

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, КОДИРУЮЩИХ ПОЛИСАХАРИД-ДЕПОЛИМЕРАЗЫ С УНИКАЛЬНОЙ КАПСУЛЬНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТЬЮ

Р. Б. Городничев¹✉, М. А. Корниенко¹, Д. А. Беспятых¹, М. В. Малахова¹, В. А. Веселовский¹, О. В. Голощапов², А. Б. Чухловин^{2,3}, Ю. А. Беспятых¹, Е. А. Шитиков¹

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

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

³ Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

Бактериальные инфекции, вызываемые устойчивыми к антибиотикам штаммами *Klebsiella pneumoniae*, входят в список самых опасных угроз для мирового общественного здравоохранения. Одним из альтернативных способов терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, может стать терапия бактериофагами и/или их производными. Целью работы было выделить из внешней среды и охарактеризовать капсуло-специфичные бактериофаги *K. pneumoniae*, пригодные для терапевтического применения и несущие гены полисахарид-деполимераз. Бактериофаги выделяли из проб речной воды методом накопительных культур. Спектр хозяев бактериофагов оценивали на коллекции из 180 клинических штаммов *K. pneumoniae*. Полногеномное секвенирование бактериофагов выполняли на платформе MiSeq (Illumina). В рамках исследования выделено и охарактеризовано четыре новых бактериофага, принадлежащих к различным таксономическим группам: vB_KpnM_NDO71 (подсемейство *Vequintavirinae*), vB_KpnS_MAG26fr (семейство *Casjensviridae*), vB_KpnS_MDA2066 (семейство *Ackermannviridae*) и vB_KpnS_PMM-G3 (семейство *Drexelviriidae*). Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 обладали узким спектром литической активности и лизировали все штаммы с капсульным типом штамма хозяина: KL45, KL19 или KL28 соответственно. Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 проявлял литическую активность в отношении штаммов двух различных капсульных типов: KL19 и KL107. Бактериофаги обладали строго вирулентной природой и не несли в своем составе генов интеграз, а также потенциально опасных генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам, что позволяет применять их в терапевтической практике. Для каждого бактериофага предсказаны рецептор-связывающие белки, представленные полисахарид-деполимеразы.

Ключевые слова: вирулентные бактериофаги, *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, фаготерапия, 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/>.

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

Соблюдение этических стандартов: экспериментальная работа выполнена с соблюдением норм Санитарно-эпидемиологических правил «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.2518-09 — «Дополнения и изменения № 1 к санитарно-эпидемиологическим правилам «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08; Санитарно-эпидемиологических правил «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами» СанПиН 2.1.7.2790-10, СанПиН 3.3686-21, 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, д. 1а, г. Москва, 119435, Россия; gorodnichev.r.b@gmail.com

Статья получена: 17.10.2022 **Статья принята к печати:** 05.11.2022 **Опубликована онлайн:** 01.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.038

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* BACTERIOPHAGES ENCODING POLYSACCHARIDE DEPOLYMERASES WITH RARE CAPSULE SPECIFICITY

Gorodnichev RB¹✉, Kornienko MA¹, Bespiatykh DA¹, Malakhova MV¹, Veselovsky VA¹, Goloshchapov OV², Chukhlov AB^{2,3}, Bespyatykh JA¹, Shitikov EA

¹ 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 Pediatric Research and Clinical Center of Infectious Diseases of the Federal Medical Biological Agency, Saint Petersburg, Russia

Bacterial infections caused by antibiotic resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* are among the most dangerous threats for the world's public healthcare. Treatment with bacteriophages and/or their derivatives could become one of the alternative methods for therapy of infections caused by *K. pneumoniae*. The study was aimed to isolate from the environment and characterize the capsule-specific *K. pneumoniae* bacteriophages that are useful for therapy and possess the polysaccharide depolymerase genes. Bacteriophages were isolated from the river water samples by enrichment method. The host range of bacteriophages were assessed using the collection of 180 *K. pneumoniae* clinical strains. Bacteriophage whole genome sequencing was performed on the MiSeq platform (Illumina). Four new bacteriophages from different taxonomic groups were isolated and characterized during the study: vB_KpnM_NDO71 (*Vequintavirinae* family), vB_KpnS_MAG26fr (*Casjensviridae* family), vB_KpnS_MDA2066 (*Ackermannviridae* family), and vB_KpnS_PMM-G3 (*Drexelviriidae* family). Bacteriophages vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, and vB_KpnS_PMM-G3 had a narrow lytic spectrum and lysed all strains with the capsular type of the host: KL45, KL19 or KL28, respectively. Bacteriophage vB_KpnS_MDA2066 showed lytic activity against strains with two different capsular types: KL19 and KL107. Bacteriophages were strictly virulent and contained no integrase genes, potentially dangerous toxin genes or antibiotic resistance determinants. This allows them to be used in therapeutic practice. Receptor-binding proteins represented by polysaccharide depolymerases were predicted for each bacteriophage.

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

Funding: the study was supported by the funds of the State Assignment "Development of the Scheme for Complex Therapy of Infectious Diseases Caused by Antibiotic Resistant Pathogens Involving the Use of Bacteriophages or Their Derivatives in Combination with Antibacterials" (code: Bacteriophage-2). Typing of *Klebsiella pneumoniae* strains was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-15-00149, <https://rscf.ru/project/22-15-00149/>).

Author contribution: Gorodnichev RB, Kornienko MA — study plan, data acquisition and processing, manuscript writing; Bespiatykh DA — data processing; Malakhova MV — data acquisition; Veselovsky VA, Goloshchapov OV, Chukhlov AB, Bespyatykh JA — data acquisition and processing, Shitikov EA — study plan, data processing, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: experimental work was carried out in compliance with the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines SP 1.3.2518-09 "Additions and Amendments № 1 to the guidelines SP 1.3.2322-08 "Safety of Working With Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity (Danger) and Causative Agents of Parasitic Diseases"; guidelines "Sanitary and Epidemiologic Requirements for the Handling of Medical Waste" (SanPiN 2.1.7.2790-10 SanPiN 3.3686-21, SanPiN 2.1.3684-21); 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: 17.10.2022 **Accepted:** 05.11.2022 **Published online:** 01.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.038

Klebsiella pneumoniae представляет собой грамотрицательную неподвижную факультативно-анаэробную бактерию, которая встречается повсеместно в природе и может быть обнаружена в составе нормальной флоры человека и животных [1, 2]. В то же время *K. pneumoniae* — второй по распространенности внутрибольничный патоген в мире, способный вызывать широкий спектр инфекций, таких как абсцессы, гнойные раны, септицемия, пневмония, инфекции мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта [3]. В рамках российского исследования «Марафон 2015–2016» было показано, что штаммы *K. pneumoniae* преобладают (47,2%) среди всех нозокомиальных штаммов *Enterobacterales* [4]. По данным того же исследования и карты антибиотикорезистентности России [5], доля изолятов, устойчивых к карбапенемам, составляет 6,9–41,6%, к цефалоспорином III–IV поколения резистентны 80,1–90,2%, а к колистину — до 6,11%. Ассоциированные с устойчивостью к антибиотикам штаммы *K. pneumoniae* занимают третье место по уровню смертности среди бактерий, устойчивых к антибиотикам [6].

Одним из альтернативных видов терапии инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, может стать терапия бактериофагами и/или их производными [7]. Бактериофаги — это наиболее распространенная и многочисленная группа вирусов, которые являются естественными паразитами бактерий в природных популяциях [8]. Благодаря способности бактериофагов заражать и лизировать клетки бактерий, их использовали в качестве антимикробного средства с момента открытия в начале XX в. [9]. Фаготерапия имеет ряд преимуществ, таких как способность лизировать бактерии вне зависимости от их устойчивости к антибиотикам и отсутствие побочных эффектов на организм пациента, что позволяет использовать бактериофаги даже для лечения детей и иммунокомпрометированных пациентов [10]. На сегодняшний день применение бактериофагов в терапевтических целях переживает второй подъем, и все чаще в литературе появляются описания успешных случаев лечения [11–13].

Помимо использования бактериофагов, на данный момент пристальное внимание уделяется отдельным фаговым белкам, эффективным против поверхностных структур бактерий. Одним из примеров могут служить полисахарид-деполимеразы [14]. Белки обладают способностью разрушать бактериальные капсульные полисахариды, тем самым сенсibiliзируя бактерии к действию антимикробных препаратов и иммунной системы [15]. Как правило, деполимеразы обладают узкой специфичностью, ограниченной конкретным типом полисахарида бактериальной капсулы [14]. В связи с этим поиск и описание бактериофагов, кодирующих деполимеразы против широкого круга капсульных типов клинически значимых бактерий, являются актуальной задачей новейших подходов к терапии инфекций, вызванных бактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

Целью данной работы было выделить из внешней среды и охарактеризовать капсуло-специфичные бактериофаги бактерии *K. pneumoniae*, пригодные для терапевтического применения и несущие гены полисахарид-деполимераз.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы бактерий и их характеристика

В работе было использовано 180 клинических изолятов *K. pneumoniae*, собранных в течение 2019–2022 гг. в НИИ

детской онкологии, гематологии и трансплантологии им. Р. М. Горбачевой (Санкт-Петербург, Россия), Клинической больницы № 123 (Одинцово, Россия) и в том числе 12 штаммов, полученных из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (Оболensk, Россия).

Бактериальные штаммы культивировали в лизогенном бульоне (LB) (Himedia; Индия) при 37 °C. Видовую идентификацию проводили с помощью метода прямого масс-спектрометрического профилирования бактериального лизата по методике, описанной ранее [16]. Масс-спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре Microflex (Bruker Daltonics; Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров применяли программное обеспечение flexControl 3.0 и flexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics; Германия). Видовую идентификацию проводили с помощью программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics; Германия). Тип капсулы *K. pneumoniae* определяли методом секвенирования гена *wzi* [17].

Выделение и очистка бактериофагов

В качестве источника фагов использовали образец речной воды. Для удаления бактериальной фракции образец центрифугировали (4000 g, 10 мин), супернатант фильтровали через фильтры 0,22 мкм (Merk Millipore; США). Равные аликвоты (15 мл) фильтрованной воды и бульона LB двойной концентрации смешивали и инокулировали 20 мкл ночной культурой потенциального штамма хозяина. Смесь инкубировали в течение ночи на шейкере-качалке при 37 °C. Полученную суспензию стерилизовали с помощью фильтра 0,22 мкм, а наличие бактериофагов в фильтрате проверяли методом спот-тестирования [18]. Фаговые изоляты очищали тройным проведением через единичную колонию.

Определение спектра литической активности

Спектр литической активности для бактериофагов был установлен методом спот-тестирования [18]. Для этого 100 мкл культуры каждого штамма на логарифмической фазе роста добавляли к 5 мл незастывшего полужидкого LB-агара (0,7% агара) и наносили на чашки Петри, содержащие тонкий слой LB агара (1,5% агара). Тестирование проводили путем нанесения по 5 мкл серийных разведений бактериофагов на поверхность свежесазанных газонов штаммов. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °C, наличие литической активности у бактериофага определяли по наличию зоны сплошного лизиса бактериальных клеток, совпадающей с формой капли. Наличие полупрозрачного ареола вокруг зоны лизиса или единичной колонии бактериофага интерпретировали как полисахарид-деполимеразную активность бактериофага.

Полногеномное секвенирование бактериофагов и биоинформатический анализ данных

Экстракцию геномной ДНК фага проводили с использованием стандартного протокола фенол-хлороформной экстракции [19]. Процедуру секвенирования осуществляли с помощью инструмента MiSeq (Illumina; США) с использованием набора реагентов для секвенирования MiSeq Reagent Nano Kit v2 (500cycle) (Illumina; США) согласно рекомендациям производителя. Сборку геномов проводили с помощью программы SPAdes (v.3.14.0). Для идентификации

открытых рамок считывания (ОРС) в геноме использовали веб-сервис GeneMarkS (версия 4.32). Поиск генов тРНК проводили с помощью ARAGORN.

Аннотацию предсказанных генов проводили вручную с использованием BLASTp, HHPred и InterPro. Отсутствие генов токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам подтверждали сравнением с базами данных факторов вирулентности патогенных бактерий [20] и генов устойчивости к антибиотикам [21]. Аннотированные последовательности геномов бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 были депонированы в базу GenBank под номерами OP558001, OP558002, OP558003 и OP558005 соответственно.

Филогенетический анализ выполняли с использованием 62 референсных геномов бактериофагов, рекомендованных Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV, от англ. International Committee on Taxonomy of Viruses). Филогенетические деревья на основе попарных расстояний между геномами фагов были построены с использованием автономной версии ViPTree v.1.1.2. [22]. Ближайшие гомологи бактериофагов определяли с помощью алгоритма BLASTn. Для сравнительного анализа последовательностей отдельных белков использовали сервисы BLASTp.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение, морфология и спектр литической активности бактериофагов *K. pneumoniae*

Из образца воды реки Лихоборка (Москва) методом накопительных культур были выделены четыре бактериофага *K. pneumoniae*: vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3. В качестве штаммов хозяев были использованы выделенные в 2020 г. клинические штаммы с определенными капсульными типами: *K. pneumoniae* Kp71 (капсульный тип KL45), Kp26f (KL19), Kp2066 (KL107) и KpG3 (KL28).

Бактериофаг vB_KpnM_NDO71 формировал мелкие (0,5 мм) негативные колонии, окруженные широким (2–4 мм) ореолом. Негативные колонии бактериофага vB_KpnS_PMM-G3 были значительно крупнее (1–2 мм) и окружены широким (4–5 мм) ореолом. Бактериофаги vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_MDA2066 формировали мелкие (0,5 мм) негативные колонии, окруженные небольшим (1–2 мм) ореолом (рис. 1).

Спектр литической активности бактериофагов был оценен на коллекции из 180 штаммов *K. pneumoniae* с известным капсульным типом на основании типирования по последовательности гена *iszI*. Штаммы относились к 31 уникальному капсульному типу, среди которых самыми распространенными были KL2 (19,4%), KL23 (9,4%), KL39 (8,9%), KL64 (8,9%) и KL20 (6,1%).

Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 обладали узким спектром литической активности и лизировали все штаммы с капсульным типом

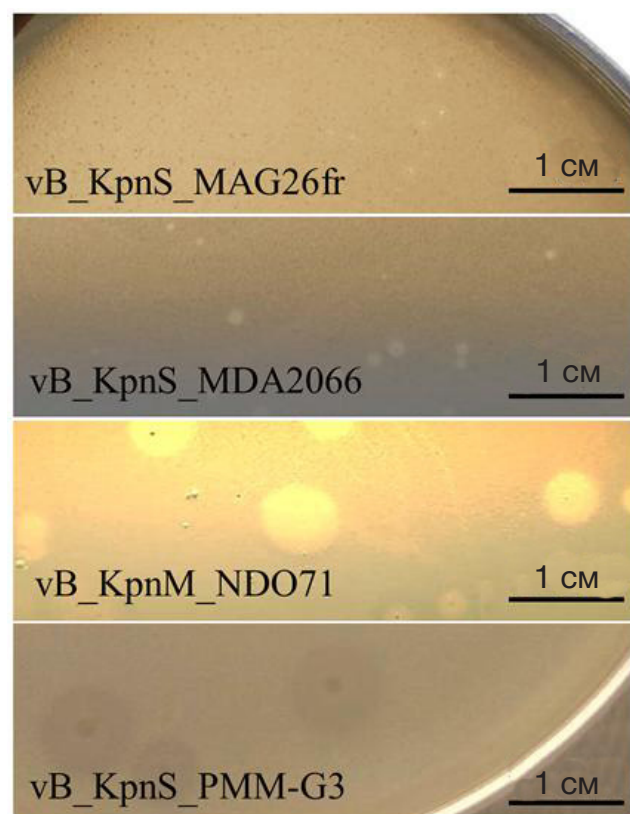


Рис. 1. Морфология негативных колоний бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

штамма хозяина: KL45 ($n = 4$; 2,2%), KL19 ($n = 6$; 3,3%) и KL28 ($n = 4$; 2,2%) соответственно. Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 проявлял литическую активность в отношении штаммов двух различных капсульных типов: KL19 и KL107 ($n = 7$; 3,9%).

Полногеномное секвенирование и филогенетический анализ бактериофагов

Геномы исследуемых бактериофагов были представлены двухцепочечными молекулами ДНК длиной от 49 477 до 158 414 п.н. и содержанием Г+Ц пар 44,4–56,1% (табл. 1). Число предсказанных открытых рамок считывания (ОРС) варьировало от 76 до 236, для бактериофагов vB_KpnM_NDO71 и vB_KpnS_MDA2066 были выявлены гены тРНК (21 и 7 соответственно).

Для установления таксономического положения бактериофагов было построено филогенетическое древо с использованием полногеномных последовательностей фагов, рекомендованных ICTV (рис. 2). Бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 принадлежали к разным таксономическим группам и на филогенетическом древе относились к кластерам, образованным представителями родов *Mydovirus*, *Yonseivirus*, *Taipeivirus* и *Webervirus* соответственно.

Таблица 1. Общая характеристика геномов фагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

Бактериофаг	Длина генома, п.н.	Г+Ц	ОРС	тРНК
vB_KpnM_NDO71	136 566	44,40%	236	21
vB_KpnS_MAG26fr	59 701	56,10%	79	0
vB_KpnS_MDA2066	158 414	46,40%	208	7
vB_KpnS_PMM-G3	49 477	50,10%	76	0

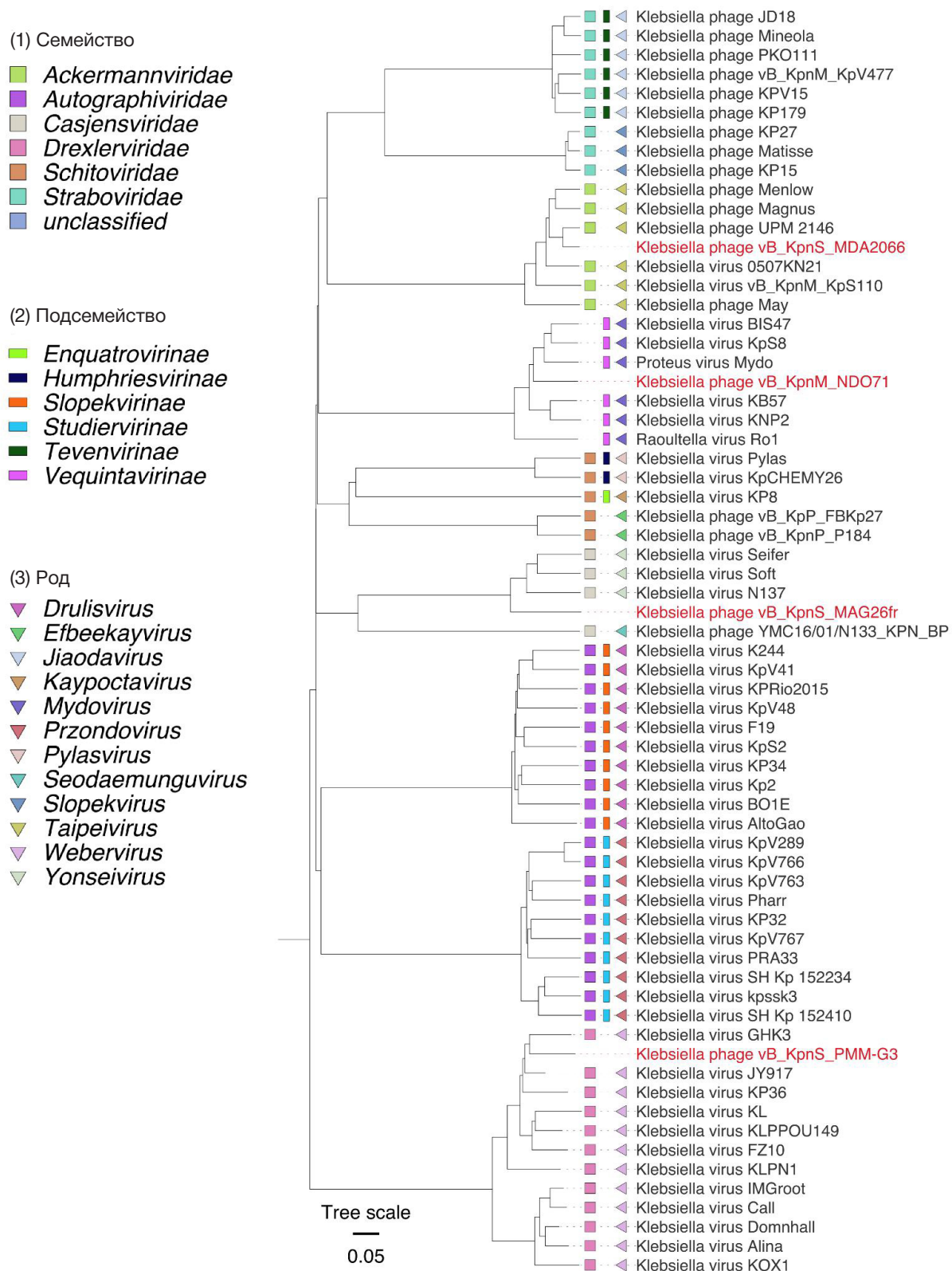


Рис. 2. Филогенетическое древо бактериофагов *K. pneumoniae*. Исследуемые бактериофаги отмечены красным цветом

На основании анализа BLASTn ближайшим гомологом фага vB_KpnM_NDO71 оказался Klebsiella phage vB_KpnM_KB57 (GenBank KT934943.1; 84% покрытия и 96,49% идентичности), фага vB_KpnS_MAG26fr — Klebsiella phage S9a (GenBank ON623732.1; 71% покрытия и 93,88% идентичности), фага vB_KpnS_MDA2066 — Klebsiella virus UPM 2146 (GenBank NC_049472.1; 95% покрытия и 98,98% идентичности), а фага vB_KpnS_PMM-G3 — Klebsiella virus

UPM 2146 (GenBank NC_049472.1; 95% покрытия и 98,98% идентичности).

Функциональный анализ фагов *K. pneumoniae*

В ходе функциональной аннотации генома vB_KpnM_NDO71 удалось предсказать функцию для 61 белка. Бактериофаг имел стандартное строение для rV5-подобных

Таблица 2. Предсказанные деполимеразные домены фагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3

ОРС	Деполимеразный домен	Размер белка, а/к	Идентичность с ближайшим гомологом, %		
			N-концевой домен	Деполимеразный домен	C-концевой домен
vB_KpnM_NDO71					
orf047	Пектатлиаза 4	597	0	90,8	57,8
vB_KpnS_MAG26fr					
orf055	Гликозилгидролаза семейства 48	941	29,4	41,8	50,8
vB_KpnS_PMM-G3					
orf046	Пектатлиаза 3	742	98,5	83,5	99,7
vB_KpnS_MDA2066					
orf130	Пектатлиаза 3	960	0	38,2	33,5
orf131	Гликозилгидролаза семейства 28	766	6,8	73,4	64,7
orf133	Гликозилгидролаза семейства 28	660	100	100	100
orf135	Гликозилгидролаза семейства 28	721	31,8	67,2	59,6

фагов: не кодировал РНК-полимеразу, а в качестве белка лизиса имел о-спанин. В отличие от фагов-гомологов Seu621 и VIK251 [23, 24] в геноме фага vB_KpnM_NDO71 ген ДНК-полимеразы был разбит на две рамки считывания геном хомингэндонуклеазы.

Для фага vB_KpnS_MAG26fr предполагаемая функция (структурные белки; ферменты, участвующие в репликации, регуляции, транскрипции и трансляции ДНК; лизис хозяина) была присвоена продуктам 42 ОПС. Из них 19 относились к структурным белкам фага, а за лизис хозяина отвечала кассета из пяти белков (о-спанин, компонент спанина внутренней мембраны, эндолизин и два белка системы холин-антихолин).

Бактериофаг vB_KpnS_MDA2066 кодировал 80 белков с предполагаемой функцией. Среди них 27 относились к структурным белкам; 52 — к генам, участвующим в репликации, регуляции, транскрипции и трансляции ДНК; кроме того, фаг кодировал один белок эндолизина, отвечающий за лизис бактерии хозяина.

Из 76 ОПС фага vB_KpnS_PMM-G3 43 кодировали белки с предсказанной функцией, большинство из которых относились к структурным белкам. Бактериофаг имел структуру генома, характерную для T1-подобных бактериофагов, и не кодировал гены ДНК- и РНК-полимеразы.

Рецептор-связывающие белки бактериофагов

Согласно функциональному анализу пять ОПС бактериофага vB_KpnM_NDO71 были аннотированы как белки фаговых фибрилл. В дальнейшем было обнаружено, что NDO71_orf047 несет деполимеразный домен, представленный пектатлиазой 4 (табл. 2). Анализ, проведенный с помощью BLASTp, показал, что данный белок обладал высокой гомологией с гипотетическими белками профагов *K. pneumoniae* (GenBank WP_180812430.1; 89% покрытия и 68,97% идентичности).

В геноме vB_KpnS_MDA2066 также было закодировано пять белков, аннотированных как белки фаговых фибрилл. Однако в отличие от vB_KpnM_NDO71, четыре из пяти предсказанных белков фибрилл фага несли домены полисахарид-деполимераз: MDA2066_orf130 — пектатлиазу 3, а MDA2066_orf131, MDA2066_orf133 и MDA2066_orf135 — гликозилгидролазы семейства 28.

Два белка фибрилл бактериофага vB_KpnS_MDA2066 (orf131 и orf135) имели уровень гомологии выше 50% с ранее описанными фибриллами бактериофага *Klebsiella* phage K64-1, специфичными в отношении капсульных типов K30/K69 и KN4 соответственно. Белок фибриллы MDA2066_orf130 имел гомологию (53% покрытия, 34,87% идентичности согласно BLASTp) с белком фибриллы ранее описанного фага P929, проявляющего литическую активность в отношении штаммов с капсульным типом KL19 (табл. 2). Четвертый белок фибрилл MDA2066_orf133 был идентичен белку фибриллы фага *Klebsiella* virus UPM 2146 и обладал высокой гомологией с аналогичными белками фагов рода *Taieivirus* (покрытие 100% и идентичность 99%).

Геном фага vB_KpnS_MAG26fr кодировал два белка, аннотированных как белки фибрилл. Один из них (MAG26fr_orf055) кодировал деполимеразный домен, представленный гликозилгидролазой семейства 48 (табл. 2). Ближайшим гомологом данного белка фибрилл являлся дистальный хвостовой белок бактериофага Soft (GenBank YP_009851405.1; 100% покрытия и 46,36% идентичности).

Аналогично фагу vB_KpnS_MAG26fr в геноме vB_KpnS_PMM-G3 было закодировано два белка фибрилл. При более детальном анализе для одного из этих белков (PMMG3_orf046) был предсказан домен полисахарид-деполимеразы, представленный пектатлиазой 3. Данный белок обладал высокой гомологией с белком фибрилл не описанного фага *Klebsiella* phage VLCpiD7c (GenBank UUX29830.1; 100% покрытия и 95,15% идентичности).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе исследования из природных источников было выделено четыре бактериофага, способных лизировать штаммы *K. pneumoniae* с капсульными типами KL19, KL28, KL45 и KL107. Следует отметить, что бактериофаги против трех типов описаны впервые, тогда как фаги vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_MAG26fr обладали активностью против штаммов с капсульным типом KL19, так же как и ранее описанный *Klebsiella* phage P929 [25].

Для описания генетических особенностей фагов был использован метод полногеномного секвенирования, в последние годы широко применяемый для определения

таксономического положения фагов и исследования их организации [26]. Филогенетический анализ данных позволил обнаружить, что исследуемые бактериофаги относятся к разным родам и семействам. Более того, выравнивание геномов с использованием алгоритма BLASTn выявило значимые различия (> 5%) с геномами ближайших фагов, позволяя сделать вывод, что исследованные бактериофаги являются представителями новых видов [26].

Функциональный анализ кодируемых генов продемонстрировал, что фаги имели типичную для представителей своих родов организацию генома. Бактериофаги обладали строго вирулентной природой и не несли в своем составе гены интеграз, а также потенциально опасные гены токсинов и детерминант устойчивости к антибиотикам, что позволяет применять их в терапевтической практике.

В геномах всех четырех бактериофагов были предсказаны рецептор-связывающие белки, представленные полисахарид-деполимеразы. Для деполимераз бактериофагов vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_PMM-G3 не было выявлено гомологии с ранее описанными в литературе бактериофагами, что расширяет теоретическое знание и возможности для создания в будущем терапевтических препаратов полисахарид-деполимераз широкого спектра действия. Три фибриллы бактериофага vB_KpnS_MDA2066 (orf130, orf131 и orf135) показали гомологию с белками фибрилл известной специфичности: KL19, K30/K69 и KN4 соответственно. При этом основные различия находились на N-конце, который кодирует сайты прикрепления фибриллы к другим фаговым белкам, и напротив, высокая степень гомологии наблюдалась в области предсказанного ферментативного домена и C-конца, который отвечает за распознавание субстрата [27] (табл. 2). Стоит отметить также, что в тестируемой коллекции клинических изолятов *K. pneumoniae* не было образцов с капсульным типом K30/K69, а для определения типа KN4 необходимо использовать другую схему типирования.

Спектр литической активности исследуемых фагов был ограничен четырьмя капсульными типами. Несмотря на то что представленность штаммов с KL19, KL28, KL45 и KL107 в тестируемой коллекции невелика (11,7%),

изоляты с данными капсульными типами ассоциированы с нозокомиальными инфекциями, устойчивыми к широкому спектру антибиотиков, в том числе колистину [28]. Кроме того, два фага продемонстрировавшие активность против штаммов с KL19 (vB_KpnS_MAG26fr и vB_KpnS_MDA2066) несли различные по типу домены полисахарид-деполимераз, что потенциально способно уменьшить частоту образования мутантов при их совместном использовании.

Для увеличения эффективности терапии при создании терапевтических препаратов, как правило, несколько бактериофагов, имеющих различный литический профиль, объединяют в фаговый коктейль. На сегодняшний день к подобным коктейлям предъявляются следующие требования: титр входящих в них бактериофагов не должен быть ниже 10^8 БОЕ/мл, бактериофаги должны иметь строго вирулентную природу и не содержать потенциально опасных генов, бактериофаги должны эффективно лизировать возбудителей инфекционного процесса [29, 30]. Таким образом, объединение описанных фагов с другими капсулоспецифичными бактериофагами потенциально способно увеличить эффективность терапевтических коктейлей до 100%.

ВЫВОДЫ

Исследованные бактериофаги vB_KpnM_NDO71, vB_KpnS_MAG26fr, vB_KpnS_MDA2066 и vB_KpnS_PMM-G3 относятся к новым видам внутри охарактеризованных семейств и подсемейств и являются перспективными кандидатами для получения эффективных фаговых коктейлей. В свою очередь предсказанные деполимеразы, активные в отношении редких капсульных типов KL19, KL28, KL45 и KL107, могут быть предметом дальнейшего изучения в качестве потенциальных терапевтических агентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов благодарит заведующего лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии к.б.н. Н. В. Воложанцева за предоставленные штаммы.

Литература

1. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016; 80 (3): 629–61.
2. Touati A, Mairi A, Baloul Y, Lalaoui R, Bakour S, Thighilt L et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria *J Glob Antimicrob Resist.* 2017; 9: 17–18.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11(4): 589–603.
4. Сухорукова, М. В., Эйдельштейн, М. В., Иванчик, Н. В., Склеенова, 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.
5. Кузьменков, А. Ю., Виноградова, А. Г., Трушин, И. В., Эйдельштейн, М. В., Авраменко, А. А., Дехнич А.В. и др. AMRmap — система мониторинга антибиотикорезистентности в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2021; 23(2): 198–204.
6. 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.
7. 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): 459–463.
8. Clókier MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage.* 2011; 1 (1): 31.
9. D'Herelle MF. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Acad des Sci Paris.* 1917; 165: 373–5.
10. Khatami A, Lin RC, Petrovic-Fabijan A, Alkalay-Oren S, Almuzam S, Britton PN et al. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child. *EMBO Mol Med.* 2021; 13 (9): e13936.
11. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonia I,

- Rigvava S et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 2021; 21 (3): 427–36.
12. Petrovic Fabijan A, Lin RC, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
 13. Verbeke G, Pirnay JP. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol*. 2022; 52 (November): 24–29.
 14. 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.
 15. Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ, Abedon ST. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: In vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics*. 2021; 10 (12): 1–36.
 16. Kornienko M, Ilina E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Falova O, Sukhikh G et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 99–105.
 17. 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.
 18. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol. Biol. Humana Press*. 2009; 501: 77–80.
 19. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012; 1890 p.
 20. 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.
 21. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res*. 2009; 37 (SUPPL. 1): 443–7.
 22. Nishimura Y, Yoshida T, Kuronishi M, Uehara H, Ogata H, Goto S. ViPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics*. 2017; 33 (15): 2379–80.
 23. Gorodnichen RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. *Front Microbiol*. 2021; 12: 669618.
 24. Городничев Р. 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): 90–97.
 25. Chen X, Tang Q, Li X, Zheng X, Li P, Li M et al. Isolation, characterization, and genome analysis of bacteriophage P929 that could specifically lyse the KL19 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res*. 2022; 314: 198750.
 26. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses*. 2021; 13 (3): 506.
 27. Squeglia F, Maciejewska B, Łatka A, Ruggiero A, Briers Y, Drulis-Kawa Z et al. Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure*. 2020; 28 (6): 613–24.e4.
 28. Zhao J, Liu C, Liu Y, Zhang Y, Xiong Z, Fan Y et al. Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020; 22: 519–6.
 29. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust*. 2020; 212 (6): 279–85.
 30. Асланов Б. И., Зуева Л. П., Кафтырева Л. А., Бойцов А. Г., Акимкин В. Г., Долгий А. А. и др. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике. Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2014; 54 с.

References

1. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016; 80 (3): 629–61.
2. Touati A, Mairi A, Baloul Y, Lalaoui R, Bakour S, Thighilt L et al. First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaia city, Algeria. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017; 9: 17–18.
3. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11 (4): 589–603.
4. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EY, Ivanchik NV, Shajdullina ER, Azyzov IS et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacterales isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study “MARATHON 2015–2016”. *2019; 21 (2): 147–59.*
5. Kuzmenkov AY, Vinogradova AG, Trushin IV, Eidelstein MV, Avramenko AA, Dehnic AV et al. AMRmap — ANTIBIOTIC RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM IN RUSSIA. *Klinicheskaa Mikrobiologiya i Antimikrobnaa Himioterapiya*, 2021; 23 (2): 198–204.
6. 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.
7. 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.
8. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage*. 2011; 1 (1): 31.
9. D’Herelle MF. On an invisible microbe antagonistic to dysentery bacilli. *Comptes Rendus Acad des Sci Paris*. 1917; 165: 373–5.
10. Khatami A, Lin RC, Petrovic-Fabijan A, Alkalay-Oren S, Almuzam S, Britton PN et al. Bacterial lysis, autophagy and innate immune responses during adjunctive phage therapy in a child. *EMBO Mol Med*. 2021; 13 (9): e13936.
11. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkonka I, Rigvava S et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Infect Dis*. 2021; 21 (3): 427–36.
12. Petrovic Fabijan A, Lin RC, Ho J, Maddocks S, Ben Zakour NL, Iredell JR. Safety of bacteriophage therapy in severe *Staphylococcus aureus* infection. *Nat Microbiol*. 2020; 5 (3): 465–72.
13. Verbeke G, Pirnay JP. European regulatory aspects of phage therapy: magistral phage preparations. *Curr Opin Virol*. 2022; 52 (November): 24–29.
14. 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.
15. Danis-Wlodarczyk KM, Wozniak DJ, Abedon ST. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: In vitro, in vivo and clinical application. *Antibiotics*. 2021; 10 (12): 1–36.
16. Kornienko M, Ilina E, Lubasovskaya L, Pripitnevich T, Falova O, Sukhikh G et al. Analysis of nosocomial *Staphylococcus haemolyticus* by MLST and MALDI-TOF mass spectrometry. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 99–105.
17. 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.
18. Mazzocco A, Waddell TE, Lingohr E, Johnson RP. Enumeration of Bacteriophages by the Direct Plating Plaque Assay. *Methods Mol. Biol. Humana Press*. 2009; 501: 77–80.
19. Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012; 1890 p.
20. 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.
21. Liu B, Pop M. ARDB — Antibiotic resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37 (SUPPL. 1): 443–447.
 22. Nishimura Y, Yoshida T, Kuronishi M, Uehara H, Ogata H, Goto S. VIPTree: the viral proteomic tree server. *Bioinformatics.* 2017; 33 (15): 2379–80.
 23. Gorodnichev RB, Volozhantsev NV, Krasilnikova VM, Bodoev IN, Kornienko MA, Kuptsov NS et al. Novel *Klebsiella pneumoniae* K23-Specific Bacteriophages From Different Families: Similarity of Depolymerases and Their Therapeutic Potential. *Front Microbiol.* 2021; 12: 669618.
 24. 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): 90–97.
 25. Chen X, Tang Q, Li X, Zheng X, Li P, Li M et al. Isolation, characterization, and genome analysis of bacteriophage P929 that could specifically lyse the KL19 capsular type of *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res.* 2022; 314: 198750.
 26. Turner D, Kropinski AM, Adriaenssens EM. A Roadmap for Genome-Based Phage Taxonomy. *Viruses.* 2021; 13 (3): 506.
 27. Squeglia F, Maciejewska B, Łątka A, Ruggiero A, Briers Y, Drulis-Kawa Z et al. Structural and Functional Studies of a *Klebsiella* Phage Capsule Depolymerase Tailspike: Mechanistic Insights into Capsular Degradation. *Structure.* 2020; 28 (6): 613–624.e4.
 28. Zhao J, Liu C, Liu Y, Zhang Y, Xiong Z, Fan Y et al. Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 22: 519–6.
 29. Petrovic Fabijan A, Khalid A, Maddocks S, Ho J, Gilbey T, Sandaradura I et al. Phage therapy for severe bacterial infections: a narrative review. *Med J Aust.* 2020; 212 (6): 279–5.
 30. Aslanov BI, Zueva LP, Kaftyreva LA, Bojcov AG, Akimkin VG, Dolgij AA et al. Racional'noe primeneniye bakteriofagov v lechebnoj i protivoepidemicheskoy praktike. *Izd-vo «Remedium Privolzh'e»;* 2014; 54 c.