

Дифференциальная диагностика морфологических форм бактерий рода *Klebsiella pneumoniae* в осадке мочи методом световой микроскопии

В. С. Демидова, Л. Г. Алхимова, М. А. Демченко, Р. П. Терехова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России
Россия, 117997, Москва, ул. Большая Серпуховская, д. 27

Контактное лицо: Валентина Семеновна Демидова, demidova@ixv.ru

В статье представлен опыт дифференциальной диагностики морфологических форм бактерий вида *Klebsiella pneumoniae* при световой микроскопии в осадке мочи у хирургических пациентов ожогового отделения, в терапии которых используют β -лактамы в субингибирующих концентрациях. Материалом для исследования служила моча пациентов Ожогового отделения Центра. Общеклинический анализ мочи проводили методом «сухой химии» с использованием тест-полосок, на мочевого полуавтоматическом анализаторе LabUReader Plus2, Венгрия. Бактериологическое (культуральное) исследование проводили методом посева мочи на микрофлору и чувствительность к антибиотикам на питательные среды. Микроскопическое исследование осадка мочи выполняли методом оптической световой микроскопии на бинокулярном микроскопе со светодиодной подсветкой MICROS MS100(XP), Австрия.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, энтеробактерии, ESKAPE, анитибиотикорезистентность, β -лактамы антибиотики, субингибирующие концентрации, оптическая световая микроскопия, внутрибольничная инфекция, устойчивость к антибиотикам.

Для цитирования: Демидова В. С., Алхимова Л. Г., Демченко М. А., Терехова Р. П. Дифференциальная диагностика морфологических форм бактерий рода *Klebsiella pneumoniae* в осадке мочи методом световой микроскопии. Раны и раневые инфекции. Журнал им. проф. Б. М. Костюченка. 2026; 13 (1): 32–38.

DOI: 10.25199/2408-9613-2026-13-1-32-38.

cc by 4.0

Differential diagnostics of morphological forms of *Klebsiella pneumoniae* in urine sediment by light microscopy

V. S. Demidova, L. G. Alkhimova, M. A. Demchenko, R. P. Terekhova

A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery
27 Bolshaya Serpukhovskaya Str., Moscow, 117997, Russia

The article presents the experience of differential diagnosis of morphological forms of *Klebsiella pneumoniae* by light microscopy in urine sediment from surgical patients of the burn department, whose therapy uses beta-lactam antibiotics in sub-inhibitory concentrations. The urine of patients from the Burn Department of the Center served as the material for the study. General clinical urine analysis was performed using the "dry chemistry" method using test strips on a LabUReader Plus2 urinary semi-automatic analyzer, Hungary. A bacteriological (cultural) study was performed by seeding urine for microflora and antibiotic sensitivity. Microscopic examination of urine sediment was performed by optical light microscopy on a binocular microscope with LED illumination MICROS MS100(XP), Austria. This publication may be of interest to doctors of various specialties, as well as to novice specialists in clinical laboratory diagnostics involved in the study of urine sediment using optical microscopy.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, enterobacteria, ESKAPE, antibiotic resistance, beta-lactam antibiotics, sub-inhibitory concentrations, optical light microscopy, nosocomial infection, antibiotic resistance.

For citation: Demidova V. S., Alkhimova L. G., Demchenko M. A., Terekhova R. P. Differential diagnostics of morphological forms of *Klebsiella pneumoniae* in urine sediment by light microscopy. Wounds and wound infections. The Prof. B. M. Kostyuchenok Journal. 2026; 13 (1): 32–38.

Введение

В 1882 г. немецкий микробиолог Карл Фридендер дал описание новому виду бактерии, которую выделил из легочной ткани больных, умерших от пневмонии.

В 1886 г. возбудитель получил название *Klebsiella pneumoniae*, до этого времени микроорганизм назывался бацилла Фридендера [1].

Клебсиеллы – это условно патогенные неподвижные, факультативно-анаэробные бактерии, имеющие форму коротких толстых эллипсоидных грамотрицательных палочек, не образующих спор, размером 0,6–6,0 мкм. Располагаются они либо одиночно, либо собраны в короткие цепи. Род *Klebsiella* относится к семейству *Enterobacteriaceae*, включает 4 вида: *K. terrigena*, *K. oxytoca*, *K. planticola*, *K. Pneumoniae* [2], последний имеет наибольшее клинико-эпидемиологическое значение. В среднем 1–6 % населения являются носителями *K. pneumoniae*, локализованной в носоглотке и 5–38 % – носители *K. pneumoniae* в кишечнике [3]. Таким образом, здоровые носители могут стать источником инфекции, передаваемой воздушно-капельным и контактно-бытовым путями, кроме того, повышается риск инфицирования их собственной микробиотой [4].

В последние десятилетия бактерия вида *K. pneumoniae* стала одной из основных причин внебольничных и внутрибольничных инфекций во всем мире [5]. Высокая способность *K. pneumoniae* образовывать биопленки [6] и, как следствие, колонизировать медицинское оборудование и устройства является основным фактором распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Множественная лекарственная устойчивость *K. pneumoniae* серьезно затрудняет антибактериальную терапию. В условиях длительного пребывания пациентов в

отделениях интенсивной терапии и в стационарах патоген может стать причиной тяжелых гнойно-септических послеоперационных осложнений и инфицирования хирургических ран, а гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* способны вызывать тяжелые заболевания даже у здоровых людей с нормальным иммунитетом. Прогноз нозокомиальных пневмоний, связанных с *K. pneumoniae* неблагоприятный, летальность достигает 50 % [7]. В 2017 г. Всемирной организацией здравоохранения был опубликован список 12 видов бактерий, представляющих угрозу для здоровья человека. Наиболее значимые и опасные гипервирулентные госпитальные патогены, способные уклоняться от антибиотиков и противомикробных препаратов были тогда объединены общим термином ESKAPE [8] (аббревиатура от *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter spp.*). В 2024 г. был обновлен список опасных патогенов, устойчивых к приоритетным и резервным антибактериальным препаратам [карбапенемам (CRE) и цефалоспорином третьего поколения (3GCRE)], – *K. pneumoniae* сохранила лидирующие позиции. В 2022 г. журнал The Lancet (GBD 2019) опубликовал результаты глобального исследования летальных случаев, связанных с лекарственно-устойчивыми инфекциями и сепсисом. Исследование проводили в 2019 г., в него вошли 204 страны мира, в том числе Россия. В результате установлено,

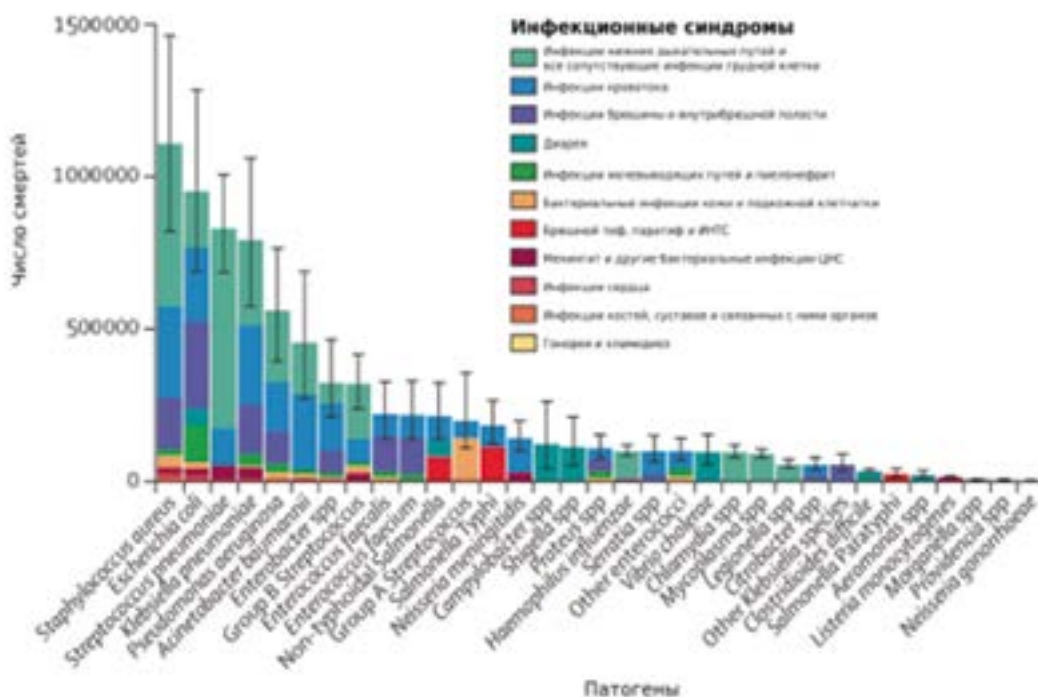


Рис. 1. Глобальное число летальных исходов по патогенам и инфекционным синдромам, 2019 г. [9]
 Fig. 1. Global number of deaths (A) and deaths (B) by pathogens and infectious syndromes, 2019 [9]

что 5 ведущих патогенов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) ответственны за 54,9 % смертей всех исследованных бактериальных инфекций, зарегистрированных в 2019 г. (рис. 1) [9]. Клебсиеллы имеют большой вспомогательный геном плазмид и хромосомных генных локусов, которые делят штаммы *K. pneumoniae* на условно патогенные, гипервирулентные и мультирезистентные [10].

Вирулентность *K. pneumoniae* связывают с наличием у нее многих факторов, способствующих выживанию бактерии и уклонению от иммунного ответа хозяина (рис. 2) [11].

Полисахаридная капсула является физическим барьером, обеспечивает устойчивость патогена во внешней среде и способствует уклонению от иммунного ответа хозяина и воздействия антибактериальных препаратов. Синтезируемые капсульные полисахариды (CPS) – это мощные медиаторы септического шока и активаторы каскада воспалительных реакций. Они

способны блокировать фагоцитоз. Позволяют бактерии перестроить цитоскелет таким образом, что патоген свободно перемещается внутрь клеток хозяина и обратно. Фимбрии и фимбриальные белки адгезии используются Клебсиеллой для прилипания и колонизации всех поверхностей, в том числе и слизистых оболочек хозяина. На поверхности бактерии есть небольшие молекулы – сидерофоры, они конкурентно захватывают, связывают и транспортируют ионы трехвалентного железа из клетки хозяина в бактерию, способствуя ее росту, укреплению и размножению. Система секреции транслокационных белков типа VI (T6SS) обеспечивает преимущество Клебсиелл в конкуренции среди бактерий микробиома. Данная система также, как и другие факторы вирулентности обеспечивает бактерию устойчивостью к антибиотикам, выведением токсинов в соседние клетки и образованием биопленок. Антибиотикорезистентность *K. pneumoniae* обеспечена двумя основными механизмами [12]. Первый обеспечивает экспрессию

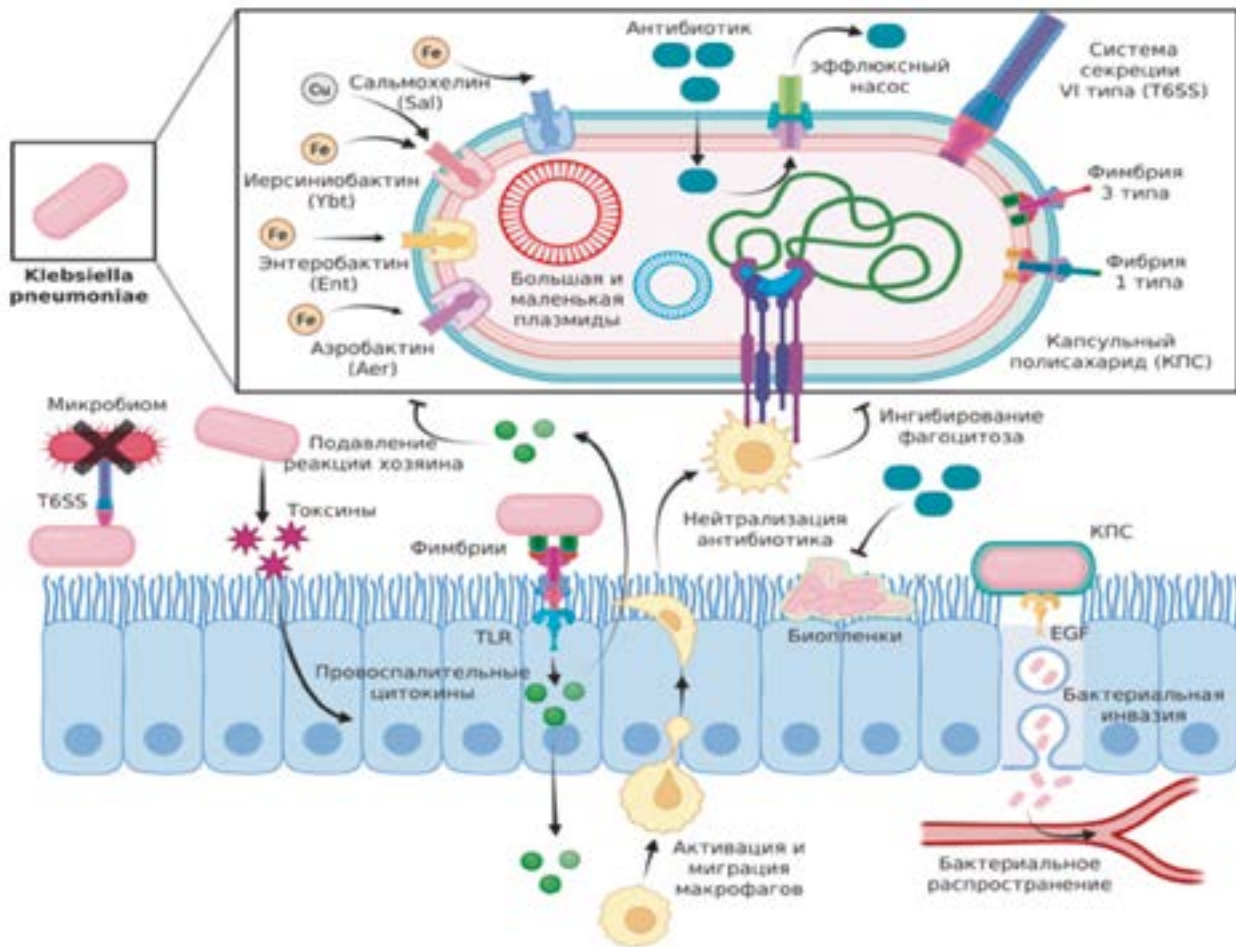


Рис. 2. Факторы вирулентности *K. pneumoniae* [11]
 Fig. 2. *K. pneumoniae* virulence factors [11]

β -лактамаз расширенного спектра, они делают бактерии устойчивыми к цефалоспорином и монобактамам. Вторым механизмом — это экспрессия карбапенемаз, обеспечивающих устойчивость бактерий почти ко всем доступным β -лактамам, включая карбапенемы. Субингибирующие концентрации β -лактаманых антибиотиков вызывают нарушения в правильной сборке пептидогликана клеточной стенки. Вначале тела бактерий удлиняются, становятся похожими на длинные извитые нити, затем утолщаются и на них появляются шарообразные сферопласты. После прекращения антибиотикотерапии аномальные формы бактерий легко возвращаются к исходной к форме коротких толстых палочек дикого типа. Это позволяет предположить, что бактерии способны к реинфекции [13]. Такая особенность *K. pneumoniae* приводит к персистирующему течению инфекционного процесса, осложняя тяжесть и терапию основного заболевания.

Результаты исследования

Современные методы лабораторной диагностики бактериальных инфекций [14] разнообразны. Микробиологический метод позволяет выделить и идентифицировать чистую культуру микроорганизмов. Биологический метод используется для оценки хода инфекционного процесса путем заражения лабораторных животных, иммунологический — выявить специфические антигены или антитела (серологический, аллергологический), посредством молекулярно-генетического определяют ДНК- и РНК-зонды, полимеразную цепную реакцию и др. Микроскопическое исследование позволяет определить форму, размеры микроорганизмов и их способность окрашиваться определенными красителями.

Субингибирующие концентрации β -лактаманых антибиотиков могут приводить к изменению

морфологических форм бактерий рода *K. pneumoniae* и появлению у них нитей и шарообразных сферопластов, делая их схожими с бластоспорами и псевдомицелием дрожжеподобных грибов, эритроцитами, сперматозоидами, слизью, солями. Обычные и измененные морфологические формы энтеробактерий хорошо видны при световой микроскопии биологических жидкостей. В препаратах мочи при $\times 400$ можно обнаружить морфологически измененные формы бактерий, удлиненной нитеобразной извитой формы и/или маленькие круглые сферопласты, схожие с псевдомицелием и бластоспорами дрожжеподобных грибов рода *Candida spp.* (рис. 3). Однако псевдомицелий грибов обладает септированной, ветвящейся, перегородчатой структурой нитей, в то время как бактерии имеют одну или две гладких несептированных нити, отходящих от одной бактериальной клетки.

На первый взгляд, сферопласты бактерий могут быть похожи на эритроциты. Основное различие между ними заключается в наличии у последних нитей различной длины и, в отличие от эритроцитов, сферопласты не имеют характерной двояковогнутой формы (рис. 4).

Тела морфологически измененных бактерий *K. pneumoniae* иногда могут быть схожими со сперматозоидами (рис. 5).

Нитеобразные тела бактерий могут быть ошибочно приняты за тяжи слизи (рис. 6), а сферопласты — за кристаллы мочевых солей, например, кристаллы кислого мочекислотного аммония (рис. 7).

В ходе работы было установлено, что в русскоязычных научно-практических изданиях недостаточно информации по изучению проблемы визуализации и дифференцировки сферопластов в биологическом материале. Так, на портале eLibrary.ru по запросу «сферопласты» найдено всего 78 статей и только 11 статей

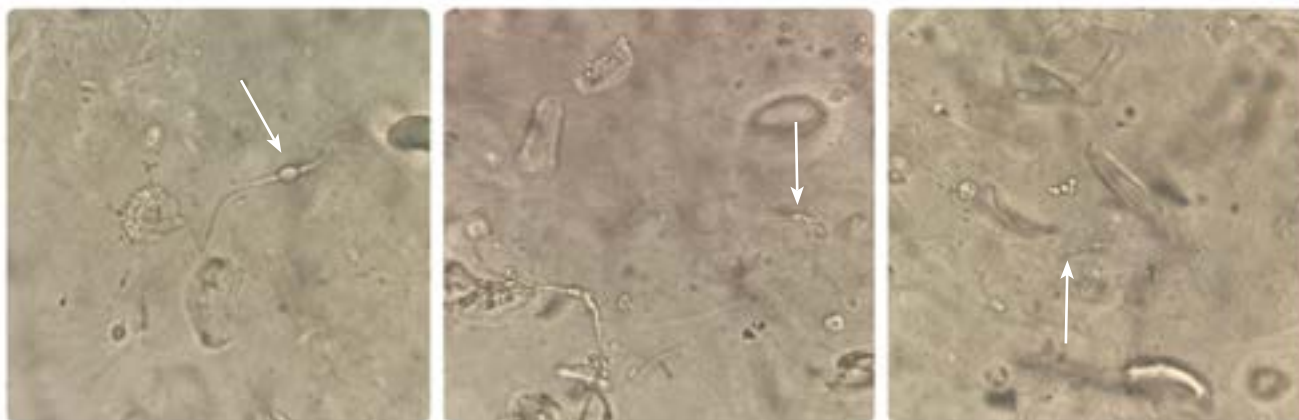


Рис. 3. Сферопласты и бластоспоры, псевдомицелий дрожжеподобного гриба рода *Candida spp.* ($\times 400$). Стрелками указаны сферопласты *K. pneumoniae* ($K. pneumoniae 10^3$ КОЕ/г)

Fig. 3. Spheroplasts and blastospores, pseudomycelia of a yeast-like fungus of the genus *Candida spp.* ($\times 400$). The arrows indicate *K. pneumoniae* ($K. pneumoniae 10^3$ CFU/g)

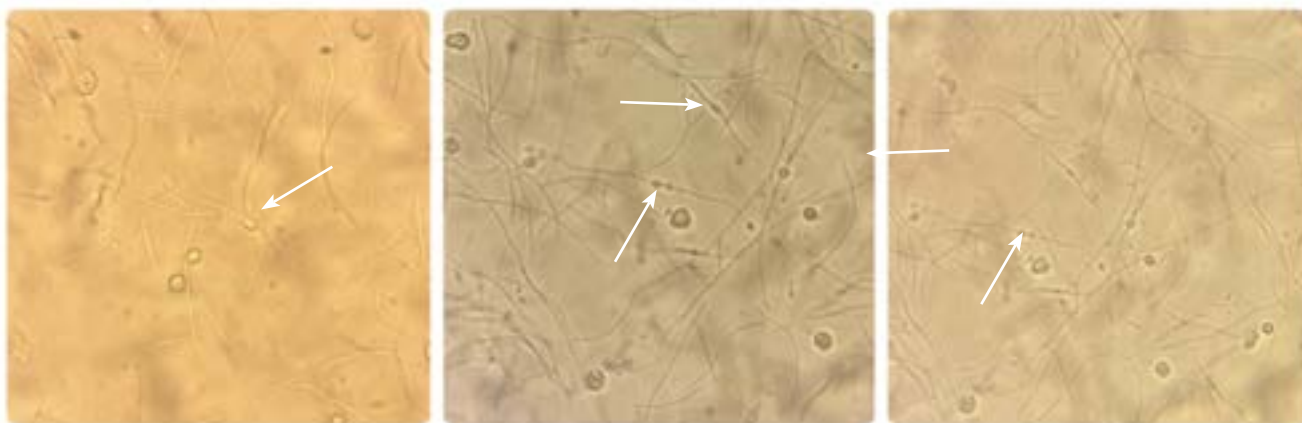


Рис. 4. Сферопласты в осадке мочи пациента с гематурией ($\times 400$). Стрелками указаны сферопласты *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* 10^5 КОЕ/г)
Fig. 3. Spheroplasts in the urine sediment of a patient with hematuria ($\times 400$). The arrows indicate *K. pneumoniae* spheroplasts (*K. pneumoniae* 10^5 CFU/g)

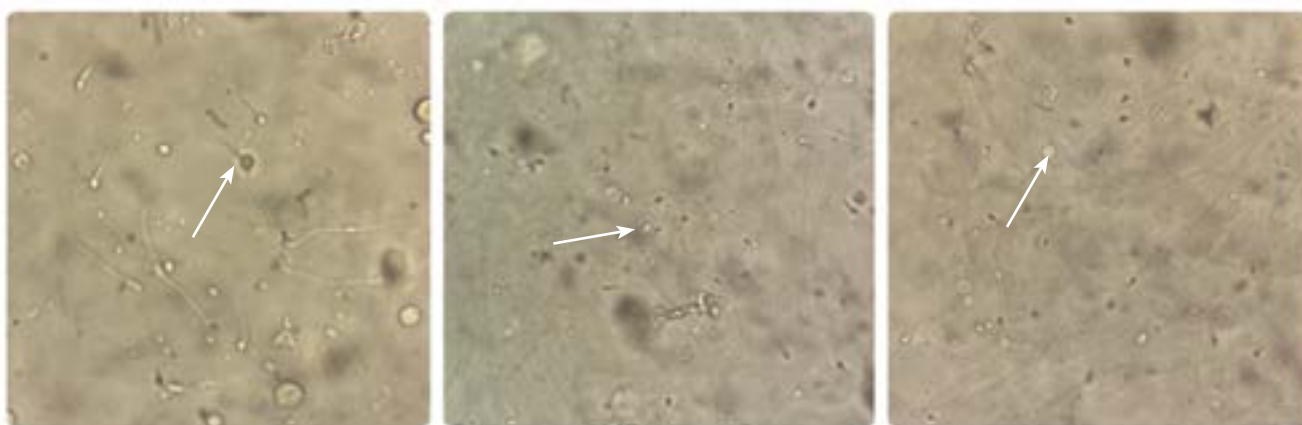


Рис. 5. Сферопласты и сперматозоиды в осадке мочи пациента ($\times 400$). Стрелками указаны сферопласты *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* 10^7 КОЕ/г)
Fig. 5. Spheroplasts and spermatozoa in the patient's urine sediment ($\times 400$). The arrows indicate *K. pneumoniae* spheroplasts (*K. pneumoniae* 10^7 CFU/g)

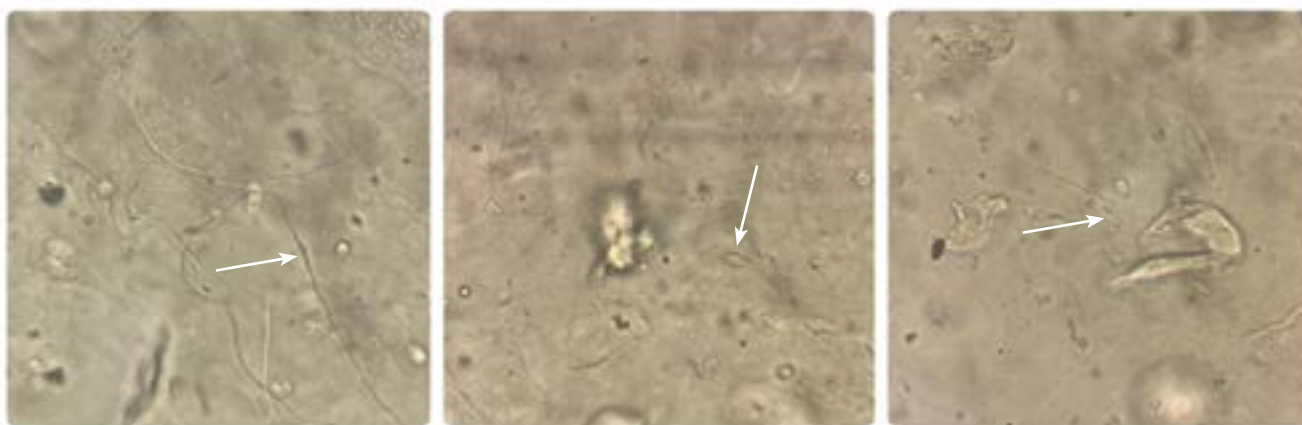


Рис. 6. Сферопласты и слизь в осадке мочи пациента ($\times 400$). Стрелками указаны сферопласты *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* 10^3 КОЕ/г)
Fig. 6. Spheroplasts and mucus in the patient's urine sediment ($\times 400$). The arrows indicate *K. pneumoniae* spheroplasts (*K. pneumoniae* 10^3 CFU/g)

по запросу «сферопласты. Моча». Фотографий сферопластов в российских источниках не обнаружено. В зарубежных публикациях найдены материалы по

исследованию морфологических изменений грамотрицательных бактерий, связанных с субингибирующими концентрациями β -лактамовых антибиотиков.

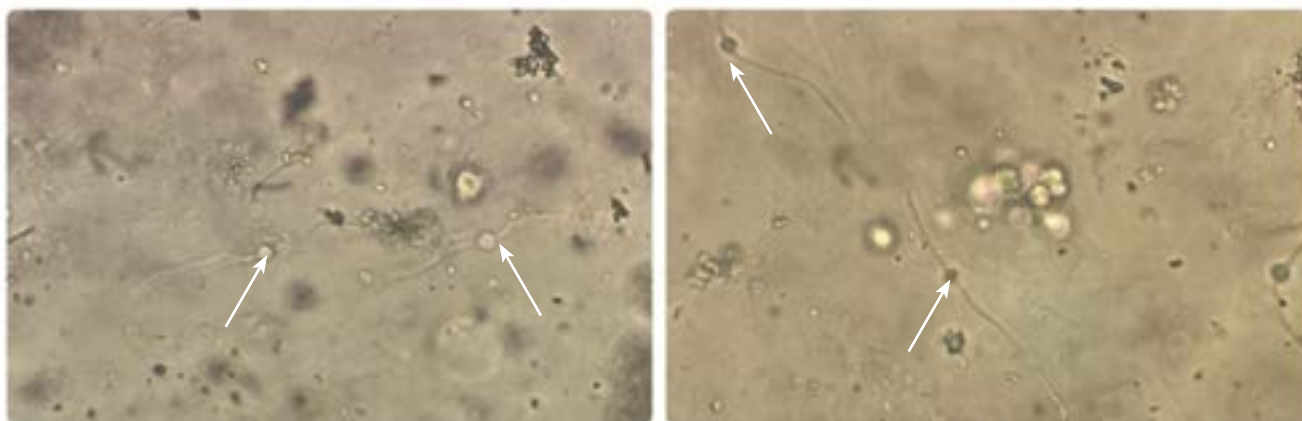


Рис. 7. Сферопласты и кристаллы кислого мочеислого аммония в осадке мочи пациента ($\times 400$). Стрелками указаны сферопласты *K. pneumoniae* (*K. pneumoniae* 10^3 КОЕ/г)

Fig. 7. Spheroplasts and crystals of acidic ammonium uric acid in the patient's urine sediment ($\times 400$). The arrows indicate *K. pneumoniae* spheroplasts (*K. pneumoniae* 10^3 CFU/g)

Именно эти публикации и желание избежать ошибок в диагностике направили нас на диагностический поиск, идентификацию и дифференциальную диагностику морфологически измененных форм бактерий в моче пациентов, длительно пребывающих в стационаре, в частности ожогового отделения. Нами изучены зарубежные публикации, где были проведены исследования морфологии микроорганизмов, связанных с субингибирующими концентрациями β -лактамов антибиотиков [15–17].

К семейству *Enterobacteriaceae* принадлежит *E. coli*, которая, подобно *K. pneumoniae*, способна формировать сферопласты [18].

Заключение

Инфекционные заболевания во всем мире признаны причиной существенной потери здоровья у населения и высокой летальности. В условиях роста антибиотикорезистентности патогены, устойчивые

к противомикробным препаратам, способствуют неэффективной терапии и высокому уровню смертности. Субингибирующие концентрации β -лактамов антибиотиков приводят к изменению морфологических форм энтеробактерий. Они становятся схожими с бластоспорами и псевдомицелием дрожжеподобных грибов рода *Candida spp.*, эритроцитами, сперматозоидами, слизью, солями и могут быть неправильно идентифицированы, даже при наличии в лаборатории автоматических мочевых станций на основе визуализации и количественного определения элементов мочи методом проточной цитометрии. Все сомнительные результаты необходимо исследовать, используя световую микроскопию с подтверждением микробиологическими исследованиями. Специалисты клинических лабораторий участвующие в исследовании биологических жидкостей, в частности осадка мочи, должны уметь распознавать бактерии и их измененные формы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Funding. The study had no sponsorship.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Friedlaender C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin 1882;87(2):319-24.
2. Воробьев А. А. Быков А. С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Медицинское информационное агентство. 2003. – 236с. [Vorob'yov A.A. By'kov A.S. Atlas po medicinskoj mikrobiologii, virusologii i immunologii. – M.: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. 2003. – 236 s.]
3. Ashurst, J. v., Dawson, A. (2022). Klebsiella Pneumonia. StatPearls.
4. Gorrie C.L., Mirceta M., Wick R.R. et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients // Clin Infect Dis. 2017 Jul 15;65(2):208-215. doi: 10.1093/cid/cix270. PMID: 28369261; PMCID: PMC5850561.
5. Wei S., Xu T., Chen Y., Zhou K. Autophagy, cell death, and cytokines in *K. pneumoniae* infection: therapeutic perspectives // Emerg Microbes Infect. 2023 Dec;12(1):2140607. doi:

- 10.1080/22221751.2022.2140607. PMID: 36287114; PMCID: PMC9766508.
6. Guerra, Maria Eduarda Souza, et al. Klebsiella pneumoniae biofilms and their role in disease pathogenesis // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2022. 12 (2022): 877995.
7. Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018. Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004. PMID: 29404282; PMCID: PMC5786545.
8. Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE // *The Journal of infectious diseases*. 2008. 197.8 (2008): 1079-1081.
9. Ikuta, Kevin S., et al. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 // *The Lancet*. 2022. 400.10369 (2022): 2221-2248.
10. Dong, Ning, et al. Klebsiella species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance // *EBioMedicine*. 79 (2022).
11. Luna-Pineda V.M. et al. Plant-Origin Components: New Players to Combat Antibiotic Resistance in Klebsiella pneumoniae // *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(4):2134.
12. Boyd, Natalie K., Chengwen Teng, and Christopher R. Frei. Brief overview of approaches and challenges in new antibiotic development: a focus on drug repurposing // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2021;11: 684515.
13. Cross T., Ranssegnola B., Shin J. et al. Spheroplast-Mediated Carbapenem Tolerance in Gram-Negative Pathogens // *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 63:10.1128/aac.00756-19. <https://doi.org/10.1128/aac.00756-19>.
14. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учебник : в 2 т. / под ред. В. В. Зверева, М. Н. Бойченко. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. - Т. 2. - 480 с. [Medicinskaya mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya : uchebnik : v 2 t. / pod red. V. V. Zvereva, M. N. Bojchenko. - M. : GE'OTAR-Media, 2016. - T. 2. - 480 s.].
15. Falbo R. et al. Spheroplasts, poorly known but clinically relevant particles of urinary sediment // *Clinica Chimica Acta*. 2021. T. 515. c. 13-15.
16. Poloni J. A. T. et al. Klebsiella pneumoniae ESBL forming spheroplasts in the fresh and unstained urine sediment // *Brazilian Journal of Nephrology*. 2016. T. 38. c. 269-270.
17. Suwantarant N., Jacobs M. R. Photo Quiz: Positive Blood Culture in a Patient with Sickle Cell Crisis // *Journal of Clinical Microbiology*. 2013. - T. 51. - №. 8. - с. 2475.
18. Nikler A. et al. Escherichia coli spheroplasts in a Croatian patient misclassified by two urine sediment analysers as erythrocytes: case report // *Biochemia Medica*. 2019. - T. 29. - №. 3. - с. 609-613.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Демидова Валентина Семеновна — доктор биологических наук, заведующая клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
ORCID: 0000-0003-3187-4408

Valentina S. Demidova — MD, Dr. Sci. (Biol.), head of the clinic and diagnostic laboratory of A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery subordinate to the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Алхимова Людмила Геннадьевна — врач клинической лабораторной диагностики первой категории клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
ORCID: 0000-0002-1598-7894

Liudmila G. Alkhimova — MD, physician of clinical laboratory diagnostics of the first category at A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery subordinate to the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Демченко Мария Александровна — врач клинической лабораторной диагностики ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
ORCID: 0000-0002-2733-708X

Maria A. Demchenko — MD, physician of clinical laboratory diagnostics at A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery subordinate to the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Терехова Раиса Петровна — кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией профилактики и лечения бактериальных инфекций отдела ран и раневых инфекций ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А. В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия
ORCID: 0000-0002-4622-1429

Raisa P. Terekhova — MD, Cand. Sci. (Med.), head of the laboratory of prevention and treatment of bacterial infections at the department of wounds and wound infections at A. V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery subordinate to the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Авторы: В. С. Демидова, Л. Г. Алхимова, М. А. Демченко, Р. П. Терехова

Authors: V. S. Demidova, L. G. Alkhimova, M. A. Demchenko, R. P. Terekhova

Участие авторов:

Концепция и дизайн — В. С. Демидова, Л. Г. Алхимова, Р. П. Терехова
Сбор и обработка материала — Л. Г. Алхимова, М. А. Демченко
Написание текста — М. А. Демченко, Л. Г. Алхимова
Редактирование — В. С. Демидова, Р. П. Терехова

Authors' contribution:

Concept and design — V. S. Demidova, L. G. Alkhimova, R. P. Terekhova
Material collection and processing — L. G. Alkhimova, M. A. Demchenko
Text writing — M. A. Demchenko, L. G. Alkhimova
Editing — V. S. Demidova, R. P. Terekhova