

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ЗНАЧИМЫХ КАПСУЛЬНЫХ ТИПОВ

Р. Б. Городничев¹✉, М. А. Корниенко¹, Д. А. Беспятых¹, М. В. Малахова¹, А. О. Кривуля¹, В. А. Веселовский¹, Ю. А. Беспятых¹, О. В. Голощапов², Т. В. Черненко³, Е. А. Шитиков¹

¹ Федеральное научно-клиническое центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

В контексте растущей устойчивости к антибиотикам бактериофаги — альтернатива традиционной антимикробной терапии. Терапия бактериофагами — одна из таких альтернатив. Целью исследования были выделение и характеристика бактериофагов, эффективных против штаммов *Klebsiella pneumoniae* клинически значимых капсульных типов. Из проб сточных и речных вод методом накопительных культур было выделено восемь фагов. Определение спектра литической активности фагов проводили на коллекции клинических изолятов *K. pneumoniae* ($n = 279$). Бактериофаги лизировали 52,8–100% изолятов *K. pneumoniae* соответствующих капсульных типов: фаг VKV295 — 100% изолятов с капсульным типом KL1, SAA231 — 52,8% с KL2, NNK-G4 — 100% с KL39, VSG32 — 66,7% с KL41, NKA196 — 87,5% с KL47, Rappa3 — 87,5% с KL57, PEA128 — 95,5% с KL64 и ChM-G5 — 69,6% с KL102. Их геномы были секвенированы и проанализированы биоинформатически. Фаги принадлежали к семейству *Autographiviridae* и относились к трем родам. Литический спектр фагов был ограничен конкретными капсульными типами вследствие наличия специфических рецептор-связывающих белков — полисахариддеполимераз. Выделенные бактериофаги были строго вирулентными, не несли вредных генетических детерминант, что позволяет их применять в терапевтической практике для борьбы с антибиотикорезистентными инфекциями, вызванными *K. pneumoniae*.

Ключевые слова: вирулентные бактериофаги, *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, полисахарид-деполимеразы

Финансирование: исследование выполнено за счет средств, предоставленных для выполнения государственного задания «Разработка комплексной схемы терапии лекарственно-устойчивых возбудителей инфекционных заболеваний с применением бактериофагов или их производных в сочетании с антибактериальными препаратами» (шифр: Бактериофаг-2). Типирование штаммов *Klebsiella pneumoniae* выполнено за счет гранта Российского научного фонда №22-15-00149, <https://rscf.ru/project/22-15-00149/>.

Благодарности: результаты по полногеномному секвенированию получены с использованием научного оборудования ЦКП «Геномика, протеомика, метаболомика» (<http://rcpcm.org/?p=2806>).

Вклад авторов: Р. Б. Городничев — план исследований, набор и обработка данных, написание статьи; М. А. Корниенко — план исследований, набор и обработка данных; Д. А. Беспятых — обработка данных; М. В. Малахова, А. О. Кривуля — набор данных; В. А. Веселовский, О. В. Голощапов, Т. В. Черненко, Ю. А. Беспятых — набор и обработка данных; Е. А. Шитиков — план исследований, обработка данных, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к профилактике инфекционных болезней» СанПиН 3.3686-21; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий» СанПиН 2.1.3684-21, а также Федеральных клинических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике».

✉ **Для корреспонденции:** Роман Борисович Городничев
ул. Малая Пироговская, дом 1а, г. Москва, 119435, Россия; gorodnichev.r.b@gmail.com

Статья получена: 01.11.2023 **Статья принята к печати:** 14.12.2023 **Опубликована онлайн:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.060

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF VIRULENT BACTERIOPHAGES AGAINST *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* OF SIGNIFICANT CAPSULAR TYPES

Gorodnichev RB¹✉, Kornienko MA¹, Bespiatykh DA¹, Malakhova MV¹, Krivulia AO¹, Veselovsky VA¹, Bespiatykh YuA¹, Goloshchapov OV², Chernenkaya TV³, Shitikov EA¹

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³ Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

The growing proportion of antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains raises challenges to the healthcare system and requires the development of alternative treatment options. Bacteriophage therapy is one of such options. The study was aimed to isolate and describe bacteriophages effective against *K. pneumoniae* strains of clinically significant capsular types. The bacteriophages were isolated from the sewage and river water samples using the enrichment culture technique. The spectrum of lytic activity of the phages was tested on the collection of *K. pneumoniae* clinical isolates ($n = 279$). The studied bacteriophages lysed 52.8–100% of *K. pneumoniae* strains of respective capsular types: phage VKV295 lysed 100% of strains with the capsular type KL1, SAA231 — 52.8% of strains with KL2, NNK-G4 — 100% of strains with KL39, VSG32 — 66.7% of strains with KL41, NKA196 — 87.5% of strains with KL47, Rappa3 — 87.5% of strains with KL57, PEA128 — 95.5% of strains with KL64, and ChM-G5 — 69.6% of strains with KL102. Whole-genome sequencing and subsequent bioinformatic analysis revealed that the phages belong to the *Autographiviridae* family and are classified into three genera. The lytic spectrum of phages was limited to specific capsular types due to the presence of specific receptor-binding proteins, polysaccharide depolymerases. The isolated bacteriophages were strictly virulent, did not carry harmful genetic determinants, and had a specific host range, making them applicable in therapeutic practice for combating antibiotic-resistant infections caused by *K. pneumoniae*.

Keywords: virulent bacteriophages, *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, polysaccharide depolymerases

Funding: the study was conducted under the State Assignment “Development of a Complex Treatment Regimen for Drug-Resistant Pathogens Causing Infectious Diseases Using Bacteriophages and their Derivatives in Combination with Antimicrobial Drugs” (code: Bacteriophage-2). The *Klebsiella pneumoniae* strain typing was supported by the Russian Science Foundation grant (№ 22-15-00149, <https://rscf.ru/project/22-15-00149/>).

Acknowledgements: the whole-genome sequencing data were acquired using the equipment provided by the Core Facility Center “Genomics, Proteomics, Metabolomics” (<http://rcpcm.org/?p=2806>).

Author contribution: Gorodnichev RB — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Kornienko MA — study plan, data acquisition and processing; Bespiatykh DA — data processing; Malakhova MV, Krivulia AO — data acquisition; Veselovsky VA, Goloshchapov OV, Chernenkaya TV, Bespiatykh YuA — data acquisition and processing; Shitikov EA — study plan, data processing, manuscript writing.

Compliance with the ethical standards: experimental procedure was compliant with SanPIN 3.3686-21 “Sanitary Epidemiological Requirements for the Prevention of Infectious Diseases”; SanPIN 2.1.3684-21 “Sanitary and Epidemiological Requirements for the Maintenance of the Territories of Urban and Rural Settlements, for Water Bodies, Drinking Water and Drinking Water Supply, Atmospheric Air, Soils, Residential Premises, Operation of Industrial and Public Premises, Organization and Conduct of Sanitary and Anti-Epidemic (Preventive) Measures”, as well as Federal Clinical Guidelines “Rational Use of Bacteriophages in Clinical and Epidemiological Practice”.

✉ **Correspondence should be addressed:** Roman B. Gorodnichev
Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; gorodnichev.r.b@gmail.com

Received: 01.11.2023 **Accepted:** 14.12.2023 **Published online:** 31.12.2023

DOI: 10.47183/mes.2023.060

Klebsiella pneumoniae — граммотрицательная палочковидная бактерия, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*. Клебсиеллы становятся причиной многих инфекционных заболеваний человека. Наиболее известна пневмония (воспаление легких), однако *K. pneumoniae* также может вызывать инфекции мочевыводящей системы, крови, ран, а также сепсис [1]. Терапия антибиотиками остается основным методом профилактики и лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, хотя доля штаммов с множественной лекарственной устойчивостью может достигать 20–30% [2, 3]. Смертность от инфекции *K. pneumoniae* достигает 38%, а количество смертей, ассоциированных с устойчивостью к антибиотикам, составляет 650 тысяч человек ежегодно [4, 5].

Терапия бактериофагами считается простой, безопасной и высокоэффективной альтернативой антибиотикам [6]. Бактериофаги — самая многочисленная и распространенная группа вирусов; они использовались в качестве противомикробных препаратов с момента их открытия в начале XX в. Сегодня в персонализированной терапии успешно используют монофаги или коктейли из нескольких литических фагов [7–9]. Однако эффективность коммерческих фаговых коктейлей широкого спектра действия остается ограниченной [10].

Эффективность бактериофагов *K. pneumoniae* во многом определяется типом капсульного полисахарида бактерии хозяина [11]. Полисахаридная капсула *K. pneumoniae* — ключевой фактор вирулентности, обеспечивающий защиту бактерии от факторов внешней среды, в том числе иммунитета хозяина [12]. В настоящее время классическим серологическим методом и методом секвенирования отдельных генов генного кластера *crs* выделяют более 100 различных типов полисахаридных капсул, часть из которых (KL1, KL2, KL8, KL20, KL39, KL41, KL47, KL53, KL57, KL64, KL102 и KL107) ассоциирована с повышенной вирулентностью или устойчивостью к антибиотикам [13–17].

Бактериофаги *K. pneumoniae* адсорбируются на поверхность бактерии, растворяя полисахаридную капсулу специализированными ферментами — полисахарид-деполимеразы, локализованными, как правило, на фаговых фибриллах и шипах. Полисахарид-деполимеразы обладают ферментативной активностью в отношении конкретной связи между моносахарами в мономере полисахарида [11].

Цель исследования заключалась в выделении и описании вирулентных бактериофагов, способных лизировать штаммы *K. pneumoniae* клинически значимых капсульных типов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и их характеристика

Коллекция (N = 279) клинических изолятов *K. pneumoniae* была собрана в течение 2018–2022 гг.: 79 штаммов были получены из НИИ ДОГит имени Р. М. Горбачевой (Санкт-Петербург, Россия), 66 — из ГБУЗ «НИИ СП имени Н. В. Склифосовского ДЗМ» (Москва, Россия), 64 — из коллекции ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия), 58 — из Клинической больницы № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю. М. Лопухина ФМБА России (Одинцово, Россия), 12 изолятов были любезно предоставлены ФГБОУ ВО «ГКПМ-Оболensk» (Оболensk, Россия).

Для выращивания штаммов бактерий использовали лизогенный бульон (LB) (Himedia; Индия) при 37 °С. Видовую идентификацию бактерий проводили с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF [18]. Принадлежность штаммов *K. pneumoniae* к конкретному капсульному типу определяли путем секвенирования гена *wzi* [19].

Выделение и очистка бактериофагов

В качестве источников бактериофагов использовали сточные воды стационаров, откуда были высеяны штаммы *K. pneumoniae*, а также воды рек Лихоборка (г. Москва) и Клязьма (г. Королев).

Для устранения бактериальной составляющей пробу сточной или речной воды центрифугировали при 4000 g в течение 10 мин, супернатант фильтровали с помощью фильтров 0,22 мкм (Merk Millipore; США). Равные количества (15 мл) фильтрованной воды и бульона LB двойной концентрации объединяли и инокулировали 20 мкл ночной культуры потенциального бактериального штамма-хозяина. Эту смесь затем оставляли инкубироваться на шейкере при 37 °С в течение ночи. Полученную суспензию стерилизовали через фильтр с размером пор 0,22 мкм, а наличие бактериофагов в отфильтрованной жидкости подтверждали с помощью спот-тестирования [20]. Выделение и накопление чистой культуры бактериофага осуществляли путем трехкратного проведения через единичную негативную колонию.

В работе также использовали бактериофаг NER40, выделенный из воды реки Чермянка (г. Москва) и описанный в предыдущей работе [21].

Определение спектра литической активности

Спектр литической активности бактериофагов оценивали методом спот-тестирования [20]. Для этого 100 мкл культуры каждого штамма *K. pneumoniae* на логарифмической фазе роста ($OD_{600} = 0,3$) смешивали с 5 мл незастывшего полужидкого агара LB (0,7% агара) и распределяли по чашкам Петри с тонким слоем агара LB (1,5% агара). Тестирование включало нанесение 5 мкл лизатов монофагов с титром 10^6 БОЕ/мл на поверхность свежезасеянных газонов тестируемых штаммов *K. pneumoniae*. Затем чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение ночи. Литическую активность бактериофагов определяли по наличию зоны непрерывного лизиса бактериальных клеток, соответствующей форме исходной капли. Наличие полупрозрачной области вокруг зоны лизиса трактовали как полисахарид-деполимеразную активность.

Полногеномное секвенирование бактериофагов и биоинформатический анализ данных

Геномную ДНК фагов экстрагировали согласно протоколу фенол-хлороформной экстракции [22]. Секвенирование осуществляли с использованием инструмента MiSeq (Illumina; США) и реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500 cycle) (Illumina; США) в соответствии с рекомендациями производителя. Сборку генома проводили с помощью программы SPAdes (версия 3.14.0). Для идентификации открытых рамок считывания (ОРС) внутри генома использовали веб-сервис GeneMarkS (версия 4.32). Исследование генов tPHK проводили с использованием ARAGORN (версия 1.2.41).

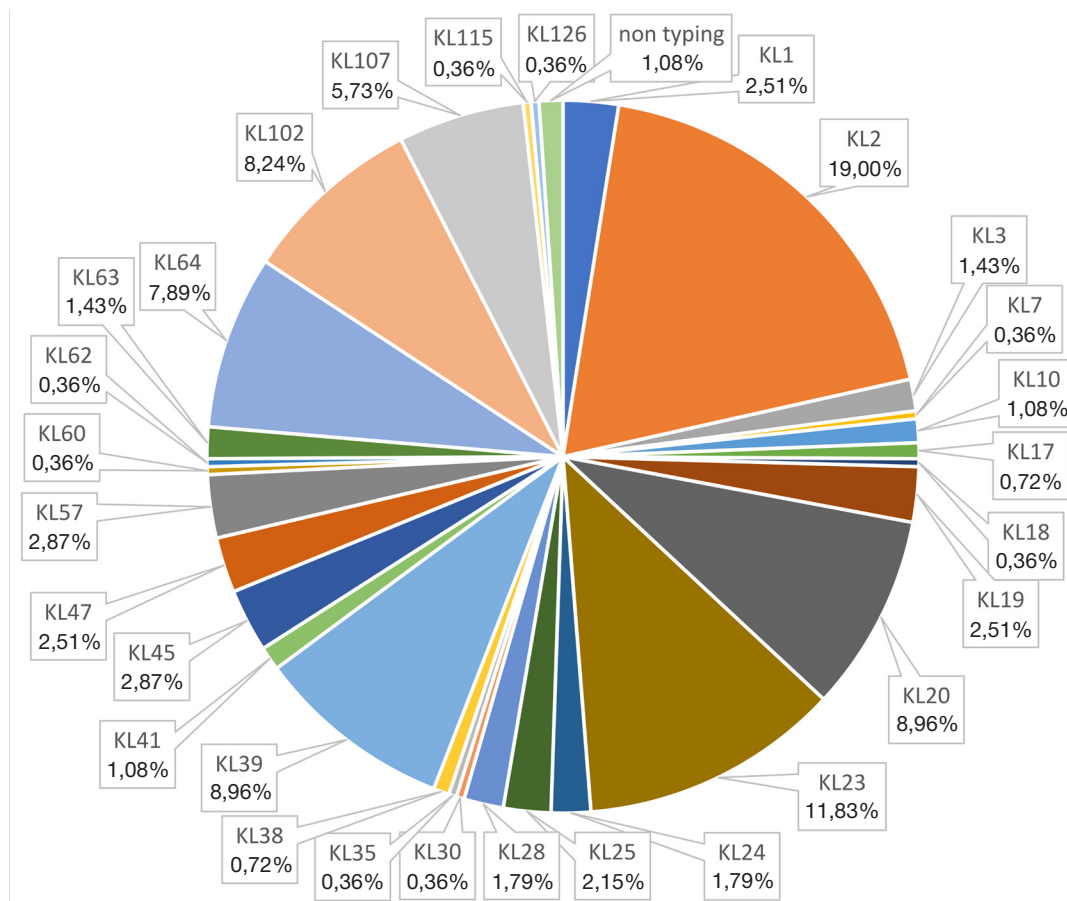


Рис. 1. Разнообразие капсульных типов коллекции *K. pneumoniae*

Гены были предсказаны и аннотированы вручную с использованием BLASTp, HHPred и InterPro. Для подтверждения отсутствия генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам проводили сравнение с базами данных, содержащими факторы вирулентности патогенных бактерий [23] и гены устойчивости к антибиотикам [24]. Аннотированные последовательности геномов бактериофагов были депонированы в базу GenBank.

Для филогенетического анализа использовали 40 эталонных геномов бактериофагов, предложенных Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV, от англ. International Committee on Taxonomy of Viruses). Филогенетические деревья были построены на основании полных геномов бактериофагов с использованием инструментов VICTOR [25]. Определение ближайших гомологов среди бактериофагов проводили с помощью алгоритма BLASTn. Сравнительный анализ отдельных белковых последовательностей осуществляли с помощью сервиса BLASTp. Сравнительный анализ полных геномов проводили с помощью инструментов Circoletto [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика штаммов *K. pneumoniae*

Для всех 279 штаммов коллекции была определена нуклеотидная последовательность гена *wzi*. Сравнительный анализ полученных последовательностей с последовательностями базы данных института Пастера позволил определить аллели, соответствующие отдельным капсульным типам. Всего было найдено 40 уникальных

аллельных вариантов гена *wzi*, 37 из которых были ассоциированы с конкретными капсульными типами, для трех вариантов (*wzi* 475, *wzi* 493 и *wzi* 163) ассоциации с известными капсульными типами найдено не было. Коллекция включала 29 различных капсульных типов, семь из которых составляли 70% всех изолятов: KL2 (19%), KL23 (12%), KL20 (9%), KL39 (9%), KL64 (8%), KL102 (8%) и KL107 (6%) (рис. 1). Другим капсульным типам, часто ассоциированным с высокой вирулентностью, соответствовали доли менее 5%: KL1 — 3%, KL41 — 1%, KL47 — 3%, KL57 — 3%.

Выделение, фенотипическая характеристика и спектр литической активности бактериофагов

Из трех образцов сточных вод и двух образцов речной воды было выделено восемь бактериофагов (VKV295, SAA231, NKA196, NNA-G4, VSG32, Rappa3, PEA128 и ChM-G5), лизирующих штаммы *K. pneumoniae* восьми клинически значимых капсульных типов (KL1, KL2, KL39, KL41, KL47, KL57, KL64 и KL102). Штаммы данных капсульных типов занимали в общей коллекции 53,05%.

Большинство бактериофагов формировали небольшие круглые прозрачные (1–2 мм) бляшки, окруженные ореолом в 1–2 мм. Отдельные бактериофаги (VKV295 и Rappa3) формировали круглые прозрачные бляшки большего размера (2–4 мм), также окруженные ореолом (рис. 2, табл. 1).

Бактериофаги показали высокую специфичность спектра литической активности — каждый из выделенных фагов был способен лизировать только штаммы с тем же капсульным типом, что и штамм, на котором бактериофаг

Таблица 1. Микробиологическая характеристика бактериофагов

Источник бактериофагов	Бактериофаг	Капсульная специфичность бактериофага	Число лизируемых штаммов конкретного капсульного типа	Морфология негативных колоний	Ореол, мм
				Бляшка, мм	
Сточные воды Клинической больницы № 123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Ю. М. Лопухина ФМБА России	VKV295	KL1	7/7	2	3
	NNA-G4	KL39	25/25	0,5–1	1
Сточные воды ГБУЗ «НИИ СП имени Н. В. Склифосовского ДЗМ»	Rappa3	KL57	7/8	4	3
	VSG32	KL41	2/3	1–2	1–3
Сточные воды НИИ ДОГИТ имени Р. М. Горбачевой	PEA128	KL64	21/22	1–2	1
	ChM-G5	KL102	16/23	1	1
р. Клязьма	SAA231	KL2	28/53	1	1
р. Лихоборка	NKA196	KL47	7/8	1–2	2–3
р. Чермянка	NER40 [21]	KL2	49/53	3–5	2–4

был выделен. Все исследуемые бактериофаги лизировали от 52,8 до 100% штаммов конкретных капсульных типов (табл. 1). Для сравнения в исследование также был включен ранее описанный бактериофаг NER40, специфично лизирующий штаммы с капсульным типом KL2 [21].

Полногеномное секвенирование бактериофагов и филогенетический анализ

Полные геномы фагов были собраны и депонированы в базу данных NCBI GenBank (табл. 2). Длина геномов варьировала от 39 058 до 44 575 п. н. с долей Г + Ц 50,4–54,3%. Все фаговые геномы имели терминальные повторы с обоих концов длиной 167–282 п.н. В составе фаговых геномов не было обнаружено генов тРНК, а количество предсказанных открытых рамок считывания (ОРС) для различных бактериофагов находилось в диапазоне от 42 до 53 (табл. 2).

В результате филогенетического анализа было установлено, что все исследуемые бактериофаги относятся к трем родам семейства *Autographiviridae* (рис. 3). Фаги VKV295, SAA231, NKA196 и NNA-G4 относились к роду *Drulivirus*, Rappa3 и PEA128 — к роду

Przondovirus, а VSG32 и ChM-G5 — к роду *Teetrevirus*. По результатам анализа BLASTn, ближайшими гомологами фагов *Drulivirus* были KpV2883 (GenBank MT682065.1; 90,53% идентичности) для фага VKV295, vB_KpnP_KpV74 (GenBank NC_047811.1; 88,12% идентичности) — для фага SAA231 и KPPK108.1 (GenBank OK583892.1; 90,56% и 85,03% идентичности) — для NNA-G4 и NKA196. Ближайшими гомологами фагов Rappa3 и PEA128 были фаги рода *Przondovirus* K5-2 (GenBank NC_047798.1; 81,32% идентичности) и 066037 (GenBank MW042800.1; 86,27% идентичности) соответственно. Гомологами фагов *Teetrevirus* VSG32 и ChM-G5 были *Salmonella phage phiSG-JL2* (GenBank NC_010807.1; 84,00% идентичности) и *Klebsiella phage 6998* (GenBank OL362282.1; 90,13% идентичности) соответственно (табл. 2).

Функциональная аннотация и сравнительный анализ геномов

Все исследуемые бактериофаги относились к семейству *Autographiviridae* и, как следствие, имели схожее строение генома: все гены располагались на лидирующей цепи ДНК, фаги кодировали как ДНК- так и РНК-полимеразу, а

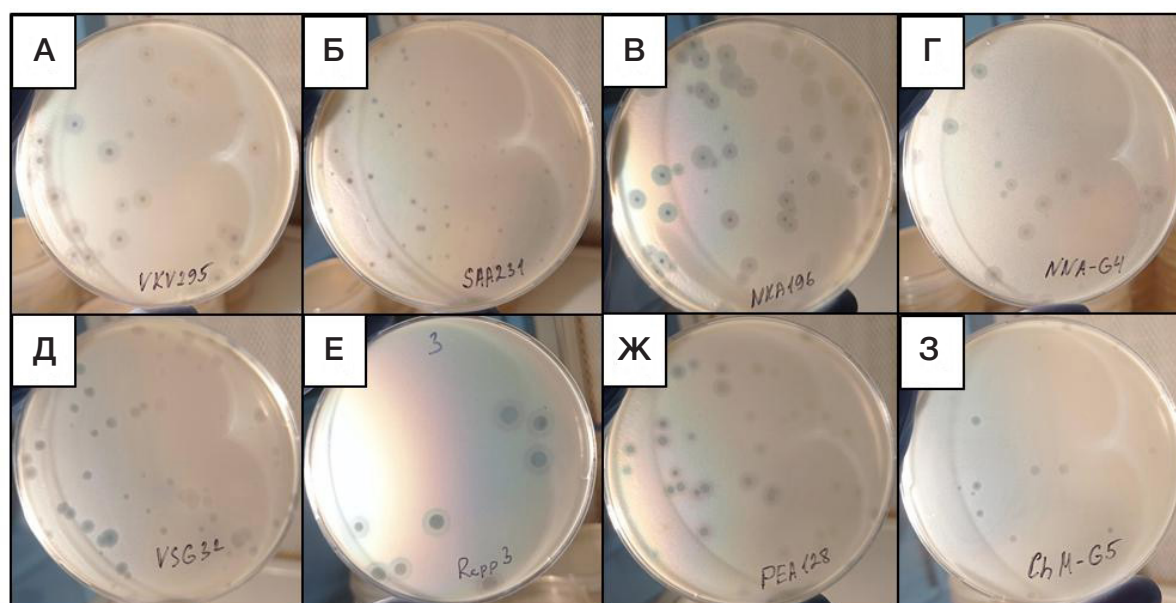


Рис. 2. Морфология негативных колоний бактериофагов VKV295 (А), SAA231 (Б), NKA196 (В), NNA-G4 (Г), VSG32 (Д), Rappa3 (Е), PEA128 (Ж) и ChM-G5 (З)

Таблица 2. Генетическая характеристика бактериофагов

Бактериофаг	GenBank	Таксономическое положение	Длина, п.н.	ОРС	Г + Ц	Идентичность с ближайшим гомологом, %
VKV295	OR287807	<i>Drulisvirus</i>	42380	51	54,10%	90,53
SAA231	OR287809	<i>Drulisvirus</i>	44281	53	54,30%	88,12
NNA-G4	OR287810	<i>Drulisvirus</i>	44575	52	53,80%	90,56
NKA196	OR287808	<i>Drulisvirus</i>	44083	52	53,90%	85,03
Rappa3	OR287806	<i>Przondovirus</i>	40593	42	53,10%	81,32
PEA128	OR287812	<i>Przondovirus</i>	40386	47	52,80%	86,27
VSG32	OR287811	<i>Teetrevirus</i>	39058	48	50,40%	84
ChM-G5	OR287804	<i>Teetrevirus</i>	39235	45	50,90%	90,13

гены метаболизма нуклеиновых кислот и гены структурных белков располагались кластерами в левой и правой части генома соответственно. Представители данного семейства относятся к вирулентным фагам и не несут гены интеграз. Среди аннотированных генов исследуемых бактериофагов не содержалось генов интеграз, детерминант устойчивости к антибиотикам, токсинов или других известных потенциально неблагоприятных для целей терапии генов.

Геномы фагов рода *Drulisvirus* несли 51–53 ОРС, 22–24 из которых были аннотированы как гены гипотетических белков, 12–14 — гены метаболизма нуклеиновых кислот, 12–13 — гены, кодирующие белки капсида, а также 3 гена лизиса клетки-хозяина, представленных идущими друг за другом генами спанина, холина и эндолизина.

Каждый из четырех фагов рода *Drulisvirus* нес по два гена, кодирующих белки фаговых фибрилл, однако только

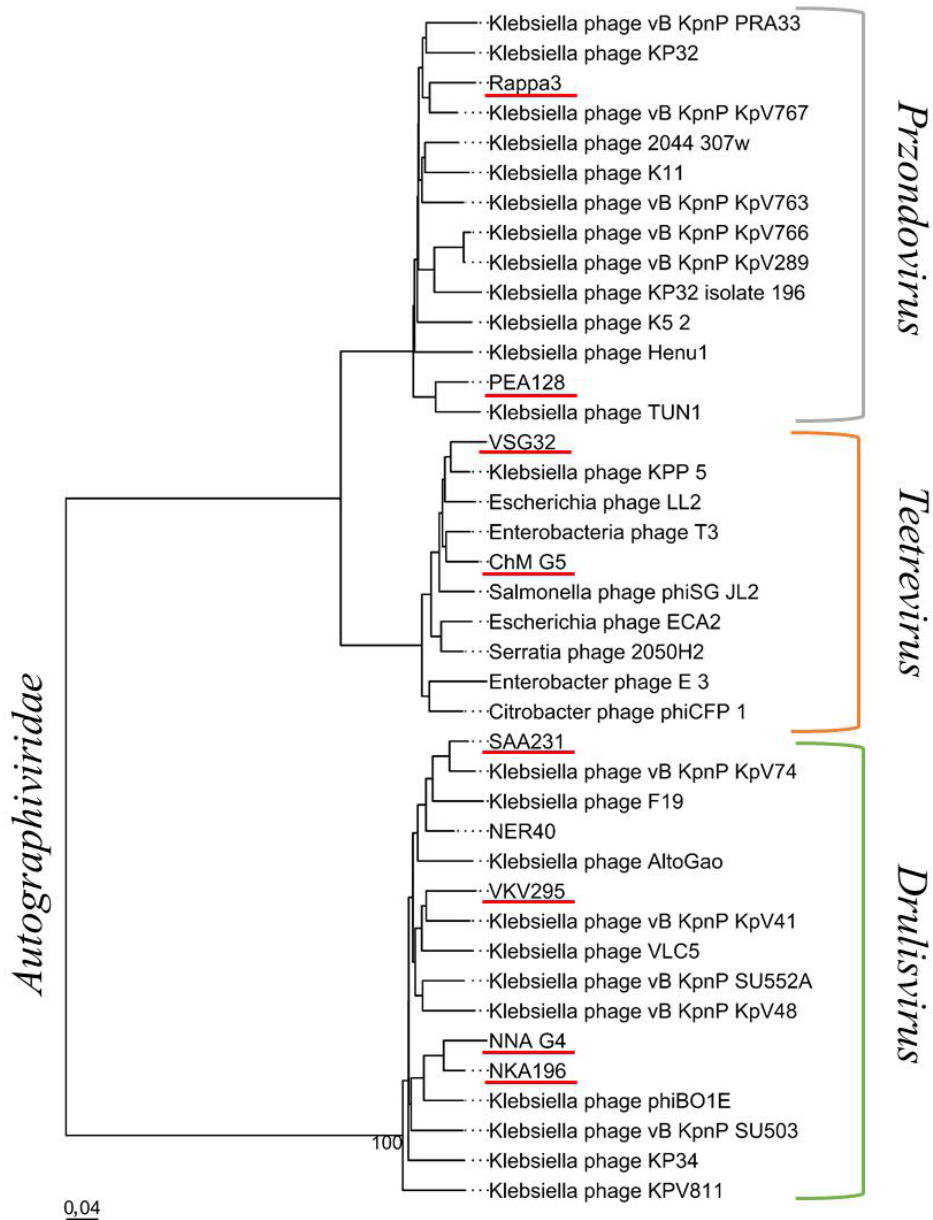


Рис. 3. Филогенетическое древо бактериофагов *K. pneumoniae*. Исследуемые бактериофаги подчеркнуты красным цветом

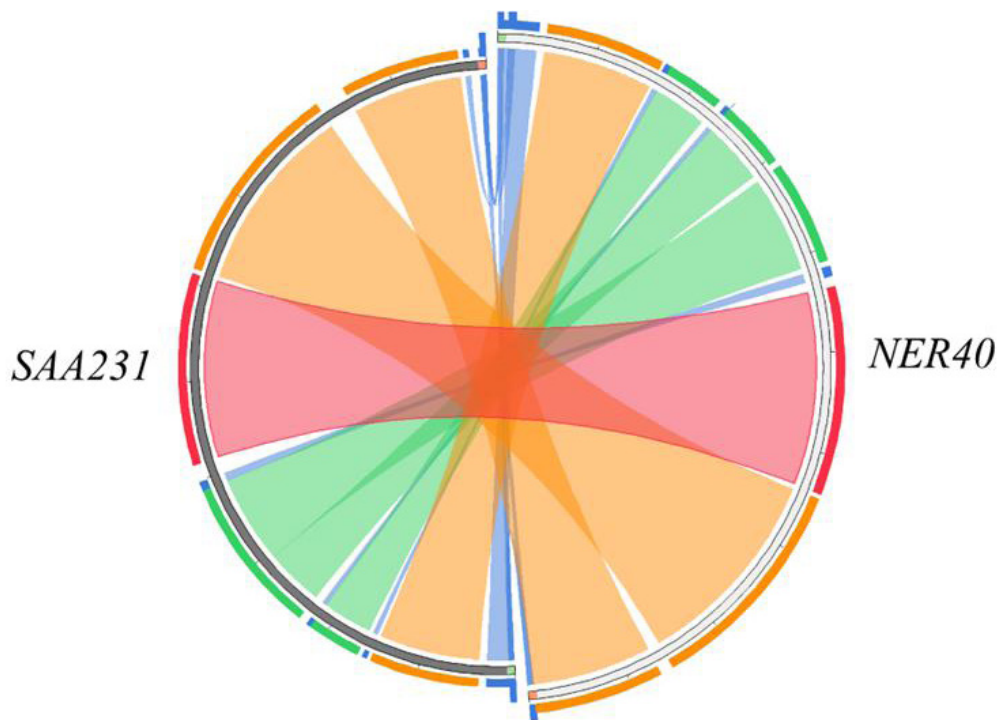


Рис. 4. Сравнение геномов фагов NER40 и SAA231 (процент гомологии: синий цвет означает < 25%; зеленый < 50%; оранжевый < 75%; красный > 75%)

у VKV295 оба гена кодировали домены полисахарид-деполимераз, у трех других фагов деполимеразный домен присутствовал только на одной из двух фибрилл. Гены фибрилл фага VKV295 (*orf0043* и *orf0051*) несли домены гликозил-гидролазы 28 семейства и K1 лиазы и были на 82,53 и 99,75% идентичны фибриллам ближайшего по BLASTn фага KpV2883. В свою очередь, гены фибрилл бактериофага SAA231 на 96,18 и 97,57% были идентичны ближайшему фагу-гомологу vB_KpnP_KpV74; ген первой фибриллы (*orf0044*) не нес деполимеразного домена, а второй (*orf0052*) кодировал домен гликозилгидролазы 28 семейства. Данная деполимераза (SAA231_ *orf0052*) была на 98,1% гомологична ранее описанной фибрилле *orf0053* фага NER40. Бактериофаг NNA-G4 нес два гена фибрилл, только один из которых (*orf0052*) кодировал деполимеразу с доменом пектатлиазы 3 и был на 95,65% идентичен гену фибриллы фага VLC5 (GenBank MT197175.1; 74,97% идентичности). Аналогично NNA-G4, у фага NKA196 деполимеразный домен гликозилгидролазы 28 семейства несла только вторая фибрилла (*orf0052*), на 99,13% идентичная фибрилле фага KPPK108.2 (GenBank OK583892.1; 85,03% идентичности).

Род *Przondovirus* был представлен двумя фагами, геномы которых несли 42–47 OPC. В результате аннотации удалось предсказать функции 71,2–73,8% предполагаемых белков. Было аннотировано 15–16 генов метаболизма нуклеиновых кислот, 14–15 структурных генов, а также два гена лизиса бактерии хозяина, представленных холином II класса и Rz-подобным спанином.

Бактериофаг Rappa3 нес две фибриллы (*orf0037* и *orf0038*), содержащие деполимеразные домены, представленные пектатлиазами 3. Первая фибрилла была на 29,28% идентична фибрилле фага K11 (GenBank NC_0111043.1; 81,01% идентичности), а вторая — на 71,38% идентична фибрилле фага vB_KpnP_KpV767 (GenBank NC_047772.1; 78,09% идентичности). Единственная фибрилла фага PEA128 была на 99,72% идентична фибрилле фага TUN1 (GenBank HG994092.1;

84,11% идентичности) и несла домен гликозил-гидролазы 28 семейства.

Бактериофаги VSG32 и ChM-G5 рода *Teetrevirus* имели 48 и 46 OPC соответственно, из которых функции удалось предсказать для 83,33 и 78,26% OPC: 21 и 19 OPC кодировали гены метаболизма нуклеиновых кислот, 17 и 15 — структурные гены. Гены лизиса хозяина были организованы аналогично фагам рода *Przondovirus* и представлены двумя OPC, кодирующими холин и Rz-подобный спанин.

Каждый из выделенных фагов нес по одному гену фибрилл, кодирующему рецептор-связывающий белок. Деполимераза фага ChM-G5 была представлена фибриллой *orf0040*, на 90,41% идентичной фибрилле фага 6998 (GenBank OL362282.1; 90,13% идентичности) и несущей домен пектатлиазы 3. Бактериофаг VSG32 кодировал фибриллу *orf0042*, идентичную фибрилле фага KPP-5 на 94,97% (GenBank MW600722.1; 87,70% идентичности) и несущую домен адгезии неопределенной природы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Штаммы *K. pneumoniae*, взятые в качестве штаммов хозяев, имели капсульные типы, ассоциированные с нозокомиальными инфекциями, вызывающими трудности в терапевтической практике из-за наличия детерминант устойчивости к антибиотикам [3, 16, 27]. Данные штаммы имеют широкое распространение на территории России и граничащих с ней стран и зачастую несут гены устойчивости к карбапенемам и бета-лактамам антибиотикам расширенного спектра, а также гены гипервирулентности [16, 27]. В собранной коллекции штаммы с капсульными типами KL1, KL2, KL39, KL41, KL47, KL57, KL64 и KL102 занимают 53,05%, что говорит о высокой актуальности выделения терапевтических бактериофагов против них.

Новые бактериофаги были выделены из образцов сточных вод тех же стационаров, где были изолированы штаммы коллекции, а также из вод рек, протекающих

в черте города Москва. Все выделенные бактериофаги образовывали характерный полупрозрачный ореол вокруг единичных негативных колоний, что представляет собой характерный признак наличия рецептор-связывающих белков, представленных полисахарид-деполимеразами. Это также подтверждается узким спектром хозяев фагов, ограниченными штаммами *K. pneumoniae* конкретных капсульных типов. Бактериофаги, специфичные штаммам *K. pneumoniae* с капсульными типами KL1, KL2, KL47, KL57, KL64 и KL102, уже были ранее описаны в литературе среди представителей различных таксонов. Однако на сегодняшний день описан только один фаг, специфичный штаммам *K. pneumoniae* с капсульным типом KL39, и ни одного, специфично лизирующего штаммы *K. pneumoniae* с капсульным типом KL41 [28].

Анализ геномов выделенных бактериофагов показал, что все фаги относятся к семейству *Autographiviridae* и более чем на 5% отличаются от ближайших фагов, представленных в базе данных NCBI, что позволяет нам назвать выделенные бактериофаги новыми видами внутри своих родов [29]. Несмотря на достаточные для выделения нового вида различия полных геномов, гены фибрилл, отвечающие за адсорбцию фага на поверхность бактерии и во многом определяющие спектр хозяев, имели более высокую гомологию с уже известными фибриллами бактериофагов. Так, например, фибриллы фагов VKV295, SAA231, NKA196 и PEA128 оказались на 82,53–99,75% гомологичны фибриллам уже охарактеризованных бактериофагов KpV2883, vB_KpnP_KpV74, KPPK108.2 и TUN1. Напротив, фибриллы фагов NNA-G4, ChM-G5, VSG32 и Rappa3 либо были гомологичны бактериофагам с неописанной хозяйской специфичностью, либо имели слабую (< 75%) гомологию с ближайшими по BLASTp фибриллами известных фагов.

Интересным является тот факт, что в нашей коллекции находится ранее описанный бактериофаг NER40 (GenBank MZ602146.1) рода *Drulivirus*, специфичный штаммам *K. pneumoniae* с капсульным типом KL2 [21]. Существенным отличием двух бактериофагов было то, что, специфично

лизируя штаммы *K. pneumoniae* с капсульным типом KL2, бактериофаг NER40 показывал более высокую эффективность 49/53 (90,57%) против 28/53 (52,8%) для SAA231. Основные различия между геномами фагов NER40 и SAA231 находятся в координатах 6,5–17,5 т.п.н., где локализованы гены, отвечающие за жизненный цикл, тогда как гены адсорбционного аппарата показали свою высокую (98,1%) гомологию (рис. 3). Учитывая вышесказанное, такие значительные различия в спектре хозяев могут быть связаны с разницей в успешности обхода бактериальных антифаговых защитных систем, таких как система рестрикции-модификации или CRISPR. Можно предположить, что гены, обеспечивающие успешное их преодоление, находятся именно в данной области фагового генома (6,5–17,5 т.п.н.) и определяют различие в потенциале терапевтической эффективности.

Важно отметить, что в геномах выделенных бактериофагов не было найдено потенциально нежелательных детерминант, что, наравне с их филогенетическим положением, характеризует их как строго вирулентные бактериофаги, пригодные для применения в антибактериальной терапии. В свою очередь, высокая литическая активность фагов и наличие в качестве рецептор-связывающих белков полисахарид-деполимераз открывают возможность использования не только непосредственно бактериофагов, но и их производных для нужд терапии.

ВЫВОДЫ

Были выделены и охарактеризованы бактериофаги, обладающие специфической литической активностью в отношении клинически значимых штаммов *K. pneumoniae* отдельных капсульных типов: VKV295 против KL1, SAA231 — KL2, NNK-G4 — KL39, VSG32 — KL41, NKA196 — KL47, Rappa3 — KL57, PEA128 — KL64, ChM-G5 — KL102. Геномы фагов были проверены на отсутствие потенциально опасных для терапии генов (интеграз, токсинов, факторов устойчивости к антибиотикам), что говорит о потенциале данных фагов для терапевтического применения.

Литература

1. He Y, Li W, Wang Z, Chen H, Tian L, et al. Nosocomial infection among patients with COVID-19: A retrospective data analysis of 918 cases from a single center in Wuhan, China. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020; 41 (8): 982–3.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). AER for 2021. Surveillance report, 2022; p. 20.
3. Сухорукова М. В., Эйдельштейн М. В., Иванчик Н. В., Скленова Е. Ю., Шайдуллина Э. Р., Азизов И. С. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacterales в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21 (2): 147–59.
4. Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, et al. Klebsiella pneumoniae bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023; 13 (April): 1–9.
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399 (10325): 629–55.
6. Górski A, Międzybrodzki R, Węgrzyn G, Jończyk-Matysiak E, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med Res Rev*. 2020; 40 (1): 459–63.
7. Aslam S, Lamplé E, Wooten D, Karris M, Benson C, Strathdee S, et al. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the United States. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7 (9): ofaa389.
8. Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, et al. Phage Therapy of Mycobacterium Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis*. 2023; 76 (1): 103–12.
9. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017; 61 (10): 1–15.
10. Куцлов Н. С., Корниенко М. А., Горюничев П. Б., Данилов Д. И., Парфенова Т. В., Макаренко Г. И. и др. Эффективность препаратов бактериофагов против патогенов группы ESKAPE. *Вестник РГМУ*. 2020; 3 (2020): 19–26.
11. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100 (5): 2141–51.

12. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb genomics*. 2016; 2 (8): e000073.
13. Liao CH, Huang YT, Hsueh PR. Multicenter surveillance of capsular serotypes, virulence genes, and antimicrobial susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia in Taiwan, 2017–2019. *Front Microbiol*. 2022; 13: 783523.
14. Jin Y, Dong C, Shao C, Wang Y, Liu Y. Molecular epidemiology of clonally related Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns in a hospital in Shandong, China. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2017; 10 (9): 14046.
15. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, et al. An analysis of the epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary mechanisms creates the “Perfect Storm”. *J Infect Dis*. 2018; 217 (1): 82–92.
16. Shaidullina ER, Schwabe M, Rohde T, Shapovalova VV, Dyachkova MS, Matsvay AD, et al. Genomic analysis of the international high-risk clonal lineage *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395. *Genome Med*. 2023; 15 (1): 17.
17. Егоров С. А., Семёнов В. М., Дмитраченко Т. И. Анализ изолятов *Klebsiella pneumoniae*, обладающих широкой резистентностью к антибиотикам. *Педиатрия. Восточная Европа*. 2022; 10 (3): 325–33.
18. Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem*. 2001; 73 (4): 746–50.
19. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *klebsiella* strains. *J Clin Microbiol*. 2013; 51 (12): 4073–8.
20. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol Biol*. 2009; 501: 77–80.
21. Городничев П. Б., Корниенко М. А., Купцов Н. С., Малахова М. В., Беспятых Д. А., Веселовский В. А. и др. Молекулярно-генетическая характеристика трех новых бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, перспективных для применения в фаговой терапии. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2021; 23 (3): 90–7.
22. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 4th. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012; p. 1936.
23. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB. 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res*. 2019; 47 (D1): D687–D692.
24. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (SUPPL 1): 443–7.
25. Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics*. 2017; 33 (21): 3396–404.
26. Darzentas N. Circoletto: visualizing sequence similarity with Circos. *Bioinformatics*. 2010; 26 (20): 2620–1.
27. Fursova NK, Astashkin EI, Ershova ON, Aleksandrova IA, Savin IA, Novikova TS, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing severe infections in the neuro-ICU. *Antibiotics*. 2021; 10 (8): 1–17.
28. Beamud B, García-González N, Gómez-Ortega M, González-Candelas F, Domingo-Calap P, Sanjuan R. Genetic determinants of host tropism in *Klebsiella* phages. *Cell Rep*. 2023; 42 (2): 112048.
29. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses*. 2021; 13 (3): 506.

References

1. He Y, Li W, Wang Z, Chen H, Tian L, et al. Nosocomial infection among patients with COVID-19: A retrospective data analysis of 918 cases from a single center in Wuhan, China. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2020; 41 (8): 982–3.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net). AER for 2021. Surveillance report. 2022; p. 20.
3. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Ivanchik NV, Skleenova EYu, Shajdullina ER, Azyzov IS, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: Results of multicenter epidemiological study «MARATHON 2015–2016». *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019; 21 (2): 147–59. Russian.
4. Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, et al. *Klebsiella pneumoniae* bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023; 13: 1–9.
5. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022; 399 (10325): 629–55.
6. Górski A, Międzybrodzki R, Węgrzyn G, Jończyk-Matysiak E, Borysowski J, Weber-Dąbrowska B. Phage therapy: Current status and perspectives. *Med Res Rev*. 2020; 40 (1): 459–63.
7. Aslam S, Lampley E, Wooten D, Karris M, Benson C, Strathdee S, et al. Lessons learned from the first 10 consecutive cases of intravenous bacteriophage therapy to treat multidrug-resistant bacterial infections at a single center in the United States. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7 (9): ofaa389.
8. Dedrick RM, Smith BE, Cristinziano M, Freeman KG, Jacobs-Sera D, Belessis Y, et al. Phage Therapy of Mycobacterium Infections: Compassionate Use of Phages in 20 Patients With Drug-Resistant Mycobacterial Disease. *Clin Infect Dis*. 2023; 76 (1): 103–12.
9. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2017; 61 (10): 1–15.
10. Kuptsov NS, Kornienko MA, Gorodnichev RB, Danilov DI, Parfenova TV, Makarenko GI, et al. Efficacy of commercial bacteriophage products against ESKAPE pathogens. *Bulletin of RSMU*. 2020; 3 (2020): 19–26. Russian.
11. Pires DP, Oliveira H, Melo LD, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016; 100 (5): 2141–51.
12. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE, et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microb genomics*. 2016; 2 (8): e000073.
13. Liao CH, Huang YT, Hsueh PR. Multicenter surveillance of capsular serotypes, virulence genes, and antimicrobial susceptibilities of *Klebsiella pneumoniae* causing bacteremia in Taiwan, 2017–2019. *Front Microbiol*. 2022; 13: 783523.
14. Jin Y, Dong C, Shao C, Wang Y, Liu Y. Molecular epidemiology of clonally related Metallo- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from newborns in a hospital in Shandong, China. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2017; 10 (9): 14046.
15. Rojas LJ, Weinstock GM, De La Cadena E, Diaz L, Rios R, Hanson BM, et al. An analysis of the epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. pneumoniae*: convergence of two evolutionary mechanisms creates the “Perfect Storm”. *J Infect Dis*. 2018; 217 (1): 82–92.
16. Shaidullina ER, Schwabe M, Rohde T, Shapovalova VV, Dyachkova MS, Matsvay AD, et al. Genomic analysis of the international high-risk clonal lineage *Klebsiella pneumoniae* sequence type 395. *Genome Med*. 2023; 15 (1): 17.
17. Egorov SK, Semenov VM, Dmitrachenko TI. Analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates with extremely high antibiotic resistance. *Paediatrics. Eastern Europe*. 2022; 10 (3): 325–33. Russian.
18. Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. *Anal Chem* 2001; 73 (4): 746–50.
19. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. Wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsulartype for *klebsiella* strains. *J Clin*

- Microbiol. 2013; 51 (12): 4073–8.
20. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol Biol.* 2009; 501: 77–80.
 21. Gorodnichev RB, Kornienko MA, Kuptsov NS., Malakhova MV, Bespiatykh DA, Veselovsky VA, et al. Molecular genetic characterization of three new *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages suitable for phage therapy. *Extreme medicine.* 2021; 23 (3): 90–7. Russian.
 22. Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning. A Laboratory Manual* 4th. Cold Spring Harbor Laboratory, 2012; p. 1936.
 23. Liu B, Zheng D, Jin Q, Chen L, Yang J. VFDB. 2019: A comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47 (D1): D687–D692.
 24. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (SUPPL 1): 443–7.
 25. Meier-Kolthoff JP, Göker M. VICTOR: genome-based phylogeny and classification of prokaryotic viruses. *Bioinformatics.* 2017; 33 (21): 3396–404.
 26. Darzentas N. Circoletto: visualizing sequence similarity with Circos. *Bioinformatics.* 2010; 26 (20): 2620–1.
 27. Fursova NK, Astashkin EI, Ershova ON, Aleksandrova IA, Savin IA, Novikova TS, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* causing severe infections in the neuro-ICU. *Antibiotics.* 2021; 10 (8): 1–17.
 28. Beamud B, García-González N, Gómez-Ortega M, González-Candelas F, Domingo-Calap P, Sanjuan R. Genetic determinants of host tropism in *Klebsiella* phages. *Cell Rep.* 2023; 42 (2): 112048.
 29. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A roadmap for genome-based phage taxonomy. *Viruses.* 2021; 13 (3): 506.