50} \geq 10^6$ КОЕ).

Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* наиболее часто относят к следующим сиквенс-типам: ST57, ST23 (ассоциированы с K1), ST380, ST375 и ST86 (ассоциированы с K2) [16]. В литературных источниках описаны также типы ST420, ST268, ST65, ST11, ST218, ST412 [17–21].

Сиквенс-тип *K. pneumoniae* ST395 не признан клоном высокого риска [22], однако в статье I.Lazareva et al. [23] изоляты ST395/K2, содержащие *rmpA*, *rmpA2*, *peg-344*, аэробактин, энтеробактин, иерсиниабактин, фимбрии типа I, проявляли максимальную вирулентность в анализе летальности у мышей ($LD_{50} = 10^2$ КОЕ/животное). По результатам проведенного нами исследования два изолята ST395/K2 относились к гипервирулентным, два – к вирулентным и один был авирулентным. Это можно объяснить отсутствием в геноме авирулентного штамма генов синтеза сидерофоров аэробактина (*iucA*) и иерсиниабактина (*ybt16*). Таким образом, штаммы *K. pneumoniae* типа ST395 могут являться гипервирулентными.

Изолят *K. pneumoniae* ST11/K24, сиквенс-тип которого обычно относят к гипервирулентным, по результатам нашего эксперимента не вызывал гибель животных, т.е. являлся авирулентным. В работе T.C.Wang et al. [24] по изучению вирулентности на мышах было показано, что все исследованные изоляты сиквенс-типа ST11 были не способны вызывать гибель мышей.

В исследовании J.Zhao et al. [24] анализ вирулентности изолятов *K. pneumoniae* на мышах показал следующий порядок возрастания средних значений LD_{50} : ST23 < ST86 < ST65 < другие ST (ST412, ST35, ST36, ST309 и ST1107). Авторы заключают, что различные типы ST можно использовать для прогнозирования уровня вирулентности у мышей. В работе A.I.Lev et al. [25] было показано, что два штамма клебсиелл ST23/K57 являлись авирулентными. По результатам нашего исследования все штаммы ST23/K57 ($n = 6$) были авирулентными, а изоляты ST23/K1 относились к вирулентным (LD_{50} от 10^3 до 10^5 КОЕ/животное). Таким образом, информация только о сиквенс-типе изолята является недостаточной для предсказания вирулентности на мышинной модели, необходимо также учитывать капсульный тип штамма.

В исследовании C-R.Lee et al. изоляты *K. pneumoniae* с фенотипом гипермукоидности, генами *rmpA* и кластера *iucABCD-iutA* при внутрибрюшинном введении мышам проявляли высокую вирулентность в отношении летальности мышей независимо от типа капсулы [26]. По результатам нашего исследования у 100% высоковирулентных штаммов присутствовал тип последовательности сидерофора аэробактина (*iuc1*) и гены регуляторов мукоидного фенотипа *rmpA*, *rmpA2*, а также гены *wzyK2* и *peg-344*. Однако большинство из этих признаков встречалось и у авирулентных штаммов: *iuc1* – у 71,4% штаммов, *peg-344* – у 85,7%, *rmpA* и *rmpA2* – у 78,5 и 92,9% штаммов соответственно. Таким образом, достоверно связан с вирулентностью только ген *wzyK2* ($p = 0,0084$).

Среди сидерофоров, секретируемых *K. pneumoniae*, аэробактин считается наиболее важным фактором вирулентности [27, 28], поскольку может вызывать тяжелую инфекцию, способствуя транспортировке микроорганизмов из кишечного тракта в различные ткани, а также их размножению [29]. По результатам нашего исследования только ген *iucA* аэробактина был достоверно связан с вирулентностью ($p = 0,0042$), в то время как ген *iutA* ($p = 0,2092$), типы последовательностей *iuc1* ($p = 0,1123$) и *iuc2* ($p = 0,4666$) не были достоверно связаны с вирулентностью.

Гипермукоидный фенотип был характерен для 83,3% штаммов *K. pneumoniae*, относящихся к гипервирулентным. Авирулентные штаммы в 35,7% случаев обладали гипермукоидным фенотипом. Следовательно, гипервирулентность не следует определять, основываясь только на результатах стринг-теста. Некоторые работы предполагают, что присутствие самих серотипов K1/K2, а не гиперкапсулы, отвечает за повышенную вирулентность, поскольку типичные штаммы K1/K2, продуцирующие капсулы, не менее вирулентны, чем продуцирующие гиперкапсулы K1/K2 штаммы [30]. Данные предположения согласуются с результатами нашего эксперимента: все гипервирулентные и вирулентные штаммы принадлежали к серотипам K2 или K1, но не для всех были характерны гиперкапсула и положительный стринг-тест.

Заключение

В результате работы были исследованы штаммы *K. pneumoniae* ($n = 30$). На основании биопробы на мышцах все штаммы были отнесены к трем группам: гипервирулентные ($n = 6$), вирулентные ($n = 10$) и авирулентные ($n = 14$). Вирулентность была подтверждена высевом исследуемого микроорганизма из паренхиматозных органов и крови погибших животных, а также по результатам патоморфологического исследования.

На основании статистической обработки данных молекулярно-генетического исследования штаммов было выявлено, что одиночные признаки обладают меньшей чувствительностью и специфичностью, чем совокупность признаков. Несмотря на то, что стринг-тест обладал высокой достоверностью ($p = 0,0044$), чувствительность и специфичность данного теста относительно невысокие (87,5 и 64,3% соответственно). Наибольшие чувствительность и специфичность были выявлены для совокупности признаков капсульных типов K1 и K2, типов последовательностей сидерофора иерсиниабактина *ybt14*, *ybt16*, типов последовательностей сидерофора колибактина *clb3* и гена синтеза сидерофора сальмохелина *iroB* – 100 и 92,8% соответственно. Чувствительность потенциального диагностического теста, основанного на определении капсульных типов K1 и K2, составила 100%, специфичность – 85,7%.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература / References

1. Fung CP, Chang FY, Lee SC, Hu BS, Kuo BI, Liu CY, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? Gut. 2002;50(3):420-4. DOI: 10.1136/gut.50.3.420
2. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y, et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012;31(6):981-9. DOI: 10.1007/s10096-011-1396-6
3. Kawai T. Hypermucoviscosity: an extremely sticky phenotype of *Klebsiella pneumoniae* associated with emerging destructive tissue abscess syndrome. Clin Infect Dis. 2006;42(10):1359-61. DOI: 10.1086/503429
4. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: Association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. J Intern Med. 2006;259(6):606-14. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2006.01641.x
5. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine. J Intern Med. 2020;287(3):283-300. DOI: 10.1111/joim.13007
6. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. Microb Genom. 2018 Sep;4(9):e000196. DOI: 10.1099/mgen.0.000196
7. Chen YT, Chang HY, Lai YC, Pan CC, Tsai SF, Peng HL. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. Gene. 2004;337:189-98. DOI: 10.1016/j.gene.2004.05.008
8. Catalan-Najera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? Virulence. 2017;8(7):1111-23. DOI: 10.1080/21505594.2017.1317412
9. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. Microbiology. 2006;152(Pt 2):555-66. DOI: 10.1099/mic.0.28285-0
10. Togawa A, Toh H, Onozawa K, Yoshimura M, Tokushige C, Shimono N, et al. Influence of the bacterial phenotypes on the clinical manifestations in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia patients: A retrospective cohort study. J Infect Chemother. 2015;21(7):531-7. DOI: 10.1016/j.jiac.2015.04.004
11. European Centre for Disease Prevention and Control. Emergence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST23 carrying carbapenemase genes in EU/EEA countries. ECDC, Stockholm. 2021.
12. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS, et al. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. Infect Immun. 2021;89(4):e00693-20. DOI: 10.1128/IAI.00693-20
13. Joseph L, Meërciecca T, Forestier C, Balestrino D, Miquel S. From *Klebsiella pneumoniae* Colonization to Dissemination: An Overview of Studies Implementing Murine Models. Microorganisms. 2021;9(6):1282. DOI: 10.3390/microorganisms9061282
14. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* Infection Biology: Living to Counteract Host Defences. FEMS Microbiol. Rev. 2019;43(2):123-44. DOI: 10.1093/femsre/fuy043
15. Ашмарин ИП, Воробьев АА. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Наука, 1962. / Ashmarin IP, Vorob'ev AA. Statistical methods in microbiological research. L.: Nauka Publ., 1962. (In Russian).

16. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. Virulence. 2013;4(2):107-18. DOI: 10.4161/viru.22718
17. Zhao J, Chen J, Zhao M, Qiu X, Chen X, Zhang W, et al. Multilocus Sequence Types and Virulence Determinants of Hypermucoviscosity-Positive *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Community-Acquired Infection Cases in Harbin, North China. Jpn J Infect Dis. 2016;69(5):357-60. DOI: 10.7883/yoken.JJID.2015.321
18. Du P, Zhang Y, Chen C. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis. 2018;18(1):23-24. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30625-4
19. Eger E, Heiden SE, Becker K, Rau A, Geisenhainer K, Idelevich EA, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 420 with a Chromosomally Inserted Virulence Plasmid. Int J Mol Sci. 2021;22(17):9196. DOI: 10.3390/ijms22179196.
20. Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2019;18(1):4. DOI: 10.1186/s12941-018-0302-9
21. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, et al. Molecular epidemiology of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. Iran J Microbiol. 2021;13(3):257-65. DOI: 10.18502/ijm.v13i3.6384
22. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-59. DOI: 10.1038/s41579-019-0315-1
23. Lazareva I, Ageevets V, Sopova J, Lebedeva M, Starkova P, Likholetova D, et al. The emergence of hypervirulent *bla_{NDM-1}*-positive *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395 in an oncology hospital. Infect Genet Evol. 2020 Nov;85:104527. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104527
24. Wang TC, Lin JC, Chang JC, Hiaso YW, Wang CH, Chiu SK, et al. Virulence among different types of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with multi-locus sequence type (MLST)-11, Serotype K1 or K2 strains. Gut Pathog. 2021;13(1):40. DOI: 10.1186/s13099-021-00439-z
25. Lev AI, Astashkin EI, Kislichkina AA, Solovieva EV, Kombarova TI, Korobova OV, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012–2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles. Path. Global Health. 2018;112(3):142-51. DOI: 10.1080/20477724.2018.1460949
26. Lee CR, Lee JH, Park KS, Jeon JH, Kim YB, Cha CJ, et al. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017;7:483. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00483
27. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2014;82(6):2356-67. DOI: 10.1128/IAI.01667-13
28. Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* *ex vivo* and *in vivo*. Infect Immun. 2015;83(8):3325-33. DOI: 10.1128/IAI.00430-15
29. Effah CY, Sun T, Liu S, Wu Y. *Klebsiella pneumoniae*: an increasing threat to public health. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2020;19(1):1. DOI: 10.1186/s12941-019-0343-8
30. Lin JC, Chang FY, Fung CP, Xu JZ, Cheng HP, Wang JJ, et al. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. Microbes Infect. 2004;6(13):1191-8. DOI: 10.1016/j.micinf.2004.06.003

Информация о соавторах:

Самойлова Анна Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Лихачев Иван Владимирович, младший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Михайлов Николай Венерович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», доцент кафедры микробиологии и вирусологии института медицинского образования ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А.Алмазова» Минздрава России

Светлов Даниил Дмитриевич, лаборант-исследователь лаборатории биопрепаратов ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Information about co-authors:

Anna A. Samoilova, Junior Researcher, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Ivan V. Likhachev, Junior Researcher, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

Nikolay V. Mikhailov, MD, PhD, senior researcher at the laboratory of biological products Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; associate professor, department of microbiology and virology, institute of medical education, V.A.Almazov National Medical Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Daniil D. Svetlov, laboratory assistant, laboratory of biological products, Pasteur Saint Petersburg Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology

НОВОСТИ НАУКИ**Пептиды, полученные на основе кунжутного белка перспективны в борьбе с *E. coli* и *S. aureus***

Точное обнаружение пептидов с антимикробными свойствами может быть ускорено с помощью вычислительного скрининга. В данном исследовании были исследованы и синтезированы два антимикробных пептида: AlaGly-Gly-Val-Pro-Arg и Ser-Thr-Ile-Arg, которые являются нетоксичными, стабильными и неаллергенными. Кроме того, пептиды были получены из семян кунжута, что дает большой потенциал для дальнейших исследований и разработок.

Эксперименты *in vitro* подтвердили антибактериальные свойства пептидов. На взаимодействие между пептидами кунжута и DHPS влияло несколько факторов, включая гидрофобные взаимодействия, водородные связи, силы взаимодействия притяжения заряда и силы Ван-дер-Ваальса. Использование AlaGly-Gly-Val-Pro-Arg или Ser-Thr-Ile-Arg приводило к подавлению как *E. coli*, так и *S. aureus*.

Zhu Z, Pan F, Wang O, Zhao L, Zhao L.

Antibacterial Effect of Sesame Protein-Derived Peptides against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: *In Silico* and *In Vitro* Analysis. *Nutrients*. 2024 Jan 4;16(1):175. DOI: 10.3390/nu16010175