

ШТАММОСПЕЦИФИЧНОСТЬ БАКТЕРИЙ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ ПАЦИЕНТОВ С ДИАГНОЗОМ ВНЕБОЛЬНИЧНАЯ ПНЕВМОНИЯ

Л. В. Катаева, О. Н. Колотова, Т. Ф. Степанова

ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, г. Тюмень

Представлены результаты кластерного и корреляционного анализа штаммов бактерий *K. pneumoniae*, изолированных из содержимого нижних дыхательных путей при внебольничной пневмонии от пациентов моноинфекционного госпиталя г. Тюмени.

Ключевые слова: внебольничная пневмония, протеинограммы, *K. pneumoniae*.

Пневмонии – группа различных по этиологии, патогенезу, морфологической характеристике острых инфекционных (преимущественно бактериальных) заболеваний, характеризующихся очаговым поражением респираторных отделов легких с обязательным наличием внутриальвеолярной экссудации. Перечень потенциальных возбудителей внебольничной пневмонии включает более 100 микроорганизмов (бактерии, вирусы, грибы, простейшие). Однако большинство случаев заболевания ассоциируется с относительно небольшим кругом патогенов, к которым относят *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, респираторные вирусы, энтеробактерии, *Staphylococcus aureus* и *Legionella pneumophila*. *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* выявляют преимущественно у лиц с хроническими сопутствующими заболеваниями, такими как сахарный диабет, хроническая сердечная недостаточность [1].

Представленные нами ранее результаты исследования структуры микробиоты содержимого нижних дыхательных путей при внебольничной пневмонии показали, что среди выделенных бактерий преобладают грамположительные кокки, преимущественно бактерии рода *Streptococcus*, относящиеся к сапрофитной микрофлоре слизистой верхних дыхательных путей. Из условно-патогенных стрептококков в 2,1 % случаев был изолирован *Streptococcus pneumoniae*. Среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* чаще идентифицировались бактерии *K. pneumoniae*, у пациентов с лабораторно подтвержденным диагнозом SARS-CoV-2 в 24,0% случаев, с неподтвержденным - 8,4% [2].

Цель. Изучение штаммоспецифичности бактерий *K. pneumoniae*, изолированных от пациентов моноинфекционного госпиталя с диагнозом внебольничная пневмония.

Материалы и методы. Проанализированы протеинограммы 14 штаммов бактерий *K. pneumoniae*, изолированных из содержимого нижних дыхательных путей 9 пациентов в возрасте от 66 до 93 лет, получающих лечение в моноинфекционном стационаре города Тюмени с 25 мая по 20 июля 2020 года (таблица 1). Отбор биоматериала осуществлялся в отделении реанимации. Состояние пациентов отмечено как тяжелое, у всех имеются сопутствующие заболевания (сахарный диабет, артериальная гипертензия, сердечная недостаточность). Все пациенты переведены в реанимационное отделение госпиталя в сроки с 1-х суток до 2-х недель от начала заболевания.

Таблица 1. Сроки поступления и пребывания пациентов в стационаре

| Пациент | Дата поступления | Дата перевода в отделение реанимации | Дата забора анализа | Наличие SARS-CoV-2 | Длительность пребывания в реанимации (сутки) | № штамма <i>K. pneumoniae</i> |
|---------|------------------|--------------------------------------|---------------------|--------------------|--|-------------------------------|
| 1 | 17.05.2020 | 22.05.2020 | 22.05.2020 | не обнаружено | 1 | 56 |
| | | | 27.05.2020 | | 5 | 81 |
| | | | 05.06.2020 | | 14 | 110 |
| 2 | 18.05.2020 | 19.05.2020 | 21.05.2020 | не обнаружено | 2 | 52 |
| | | | 05.06.2020 | | 17 | 109 |
| 3 | 25.05.2020 | 25.05.2020 | 25.05.2020 | обнаружено | 1 | 64 |
| | | | 27.05.2020 | | 2 | 80 |
| 4 | 01.06.2020 | 02.06.2020 | 02.06.2020 | не обнаружено | 1 | 99 |
| | | | 04.06.2020 | | 2 | 104 |
| 5 | 01.06.2020 | 01.06.2020 | 01.06.2020 | обнаружено | 1 | 95 |
| 6 | 01.06.2020 | 01.06.2020 | 01.06.2020 | обнаружено | 1 | 98 |
| 7 | 21.05.2020 | 05.06.2020 | 05.06.2020 | не обнаружено | 1 | 108 |
| 8 | 12.06.2020 | 16.06.2020 | 16.06.2020 | не обнаружено | 1 | 135 |
| 9 | 15.07.2020 | 15.07.2020 | 20.07.2020 | обнаружено | 5 | 216 |

Идентификация выделенных штаммов проведена методом масс-спектрометрии. Кластерный и корреляционный анализ осуществлен в программе Biotyper 3 MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Сравнительная характеристика дендрограмм и определение штаммоспецифичности выполнены с помощью протеомного анализа белковых спектров исследуемых штаммов.

Результаты исследования. В исследуемой группе пациентов с внебольничной пневмонией у четырех обнаружен возбудитель новой короновирусной инфекции SARS-CoV-2 (пациенты 3, 5, 6, 9).

Оценка белковых профилей всех исследованных штаммов бактерий *K. pneumoniae*, проведенная с помощью кластерного анализа, показала разделение их на 2 группы кластеров (рисунок 1). Визуализация результатов представлена в виде дендрограммы, где ось абсцисс — расстояние с баллами значений меры близости (расстояние Евклида) между спектральными профилями. В первую группу вошли белковые спектры штаммов изолированных от пациентов, поступивших в отделение реанимации в мае, во вторую группу - от пациентов, поступивших в июне.

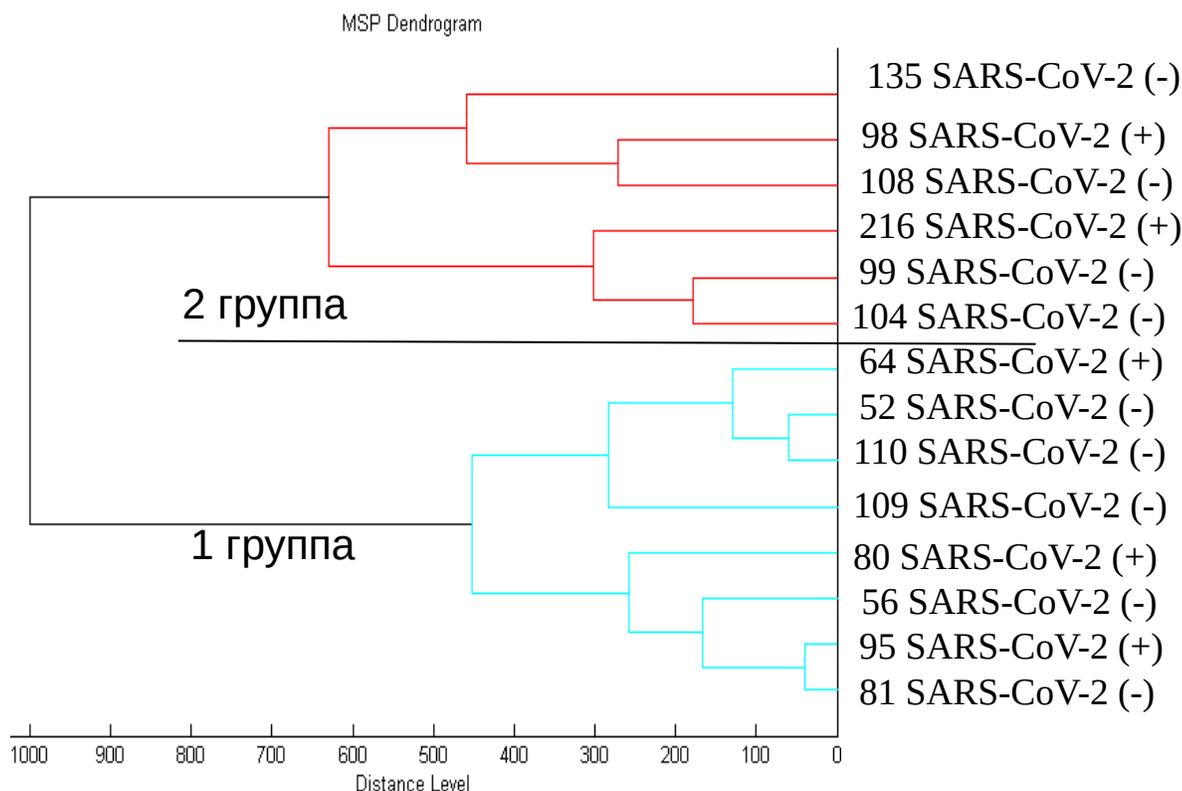


Рисунок 1. Дендрограмма штаммов бактерий *K. pneumoniae*, выделенных от пациентов моноинфекционного госпиталя.

Первая группа объединила пациентов 1, 2, 3, 5. У пациента 1 бактериологическое исследование биоматериала проводилось трехкратно. Во всех случаях штаммы *K. pneumoniae* изолированы в ассоциации с *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium striatum*, *Candida glabrata*. Отбор материала у пациентов 2 и 3 проводился двукратно. Штаммы *K. pneumoniae* изолированы в ассоциации с *A. baumannii*, *Enterococcus faecium* и *Candida albicans*. Выделенный штамм *K. pneumoniae* пациента 5 (отбор материала проведен однократно) находился в ассоциации с *Candida spp.* Штаммы *K. pneumoniae*, изолированные от пациентов 1, 2, 3, 5 характеризовались множественной резистентностью к антимикробным препаратам, вместе с тем выявлено, что штамм *K. pneumoniae* пациента 5 являлся продуцентом бета-лактамаз расширенного спектра.

Вторая группа кластеров включает в себя белковые спектры штаммов, изолированных от пациентов 4, 6, 7, 8, 9. Отбор биоматериала у пациента 4 проведен двукратно у остальных — однократно (при поступлении в отделение реанимации). Штамм *K. pneumoniae*, изолирован от пациента 4 в ассоциации с *A. baumannii* и *Candida spp.* У остальных пациентов второй группы ассоциации с *K. pneumoniae* составили *Proteus mirabilis*, *E. coli*, грибы рода *Candida*. Анализируемые штаммы, изолированные от пациентов этой группы обладали множественной резистентностью к антимикробным препаратам, кроме того, штамм *K. pneumoniae* пациента 8 продуцировал бета-лактамазы расширенного спектра. Исключение составил штамм *K. pneumoniae*, выделенный от пациента 9, который характеризовался чувствительностью к ципрофлоксацину, амикацину, карбопенемам.

Белковые спектры штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от пациента 1 в разные сроки пребывания в отделении реанимации (рисунок 2) не имеют различий по массе белков, что свидетельствует о его длительной циркуляции в содержимом нижних дыхательных путей, не смотря на проводимую антибиотикотерапию.

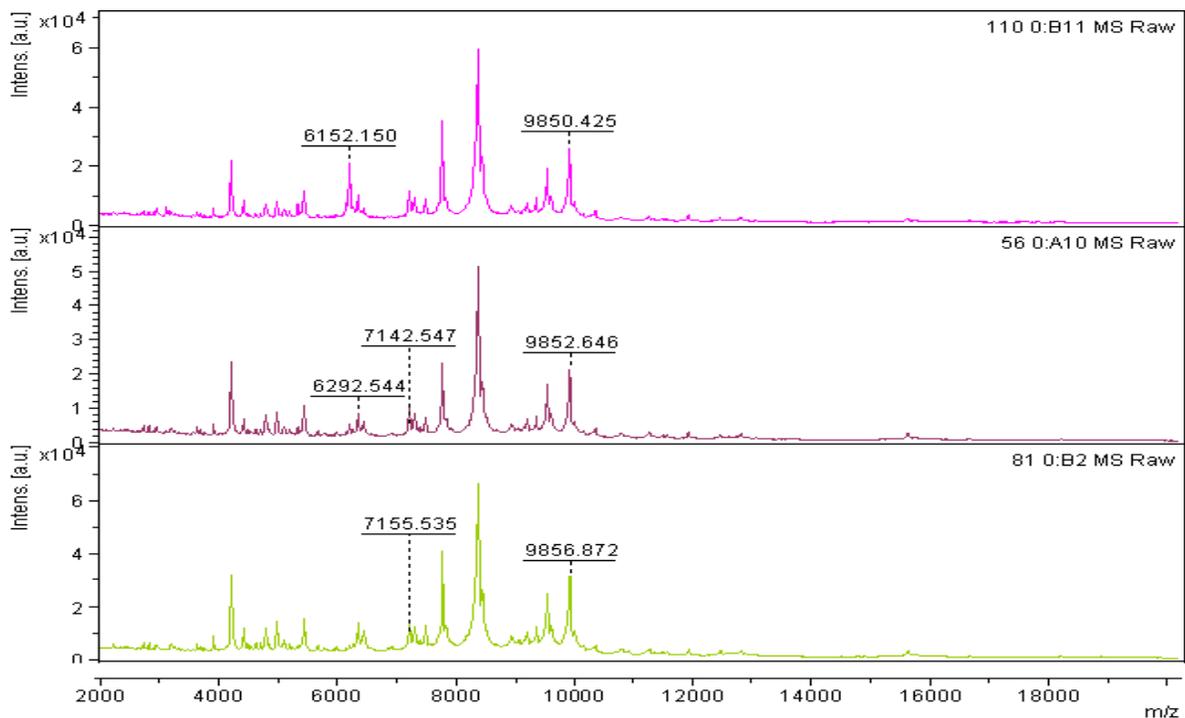


Рисунок 2. Белковые спектры штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от пациента 1.

При сравнении белковых спектров штаммов 109 и 110, изолированных от разных пациентов (1 и 2) с длительной антибактериальной терапией (14 и 17 суток), но в один день забора материала, различий протеинограмм не отмечено (рисунок 3). Коэффициент корреляции этих штаммов составил 0,94, что указывает на их высокое подобие.

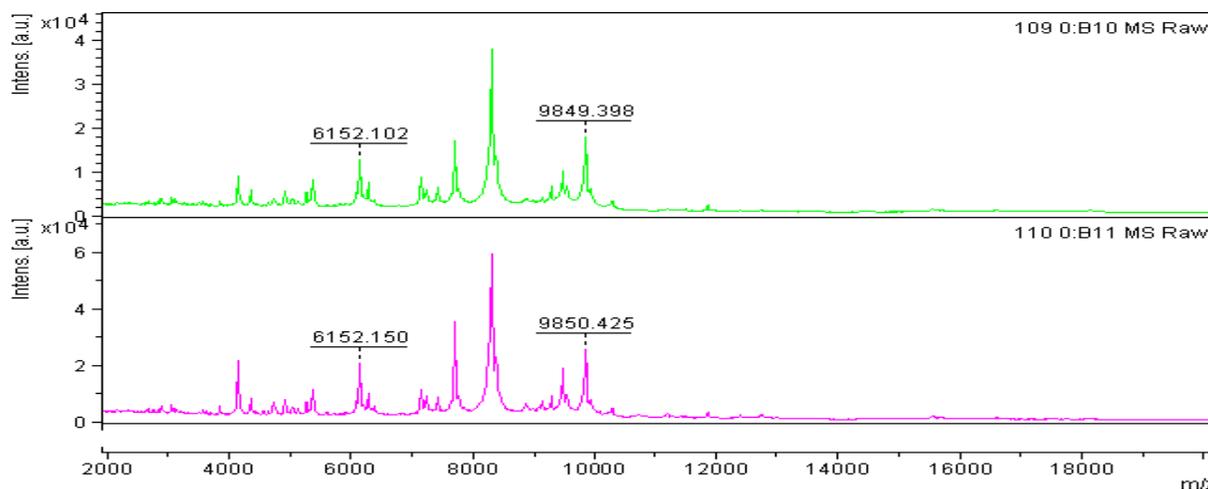


Рисунок 3. Белковые спектры штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от пациентов 1 и 2.

Таким образом, в группы объединились штаммы, изолированные от разных пациентов, с разным сроком пребывания их в стационаре, находящихся в разных отделениях в зависимости от наличия инфицирования SARS-CoV-2, незначительно отличающиеся по чувствительности к антимикробным препаратам.

Корреляционный анализ протеинограмм штаммов бактерий *K. pneumoniae* показал, что внутри 1 группы кластеров среднее значение коэффициента корреляции (r) между ними составил $0,93 \pm 0,01$, внутри 2 группы - $0,88 \pm 0,01$. Это свидетельствует о близком филогенетическом родстве исследуемых штаммов бактерий *K. pneumoniae*.

Сравнение протеинограмм штаммов (98, 216, 64, 80, 95), выделенных от пациентов, инфицированных новой короновирусной инфекцией, показало среднее значение коэффициента корреляции $0,79 \pm 0,1$. При этом спектр белков штамма 216 отличался от других спектров, указанных штаммов, коэффициент корреляции составил $0,71 \pm 0,1$. Возможно, это связано с отличиями его от анализируемых штаммов по чувствительности к антимикробным препаратам. Протеинограмма штамма 95, обладающего бета-лактамазами расширенного спектра, так же имеет отличия от белковых спектров штаммов с множественной резистентностью к антимикробным препаратам, коэффициентом корреляции - $0,74 \pm 0,01$.

Анализ корреляционной связи белковых спектров штаммов (135, 108, 99, 104, 52, 110, 109, 56), выделенных от пациентов с отрицательным результатом на SARS-CoV-2, показал наличие их близкородственной связи, коэффициент корреляции составил $0,88 \pm 0,01$.

Важно отметить особенности штамма *K. pneumoniae* 135, продуцирующего бета-лактамазы расширенного спектра. Протеинограмма данного штамма имеет высокую степень сходства с белковыми спектрами штаммов, обладающих множественной резистентностью к антимикробным препаратам и изолированных из биоматериала, отобранного для исследования в июне, коэффициент корреляции

составил $0,9 \pm 0,1$, а со штаммами 56, 81 выделенными из материала, взятого в исследование в мае - $0,69 \pm 0,1$.

Таким образом, кластерный анализ белковых спектров штаммов бактерий *K. pneumoniae*, изолированных из нижних дыхательных путей пациентов с диагнозом внебольничная пневмония, получавших лечение в отделении реанимации моно госпиталя, свидетельствует об их незначительных различиях. Распределение протеинограмм штаммов *K. pneumoniae* на две группы кластеров в зависимости от срока поступления в отделение реанимации, указывает на циркуляцию определенных штаммов в отделениях моноинфекционного госпиталя в установленный период. Проведенный анализ показал, что наличие инфицирования пациентов SARS-CoV-2 и ассоциаций с другими возбудителями бактериальных инфекций не влияют на белковую структуру штаммов бактерий *K. pneumoniae*. Изучение штаммоспецифичности бактерий методом кластерного анализа белковых профилей позволяет определять разнообразие штаммов, циркулирующих в содержимом нижних дыхательных путей пациентов и предусматривать противоэпидемические риски развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

Список литературы.

1. Катаева Л. В., Степанова Т. Ф., Степанова К. Б., Бакштановская И. В., Посоюзных О. В., Ташланова В. В., Карпухина Н. Ф., Колотова О. Н., Калашникова Ю. Н., Вакарина А. А. 2020. Микробиоценоз нижних дыхательных путей при пневмонии, ассоциированной с SARS-CoV-2. COVID19-preprints.microbe.ru. <https://doi.org/10.21055/preprints-3111755>.
2. Клинические рекомендации «Внебольничная пневмония». 2018.