Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet
2025, vol. 15, no. 5, pp. 983–987

Инфекция и иммунитет
2025, Т. 15, № 5, с. 983–987

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГИПЕРМУКОИДНЫХ КЛЕБСИЕЛЛ

М.Г. Биканова[1], Ю.В. Захарова[1], А.С. Сухих[2]

[1] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия*
[2] *ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет Минобрнауки России, г. Кемерово, Россия*

Резюме. Различные виды спектрометрии (времяпролетная масс-спектрометрия, рамановская спектрометрия) находят применение в идентификации штаммов. Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС) позволяет оценить элементный состав образцов, что также можно использовать в лабораторной практике, так как состав бактериальных клеток с разными биологическими свойствами уникален. Цель исследования: определить особенности элементного состава гипермукоидных *Klebsiella pneumoniae* для выявления АЭС-маркеров перспективных в дифференциации разных субпопуляций клебсиелл. *Материалы и методы.* Исследован элементный состав 30 штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из мокроты пациентов отделения реанимации. Все штаммы клебсиелл выделены из мокроты в этиологически значимых количествах с последующей идентификацией в полимеразной цепной реакции по конечной точке и использованием коммерческой тест системы «РеалБест ДНК Klebsiella pneumoniae/Pseudomonas aeruginosa (комплект 1) (АО «Вектор Бест», Россия). Дизайн исследования — одномоментное с формированием 2 групп *K. pneumoniae*: гипермукоидных (n = 12) и классических (n = 18). Гипермукоидный фенотип у штаммов определяли в «string»-тесте. Содержание элементов изучали на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой ISP-AES 9820 (Shimadzu, Япония) с предварительной автоматизированной пробоподготовкой образцов на TOPEX+ (PreeKem Ltd, КНР). Данные представлены в процентах по массе с 95% доверительным интервалом. Для сравнения относительных чисел использовали критерий χ^2. Различия считали достоверно значимыми при $p < 0,05$. *Результаты.* У клебсиелл с гипермукоидным фенотипом колоний массовая доля никеля в 7,5 раз ($\chi^2_{(1)} = 14,8$, $p = 0,0001$), марганца в 4 раза ($\chi^2_{(1)} = 8,475$, $p = 0,0036$), железа в 2,6 раз ($\chi^2_{(1)} = 10,25$, $p = 0,0014$), калия в 2 раза ($\chi^2_{(1)} = 67,39$, $p = 0,0001$), серы в 1,5 ($\chi^2_{(1)} = 33,27$, $p = 0,0001$), меди в 1,4 раза ($\chi^2_{(1)} = 4,784$, $p = 0,03$) выше, чем у классических штаммов. Выявленные особенности элементного состава косвенно свидетельствуют об особенностях физиологии этой субпопуляции клебсиелл. *Заключение.* АЭС с индуктивно связанной плазмой позволила выявить особенности элементного состава слизеобразующих *K. pneumoniae*, что делает этот метод перспективным для дифференциации «классических» и «гипермукоидных» субпопуляций клебсиелл. В качестве АЭС-маркеров перспективными являются никель, марганец и железо.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae, спектрометрия, элементный состав, классический фенотип, гипермукоидный фенотип, дифференциация.*

Адрес для переписки:
Биканова Мария Гусмановна
650029, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, 22А,
ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет.
Тел.: 8 (3842) 73-28-71.
E-mail: bmg1321@mail.ru

Contacts:
Mariya G. Bikanova
650029, Russian Federation, Kemerovo, Voroshilov str., 22A,
Kemerovo State Medical University.
Phone: +7 (3842) 73-28-71.
E-mail: bmg1321@mail.ru

Для цитирования:
Биканова М.Г., Захарова Ю.В., Сухих А.С. Оценка возможности использования атомно-эмиссионной спектрометрии для дифференциации гипермукоидных клебсиелл // Инфекция и иммунитет. 2025. Т. 15, № 5. С. 983–987. doi: 10.15789/2220-7619-AAP-18002

Citation:
Bikanova M.G., Zakharova Yu.V., Sukhikh A.S. Assessing a possibility of using atomic emission spectrometry for hypermucoid Klebsiella differentiation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2025, vol. 15, no. 5, pp. 983–987. doi: 10.15789/2220-7619-AAP-18002

© Биканова М.Г., Захарова Ю.В., Сухих А.С., 2025

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-AAP-18002

Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution 4.0
The article can be used under the Creative Commons Attribution 4.0 License

ASSESSING A POSSIBILITY OF USING ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY FOR HYPERMUCOID KLEBSIELLA DIFFERENTIATION

Bikanova M.G.[a], Zakharova Yu.V.[a], Sukhikh A.S.[b]

[a] *Kemerovo State Medical University of Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation*
[b] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract. Various spectrometry (time-of-flight mass spectrometry, Raman spectrometry) types are used in the identification of microbial strains. Atomic emission spectrometry allows for the evaluation of the elemental sample composition, which can also be used in laboratory practice, because bacterial cells with different biological properties exert unique composition. The aim of the study was to determine the elemental composition of hypermucoid *Klebsiella pneumoniae* in order to identify AES-markers promising for differentiating various *Klebsiella* subpopulations. *Materials and methods.* The elemental composition of 30 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the sputum of intensive care unit patients was studied. All Klebsiella strains were isolated from sputum in etiologically significant quantities, followed by verification with "RealBest DNA Klebsiella pneumoniae/Pseudomonas aeruginosa (kit 1)" commercial test system (Vector Best, Russia). The study design was presented as a one-time study: group 1 — hypermucoid *K. pneumoniae* (n = 12), group 2 — classic *K. pneumoniae* (n = 18). The hypermucoid phenotype of the strains was determined using the string test. The content of elements was studied using an AES-ISP 9820 atomic emission spectrometer with inductively coupled plasma (Shimadzu, Japan), pre-automated sample preparation using a TOPEX+ (PreeKem Ltd, China). The data are presented as percentages by mass with a 95% confidence interval. The χ^2 test was used to compare the relative numbers. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. *Results.* In *Klebsiella* with hypermucoid colony phenotype, the elemental mass fraction was found as follows: nickel — 7.5 times ($\chi^2_{(1)} = 14.8$, $p = 0.0001$), manganese — 4 times ($\chi^2_{(1)} = 8.475$, $p = 0.0036$), iron — 2.6 times ($\chi^2_{(1)} = 10.25$, $p = 0.0014$), potassium — 2 times ($\chi^2_{(1)} = 67.39$, $p = 0.0001$), sulfur — 1.5 times ($\chi^2_{(1)} = 33.27$, $p = 0.0001$), copper — 1.4 times ($\chi^2_{(1)} = 4.784$, $p = 0.03$) higher than that of classical strains. The identified features of the elemental composition indirectly evidence about physiological characteristics of this *Klebsiella* subpopulation. *Conclusion.* Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy allowed to identify the elemental composition of slime-forming *K. pneumoniae*, which makes this method promising for differentiating between "classic" and "hypermucoid" *Klebsiella* subpopulations. Nickel, manganese, and iron may be considered promising AES-markers.

Key words: *Klebsiella pneumoniae, spectrometry, elemental composition, classic phenotype, hypermucoid phenotype, differentiation.*

Введение

Клебсиеллезные инфекции продолжают оставаться серьезной проблемой здравоохранения, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии (орит) [2, 3, 4]. По данным российского многоцентрового исследования «Эмми» на долю *K. pneumoniae*, выделяемых из различных биолокусов пациентов ОРИТ, приходится 35,48%, при этом мультирезистентность этих возбудителей достигает 75% [1]. В связи с широким разнообразием штаммов клебсиелл [3, 7] продолжает совершенствоваться лабораторная диагностика клебсиеллезных инфекций, направленная на ускорение получения результатов с целью определения стратегии лечения конкретного пациента, в зависимости от биологических свойств возбудителя.

Перспективными и высокоспецифичными методами являются различные виды спектрометрии. В практике уже активно используется времяпролетная масс-спектрометрия (matrix-assisted lazer desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry; MALDI-ToF), активно разрабатывается и внедряется рамановская спектроскопия комбинационного рассеяния. При этом частотные характеристики штаммов высокоспецифичны, что позволяет использовать эти методы для идентификации бактерий. Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИСП) — еще один вид спектрометрии, который часто используется в фармакологии для идентификации и количественного определения элементов в лекарственных средствах[1]. Бактериальная клетка содержит большое количество элементов, необходимых для жизнедеятельности. Часть из них участвуют в формировании органоидов бактерий, другие элементы являются кофакторами ферментных систем, определяющих адаптационный потенциал микроорганизмов: трофические особенности [8], вирулентность [5, 6], резистентность к антимикробным препаратам и к факторам иммунной системы человека [9]. В связи с недостаточностью данных о связи элементного состава и биологических свойств клебсиелл, проведено поисковое исследование, направленное на оценку возможности использования метода АЭС-ИСП в лабораторной диагностике клебсиеллезных инфекций.

[1] ОФС.1.2.1.1.0017. Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации. 11 с.

Цель исследования: определить особенности элементного состава гипермукоидных *Klebsiella pneumoniae* для выявления АЭС-маркеров, перспективных в дифференциации разных субпопуляций клебсиелл.

Материалы и методы

Проведено исследование элементного состава 30 клинических штаммов *K. pneumoniae*, выделенных из мокроты пациентов отделения реанимации ГАУЗ «Кузбасская клиническая больница скорой медицинской помощи имени М.А. Подгорбунского». Дизайн исследования — одномоментное, с формированием 2 групп *K. pneumoniae*: гипермукоидные (hmKp) (n = 12) и классические (cKp) (n = 18).

Все штаммы клебсиелл выделяли из мокроты пациентов в этиологически значимых количествах с последующей идентификацией в полимеразной цепной реакции по конечной точке и использованием коммерческой тест-системы «РеалБест ДНК Klebsiella pneumoniae/Pseudomonas aeruginosa (комплект 1)» (АО «Вектор-Бест», Россия). Гипермукоидный фенотип у штаммов, определяли, используя «string»-тест — длина тянущейся за бактериологической петлей нити от колонии на кровяном агаре составляла не менее 5 мм.

Для АЭС-ИСП использовали суточные культуры *K. pneumoniae*, из которых готовили взвесь на воде деионизированной мутностью 0,5 ед. Макфарленда. Для анализа использовали навеску массой 0,2 мг, которую доводили до объема 4 мл концентрированной азотной кислотой квалификации (superpure) cas 7697-37-2 и проводили автоматическую минерализацию в течение 2 мин при 160°C с помощью станции пробоподготовки «Topex+» (Preekem Ltd., KHP).

Содержание элементов в бактериальных образцах определяли на атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно связанной плазмой ICP-AES 9820 (Shimadzu, Япония). В качестве контроля использовали 2% пептонную воду, в качестве стандарта — «Мультиэлементный стандарт 23 элементов, 1000 мг/л» (Merck KGaA, Германия). Обработку результатов вели с использованием ПО ICPE-9820, version 1.11. С расчетом содержания отдельных элементов в бактериальных клетках в процентах по массе.

Для статистической обработки результатов использовали программу IBM SPSS Statistics («IBM/predictive solutions»). Нормальность распределения данных определяли графически. Данные, полученные на несвязанных совокупностях, отличались от нормального распределения, в работе они представлены в процентах по массе с 95% доверительным интервалом. Для сравнения данных использовали критерий χ^2. Различия считали достоверно значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

В бактериальных образцах было обнаружено 18 химических элементов. Установлено, что общая масса элементов у hmKp составила 1236,137 мкг, у штаммов с классическим фенотипом колоний — 2598,575 мкг. Макроэлементы у hmKp и cKp были представлены серой, натрием, калием, фосфором, кальцием, медью. На них приходилось более 80% по массе всего элементного состава бактериальных образцов (табл. 1).

Массовая доля никеля, марганца, молибдена, ванадия, кобальта, кремния, цинка и селена у слизеобразующих штаммов была меньше 1% для каждого из элементов, у cKp к этому перечню были еще отнесены железо и алюминий. Содержание от 1 до 3% по массе у hmKp отмечали для хрома, магния, железа и алюминия. В минерализованных образцах hmKp, по сравнению с cKp, получены достоверно более высокие показатели массовых долей таких химических элементов, как сера ($p = 0,0001$), калий ($p = 0,0001$), медь ($p = 0,03$), хром ($p = 0,0009$), железо ($p = 0,0014$), никель ($p = 0,0001$), марганец ($p = 0,0036$) (табл.).

Обсуждение

По результатам АЭС-ИСП установлено, что у hmKp отмечается достоверно более высокая массовая доля серы, чем у cKp. Это может с одной стороны отражать более высокое содержание белков у слизеобразующих штаммов, с дугой стороны свидетельствовать о более интенсивных процессах синтеза пирувата, как источника питания, под воздействием цистеиндесульфгидразы — специфического серосодержащего фермента *K. pneumoniae*. Также у hmKp отмечается достоверно высокая массовая доля железа, по сравнению с cKp. Железо входит в состав ферментов цитохромов, железо-серопротеидов и фермента антиоксидантной системы — каталазы. Но очень часто содержание железа ассоциируют с вирулентностью микроорганизмов [6]. У *K. pneumoniae* железо регулирует промотор хромосомных фимбрий 3 типа и образование биопленок [5].

У hmKp массовая доля марганца была в 4 раза выше, чем у cKp. Марганец обеспечивает активность дегидрогеназ и декарбоксилаз — основных ферментов цикла трикарбоновых кислот [8]. Калий у hmKp также имел высокую массовую долю. Известно, что калий выступает в качестве катализатора гидролиза АТФ. Немаловажную роль для микроорганизмов играет медь, которая связана с ферментами дыхания — цитохромоксидазами и оксигеназами. Содержание меди у гипермукоидных штаммов было в 1,4 раза выше, чем у cKp.

Таблица. Содержание элементов (в процентах по массе) у *Klebsiella pneumoniae* с гипермукоидным и классическим фенотипом колоний

Table. Elemental content (in percent by weight) in *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoid and classical colony phenotypes

Элемент Element	**hmKp, %**	**cKp, %**	**95% ДИ** 95% CI	$\chi^2_{(1)}$	**p**
S	25,45	17,47	5,19–10,9	33,27	0,0001
Na	18,2	42,0	20,7–26,6	210,4	0,0001
K	17,89	8,98	5,70–8,40	67,39	0,0001
P	16,68	17,2	0–2,96	0,137	0,71
Cu	6,57	4,86	0,17–3,41	4,784	0,03
Ca	3,86	2,82	0–2,39	2,964	0,09
Cr	2,61	1,16	0,55–2,55	10,99	0,0009
Mg	2,25	1,98	0–1,36	0,302	0,58
Fe	1,82	0,69	0,4–2,07	10,25	0,0014
Al	1,17	0,80	0–1,19	1,259	0,26
Ni	0,97	0,13	0,37–1,56	14,80	0,0001
Mn	0,84	0,20	0,18–1,33	8,475	0,0036
Mo	0,73	0,47	0–0,94	1,028	0,3102
V	0,33	0,26	0–0,59	0,146	0,7
Co	0,23	0,23	0–0,31	0,000	1,0
Si	0,22	0,21	0–0,48	0,004	0,95
Zn	0,16	0,16	0–0,27	0,000	1,0
Se	0,03	0,04	0–0,19	0,023	0,88

Никель у клебсиелл ассоциирован с ферментом уреазой, которая используется бактериями для получения азота из мочевины и в некоторых случаях рассматривается как фактор вирулентности. Никеля у hmKp было в 7,5 раза выше в процентах по массе, чем у cKp. Таким образом, у штаммов клебсиелл, обладающих способностью к слизеобразованию установлены особенности состава и перспективные маркерные элементы, косвенно свидетельствующие об особенностях физиологии возбудителей — активном катаболизме углеводов и синтезе большого количества энергии. Полученные результаты раскрывают перспективы дальнейшей работы по определению референсных значений содержания маркерных элементов у клебсиелл с разными биологическими свойствами.

Заключение

У *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом колоний массовая доля никеля в 7,5 раз (p = 0,0001), марганца в 4 раза (p = 0,0036), железа в 2,6 раз (p = 0,0014), калия в 2 раза (p = 0,0001), серы в 1,5 (p = 0,0001), меди в 1,4 раза (p = 0,03) выше, чем у классических штаммов, что делает перспективными названные элементы для дифференциальной диагностики слизеобразующих штаммов с помощью АЭС-ИСП.

Список литературы/References

1. Полибин Р.В., Брусина Е.Б., Ковалишена О.В., Глушков Е.В., Гридина А.А., Асланов Б.И., Брико Н.И. Эпидемиологическое межрегиональное многоцентровое исследование инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ЭММИ). Первые результаты // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2025. Т. 24, № 1. С. 4–9. [Polibin R.V., Brusina E.B., Kovalishena O.V., Glushkova E.V., Gridina A.A., Aslanov B.I., Briko N.I. Epidemiological Interregional Multicenter Study of Healthcare-Associated Infections in the Intensive Care Units. First Results. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis, 2025, vol. 24, no. 1. pp. 4–9. (In Russ.)*] *doi: 10.31631/2073-3046-2025-24-1-4-9*
2. Садовников Е.Е., Поцелуев Н.Ю., Барбараш О.Л., Брусина Е.Б. Эпидемиологические особенности инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в кардиохирургии // Фундаментальная и клиническая медицина. 2023. Т. 8, № 4. С. 73–84. [Sadovnikov E.E., Potseluev N.Yu., Barbarash O.L., Brusina E.B. Healthcare-associated infections in cardiac surgery: epidemiological features. *Fundamentalnaya i klinicheskaya meditsina = Fundamental and Clinical Medicine, 2023, vol. 8, no. 4, pp. 73–84. (In Russ.)*] *doi: 10.23946/2500-0764-2023-8-4-73-84*
3. Самойлова А.А., Краева Л.А., Михайлов Н.В., Саитова А.Т., Полев Д.Е., Вашукова М.А., Гордеева С.А., Смирнова Е.В., Белятич Л.И., Долгова А.С., Шабалина А.В. Геномный анализ вирулентности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae* // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 339–350. [Samoilova A.A., Kraeva L.A., Mikhailov N.V., Saitova A.T., Polev D.E., Vashukova M.A., Gordeeva S.A., Smirnova E.V., Beljatich L.I., Dolgova A.S., Shabalina A.V. Genomic

analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains virulence and antibiotic resistance. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 339–350. (In Russ.)*] *doi: 10.15789/2220-7619-GAO-15645*

4. Chen J., Li J., Huang F., Fang J., Cao Y., Zhang K., Zhou H., Cai J., Cui W., Chen Ch., Zhang G. Clinical characteristics, risk factors and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* pneumonia developing secondary *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection. *BMC Pulm. Med., 2023, vol. 23, no. 1: 102. doi: 10.1186/s12890-023-02394-8*
5. Chu W.H.W., Tan Y.H., Chen Y., Yong M., Lye D.C., Kalimuddin Sh., Archuleta S., Gan Y.-H. Acquisition of regulator on virulence plasmid of hypervirulent Klebsiella allows bacterial lifestyle switch in response to iron. *mBio, 2023, vol. 14, no. 4: e0129723. doi: 10.1128/mbio.01297-23*
6. German N., Lüthje F., Hao X., Ronn R., Rensing C. Microbial virulence and interactions with metals. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 2016, vol. 142, pp. 27–49. doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.05.010*
7. Kijineh B., Alemeyhu T., Mengistu M., Mohammed Ali M. Prevalence of phenotypic multi-drug resistant Klebsiella species recovered from different human specimens in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One, 2024, vol. 19, no. 2: e0297407. doi: 10.1371/journal.pone.0297407*
8. Orzel B., Pelucelli A., Ostrowska M., Potocki S., Kozlowski H., Peana M., Gumienna-Kontecka E. Fe(II), Mn(II), and Zn(II) binding to the C-terminal region of FeoB protein: an insight into the coordination chemistry and specificity of the Escherichia coli Fe(II) transporter. *Inorg. Chem., 2023, vol. 62, no. 45, pp. 18607–18624. doi: 10.1021/acs.inorgchem.3c02910*
9. Tiwari V., Sharma A., Braga R., Garcia E., Appiah R., Fleeman R., Abuaita B.N., Patrauchan M., Doerrler W.T. *Klebsiella pneumoniae* DedA family proteins have redundant roles in divalent cation homeostasis and resistance to phagocytosis. *Microbiol. Spectr., 2024, vol. 12, no. 2: e0380723. doi: 10.1128/spectrum.03807-23*

Авторы:

Биканова М.Г., старший преподаватель кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Захарова Ю.В., д.м.н., доцент, профессор кафедры микробиологии и вирусологии ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Кемерово, Россия;

Сухих А.С., к.фарм.н., доцент, зав. лабораторией физико-химических исследований фармакологически активных и природных соединений Медицинского института ФГБОУ ВО Кемеровский государственный университет Минобрнауки России, г. Кемерово, Россия.

Authors:

Bikanova M.G., Senior Lecturer, Department of Microbiology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Zakharova Yu.V., DSc (Medicine), Associate Professor, Professor of the Department of Microbiology and Virology, Kemerovo State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kemerovo, Russian Federation;

Sukhikh A.S., PhD (Pharmacy), Associate Professor, Head of the Laboratory of Physical and Chemical Research of Pharmacologically Active and Natural Compounds, Medical Institute, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation.

Поступила в редакцию 05.09.2025
Принята к печати 27.09.2025

Received 05.09.2025
Accepted 27.09.2025