

«Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций»
Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр
вирусологии и биотехнологии «Вектор»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

На правах рукописи

Федотова Ольга Семеновна

**МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ПОЛУЧЕНИЯ И
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСНОГО БАКТЕРИОФАГА
ACINETOBACTER BAUMANNII И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA***

1.5.11. Микробиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Захарова Юлия Александровна

Екатеринбург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
Актуальность темы исследования	5
Степень разработанности темы исследования	7
Цель исследования.	8
Задачи исследования	8
Научная новизна работы	9
Теоретическая и практическая значимость	10
Методология и методы исследования	11
Материалы исследования	12
Методы исследования	15
Микробиологические методы исследования микроорганизмов.....	15
Методы исследования бактериофагов	19
Молекулярно-генетические методы исследования	22
Биоинформатические и статистические методы исследования.....	25
Личное участие автора в получении результатов.....	25
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	26
Степень достоверности и апробация результатов	27
ГЛАВА 1. РОЛЬ <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> И <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В МЕДИЦИНЕ (обзор литературы).....	29
1.1 Характеристика <i>Acinetobacter spp.</i>	30
1.2 Характеристика <i>Pseudomonas spp.</i>	34
1.3 Внутривидовое типирование <i>A. baumannii</i> и <i>P. aeruginosa</i>	37
1.4 Бактериофаги, их особенности и перспективы использования	39
1.4.1 Структура и жизненный цикл бактериофагов	40
1.4.2 Применение бактериофагов в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней.....	44

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	52
ГЛАВА 2. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО БАКТЕРИОФАГА АЦИНЕТОБАКТЕР-СИНЕГНОЙНЫЙ. СОЗДАНИЕ МУЗЕЙНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ БАКТЕРИОФАГА <i>ACINETOBACTER BAUMANNII</i> . ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ К АНТИБИОТИКАМ И К КОМПЛЕКСНОМУ БАКТЕРИОФАГУ	52
2.1. Распространенность в медицинских организациях и чувствительность к антимикробным препаратам штаммов <i>A. baumannii</i> и <i>P. aeruginosa</i>	52
2.2. Выделение бактериофага <i>A.baumannii</i> из биологических образцов и объектов внешней среды	57
2.2.1. Свойства ацинетобактерного бактериофага	60
2.3. Формирование коллекции штаммов бактерий – продуцентов бактериофага <i>A. baumannii</i>	62
2.3.1. Адаптация слабочувствительных штаммов <i>A. baumannii</i> к бактериофагу	64
2.3.2. Генотипическая характеристика штаммов-продуцентов.	65
2.4. Получение комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный..	66
2.4.1. Характеристика бактериофага <i>P. aeruginosa</i>	67
2.4.2. Характеристика бактериофага ацинетобактер-синегнойный	68
2.4.3. Изучение адсорбции и основных фаз внутриклеточного развития	70
2.4.4. Литическая активность.....	73
2.4.5. Диапазон действия.....	74
2.4.6. Оценка специфической активности на основе клеточной культуры ЛЭЧ-3 с изучением адгезивных свойств бактерий.....	75
2.4.7. Сравнительная оценка чувствительности штаммов <i>A. baumannii</i> к антибиотикам и комплексному бактериофагу (2014-2020 гг.).....	78
ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ <i>ACINETOBACTER</i>	

<i>BAUMANNII</i> И <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСНОГО БАКТЕРИОФАГА АЦИНЕТОБАКТЕР-СИНЕГНОЙНЫЙ ..	83
3.1. Внутривидовая идентификация <i>P. aeruginosa</i>	83
3.2. Внутривидовая идентификация отдельных сиквенс-типов <i>Acinetobacter baumannii</i>	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	102
ВЫВОДЫ	111
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	112
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	113
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	114
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Среди микроорганизмов – возбудителей гнойно-септических инфекций человека наиболее значимыми являются неферментирующие глюкозу в анаэробных условиях грамотрицательные бактерии, в их числе лидирующее место занимают *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* [31, 148, 155]. Как свидетельствуют результаты многолетних исследований, проведенных в нашей стране и за рубежом, отмечается постоянный рост сочетанных инфекций, вызванных этими микроорганизмами [19, 62, 63, 210]. Способность *A. baumannii* и *P. aeruginosa* формировать госпитальные популяции с резистентностью к различным классам антибиотиков, ряду дезинфицирующих средств и антисептиков существенно снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий, приводит к формированию эпидемических очагов гнойно-септических инфекций с высокой летальностью пациентов из групп риска [69, 107, 151].

В 2017 году постановлением Правительства Российской Федерации утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, в которой одним из основных мероприятий по борьбе с антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов определена разработка новых биологических лекарственных препаратов [59]. В качестве альтернативных антибиотикам средств предлагается использование бактериофагов с избирательной активностью к бактериальным клеткам. В условиях глобального роста антибиотикорезистентности бактериофаги могут стать эффективными средствами для лечения и профилактики многих бактериальных инфекций [8, 27, 127, 159].

Положительными свойствами бактериофагов считается узкая специфичность (избирательность), безопасность, способность к накоплению в организме (в большей степени в очаге поражения), относительно долгое время действия одной дозы. Проблема повышения эффективности препаратов

бактериофагов предполагает не только использование их комбинаций, но и разработку принципиально новых композиций против актуальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, прежде всего, вызванных *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Известно, что для терапии синегнойной инфекции в настоящее время успешно применяют препараты бактериофагов, выпускаемые Филиалами АО «НПО «Микроген» (г. Пермь – «Пермское НПО «Биомед», г. Н.Новгород – «ИМБИО», г. Уфа – «Иммунопрепарат»). Вместе с тем в России, отсутствует препарат бактериофага против *A. baumannii*, что ставит приоритетной задачей его разработку и широкое применение (в том числе в форме комбинаций с другими актуальными фагами) в клинических, диагностических и эпидемиологических целях, включая внутривидовое типирование микроорганизмов, которое активно проводилось с использованием бактериофагов для дифференциальной диагностики актуальных госпитальных патогенов, начиная с 60-х годов XX века [4].

В настоящее время при внутривидовой идентификации внутрибольничных штаммов микроорганизмов акцент сделан на современные молекулярно-генетические методы (ПЦР, мультилокусное и полногеномное секвенирование) [33, 39]. Однако, большинство практикующих микробиологических лабораторий не имеет возможности провести их качественное сопоставление в силу высоких финансовых затрат [14]. По-прежнему во многих медицинских организациях в качестве основного метода используют оценку антибиотикограммы. На фоне растущей антибиотикорезистентности данный метод оценки становится малоэффективным. Вместе с тем активная циркуляция в медицинских организациях штаммов внебольничного и внутрибольничного происхождения от пациентов, сотрудников и из внешней среды существенно затрудняет проведение эпидемиологической диагностики с определением интенсивности, временных и пространственных границ эпидемических очагов, установлением путей и факторов передачи [73].

В связи с этим получение комплексного бактериофага *A. baumannii* и *P. aeruginosa* и поиск новых подходов к его использованию для внутривидовой идентификации актуальных микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью позволит за короткий период времени не только идентифицировать патоген, но и расшифровать эпидемический очаг гнойно-септических инфекций.

Степень разработанности темы исследования

В Российской Федерации и за рубежом накоплен значительный опыт в изучении бактериальных инфекций, вызванных представителями неферментирующих грамотрицательных бактерий – *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [18, 46, 54, 68, 210, 220]. Прежде всего *A. baumannii* является микроорганизмом с высоким уровнем резистентности к различным классам антибиотиков [78].

Ведутся активные разработки антибактериальных препаратов, в частности бактериофагов против данных микроорганизмов. На сегодняшний день выделены и описаны вирулентные бактериофаги *A. baumannii* AB1 [218], фаг vB_AbaM-IME-AB2 [168], AP22 [58], vB_AbaP_AS11 и vB_AbaP_AS12 [171], которые преимущественно используют с экспериментальной и диагностической целью, в том числе для идентификации представителей этого вида. При этом авторы указывают на узкий спектр их литической активности [58]. Однако, в настоящее время фармацевтическая промышленность выпускает коммерческий препарат для лечения и профилактики гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний, вызванных синегнойной палочкой – «Бактериофаг синегнойный жидкий» [3, 50].

В мировой практике на протяжении последних 30 лет ведутся активные научные исследования в области быстрой и качественной внутривидовой идентификации возбудителей гнойно-септических инфекций на основе методов молекулярной генетики. Изучение фенотипического профиля полирезистентных сиквенс-типов *A. baumannii* и создание на их основе доступной микробиологической диагностической панели позволит приблизить ученых к решению задачи широкого использования результатов молекулярно-генетических

и микробиологических исследований в практической медицине с целью повышения качества противоэпидемических и профилактических мероприятий в отношении инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Перечисленные меры борьбы с антибиотикорезистентностью и госпитальными штаммами микроорганизмов, приведут к снижению ущерба здоровью населения и экономике, улучшению демографической ситуации в стране.

Таким образом, получение нового перспективного средства антимикробной терапии, бактериофага ацинетобактер-синегнойный и изучение возможности применения комбинированного бактериофага в микробиологической диагностике является актуальным.

Цель исследования – на основе созданной коллекции штаммов бактерий-продуцентов бактериофага и выделенного в госпитальных условиях бактериофага *Acinetobacter baumannii* получить комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, оценить возможность его использования для идентификации (внутривидового типирования) полирезистентных штаммов микроорганизмов.

Задачи исследования:

1. Изучить распространенность, особенности циркуляции и антибиотикочувствительность *A. baumannii* и *P. aeruginosa* на примере учреждений здравоохранения крупных промышленных центров.

2. Выделить из биологического материала и из объектов внешней среды бактериофаг *A. baumannii*, создать и охарактеризовать музейную коллекцию штаммов бактерий-продуцентов ацинетобактерного бактериофага, получить комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный.

3. На основе клеточной культуры ЛЭЧ-3 разработать новый способ оценки специфической активности комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный с изучением адгезивных свойств бактерий.

4. Провести сравнительный анализ чувствительности штаммов *A. baumannii* к антибиотикам и комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный.

5. Усовершенствовать методы идентификации (внутривидового типирования) *A. baumannii* и *P. aeruginosa* с использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный.

Научная новизна работы

Выявлен высокий уровень циркуляции и резистентности к антибиотикам штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* в медицинских организациях Пермского края. Установлено, что в структуре микрофлоры из биологических материалов от пациентов преобладали *A. baumannii*, из проб внешней среды – *P. aeruginosa*. В международную базу данных Pub MLST депонированы 6 сиквенс-типов (ST) *A. baumannii* из рабочей коллекции штаммов, выделенных из медицинских организаций г. Перми (№ 942 (22F); № 943 (32F); № 944 (23F); № 945 (28F); № 946 (2179F); № 952 (31)).

Из нижних отделов дыхательных путей, раневого отделяемого пациентов и сточных вод многопрофильного стационара выделен, в последующем охарактеризован бактериофаг *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*. Анализ генома фага *Acinetobacter phage_vB_AbaP_PE14* депонирован в международную базу GenBank № OL964948. На его основе получен комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный.

С использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3 разработан метод оценки специфической активности комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный с изучением адгезивных свойств бактерий (патент на изобретение РФ «Способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур» RUS 2723188 от 09.06.2020г.).

Установлен высокий уровень чувствительности клинических штаммов *A.baumannii*, выделенных из отделений реанимации и интенсивной терапии, к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный, сопоставимый с уровнем чувствительности антибиотиков резерва (тигециклин).

С использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный и оценки минимальной подавляющей концентрации (МПК) к антибиотикам

усовершенствован метод внутривидового типирования *P. aeruginosa*, получена микробиологическая панель для проведения идентификации распространенных сиквенс-типов (ST 208; ST 944; ST 1167) полирезистентных штаммов *A. baumannii*.

Теоретическая и практическая значимость

Выявленные закономерности циркуляции неферментирующих грамотрицательных бактерий на популяционном уровне, в условиях больничной среды, включая отдельные генетические варианты полиантибиотикорезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, обогатят новыми знаниями теоретические основы жизнедеятельности микроорганизмов, их эволюцию и установление филогенетического положения.

Результаты исследований, полученные в ходе разработки комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный способствуют расширению теоретических основ микробиологии в области создания эффективных лекарственных и профилактических средств, что имеет важное народно-хозяйственное значение.

Полученные данные о последовательности генома фага *A.baumannii* могут быть использованы для воссоздания природных фагов путем непосредственного синтеза ДНК на основе хранящейся последовательности или для создания новых, в том числе генно-модифицированных фагов, обладающих преимуществами для диагностики и лечения бактериальных инфекций.

Метод оценки специфической активности бактериофагов с использованием клеточных культур человеческого происхождения позволит адекватно проецировать применяемую методику на организм человека. Благодаря этому, модель (клеточная культура) может быть использована, как для обширного скрининга антибактериальных препаратов, так и для детального тестирования перспективных соединений на доклиническом уровне проведения исследований.

Сформирована рабочая коллекция штаммов бактерий – продуцентов бактериофага *A. baumannii*, которая может быть использована для

промышленного получения лечебно-профилактического препарата ацинетобактерного и ацинетобактер-синегнойного бактериофага.

Полученные экспериментальным путем, микробиологические тесты для проведения внутривидовой дифференциации полирезистентных штаммов *A.baumannii* распространенных сиквенс-типов (ST 208; ST 944; ST 1167) могут быть актуальны и востребованы для лабораторий и научных подразделений, не имеющих возможности использовать методы секвенирования.

Материалы диссертации вошли в курс лекций на кафедре эпидемиологии и гигиены факультета дополнительного профессионального образования Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Минздрава России (акт внедрения от 20.12.2021).

Результаты исследования и разработанный алгоритм проведения внутривидового типирования штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* внедрены в практическую деятельность клинико-диагностической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Пермский клинический центр Федерального медико-биологического агентства России» (акт внедрения от 17.12.2021).

Методология и методы исследования

Методология работы спланирована соответственно поставленной цели и задачам исследования. Предметом исследования являются штаммы микроорганизмов *P. aeruginosa* и *A. baumannii*, бактериофаг *A. baumannii*, бактериофаг *P. aeruginosa*, комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, отдельные сиквенс-типы (ST 208; ST 944; ST 1167) полирезистентных штаммов *A. baumannii*.

Работа выполнялась поэтапно с целью достижения поставленных задач. Получение бактериофага *A. baumannii*, разработка комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный и его использование для внутривидовой характеристики *P. aeruginosa* и *A. baumannii*. В работе применены

общепризнанные апробированные и современные микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования, использованы методы обработки информации и статистического анализа.

Все исследования одобрены локально этическим комитетом ФБУН ЕНИИВИ Роспотребнадзора (Протокол №1 от 02.06.2018 г.).

Материалы исследования

В работе использовали штаммы микроорганизмов, выделенных из биологического материала от людей (мазки из зева, уха, мокрота, бронхоальвеолярный лаваж, плевральная жидкость, раневое отделяемое, моча, кровь, фекалии, секционный материал) и с объектов внешней среды медицинских организаций, включая сточные воды. Забор биологических образцов и проб из внешней среды для исследования проводился врачами различных подразделений медицинских организаций, в рамках соглашений. Количество образцов и штаммы рабочей коллекции, выделенные из различных медицинских организаций, представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Количество образцов

№	Материалы	Количество образцов	Учреждение
.	Биологические образцы от пациентов и пробы из объектов внешней среды медицинских организаций	2282	1. Федеральное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Пермский клинический центр» Федерального медико-биологического агентства, г. Пермь (ФГБУЗ ПКЦ ФМБА России) 2. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Пермского края «Клиническая медико-санитарная часть №1», г. Пермь (ГБУЗ ПК «КМСЧ №1») 3. Муниципальное бюджетное медицинское учреждение «Городская больница № 3» г. Соликамск (МБМУ «Городская Больница № 3») 4. Муниципальное автономное учреждение «Городская клиническая больница 14», г. Екатеринбург (МАУ «ГКБ 14»)

Продолжение Таблицы 1

№	Материалы	Количество образцов	Учреждение
			5. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Полевская центральная городская больница» (ГБУЗ СО «Полевская ЦГБ») 6. Муниципальное автономное учреждение «Детская городская больница № 8», г. Екатеринбург (МАУ «ДГБ № 8»)
2.	Штаммы микроорганизмов	1797	1. ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, г.Пермь 2. ФБУЗ ПК «КМСЧ № 1», г.Пермь 3. МБМУ «Городская Больница № 3», г. Соликамск
2.2	Тест - штаммы рабочей коллекции	60	4. МАУ «ГКБ 14» г. Екатеринбург
2.3	Штаммы бактерий-продуценты	190	5. ГБУЗ СО «Полевская ЦГБ», Свердловская область 6. МАУ «ДГБ № 8», г. Екатеринбург
3.	Клеточные культуры	1	Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора)
4.	Бактериофаги	2	Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (АО «НПО» Микроген»)

Аналитические данные, полученные на основе сведений из ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, МБМУ «Городская Больница № 3» в виде годовых отчетных форм Пермского края (ф.30) (Постановление Госкомстата России от 4 сентября 2000 г. №76 «Об утверждении статистического инструментария для организации Минздравом России статистического наблюдения за деятельностью медицинских учреждений»).

Всего проанализировано 18693 микробиологических (клинических и санитарно-бактериологических) исследований.

При выполнении диссертационной работы проведены следующие виды и объемы исследований (Таблица 2).

Таблица 2 – Объем проведенных исследований

Метод	Виды исследования	Количество (абс.)
Микробиологические исследования	Идентификация микроорганизмов, выделенных из клинического материала от пациентов и из объектов внешней среды	1797
	Определение чувствительности штаммов к антибиотикам (диско-диффузионный метод)	273
Микробиологические исследования	Определение чувствительности штаммов <i>P.aeruginosa</i> методом серийных разведений	53
	Оценка пленкообразующей способности штаммов <i>A. baumannii</i>	74
	Определение чувствительности штаммов <i>A. baumannii</i> к анилиновым красителям	74
	Определение чувствительности штаммов <i>A. baumannii</i> к дезинфицирующим средствам	74
	Оценка зон задержки роста штаммов <i>A. baumannii</i> вокруг дисков с непрофильными антибиотиками (диско-диффузионный метод)	74
Методы исследования бактериофагов	Поиск и выделение бактериофага <i>A. baumannii</i> из клинического материала и объектов внешней среды	152
	Получение лизатов, содержащих фаг <i>A. baumannii</i>	8
	Определение чувствительности штаммов <i>A. baumannii</i> к бактериофагу диффузионным методом (спот-тест)	1538
	Определение активности бактериофага ацинетобактерного, синегнойного по методу Аппельмана	462
	Определение концентрации фаговых частиц ацинетобактерного и синегнойного бактериофага по методу Грациа	36
	Адаптация слабочувствительных штаммов <i>A. baumannii</i> к ацинетобактерному бактериофагу	54
	Определение латентного периода, урожайности фаговых частиц, скорости адсорбции ацинетобактерного бактериофага	2
	Электронное микрофотографирование бактериофагов ацинетобактерного, синегнойного	4
	Оценка специфического действия бактериофага ацинетобактер-синегнойный с использованием клеточных культур (эксперимент)	60
Молекулярно-генетические методы исследования	ПЦР на гены резистентности (<i>P.aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>)	343
	Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов <i>A. baumannii</i>	79
	Полногеномное секвенирование ацинетобактеринового бактериофага	1
Итого исследований:		5158

Типовые штаммы

В качестве контроля при постановке микробиологических тестов использовали четыре референс-штамма из коллекции Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации: *A. baumannii* ATCC 19606, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Клеточные культуры

В эксперименте по изучению специфической активности бактериофагов использовали диплоидную клеточную линию ЛЭЧ-3, полученную из нормальной ткани легкого эмбриона человека. Клеточная культура находится в коллекции «банка-музея» Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Бактериофаги

Для получения комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный, вторым компонентом был взят коммерческий бактериофаг «Бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный)» с. Н11 от 11.2017 г. производства НПО «Микроген» г. Пермь.

В эксперименте по изучению специфической активности бактериофагов с использованием клеточных культур использовали коммерческий «Бактериофаг Стафилококковый» с. Н 92 от 05.2018 г. производства НПО «Микроген» г. Пермь.

Методы исследования

Микробиологические методы исследования микроорганизмов

Идентификация микроорганизмов

Предварительная видовая идентификация бактериальных штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* от пациентов и с объектов внешней среды проведена в бактериологических лабораториях медицинских организациях.

Дифференциальная диагностика выделенных штаммов осуществлена по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам [76].

При реидентификации штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa* использованы наборы «NEFERMtest 24» («Erba Lachema», Чехия).

Определение антибиотикочувствительности

Оценку чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам осуществляли диско-диффузионным методом на питательном агаре Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) с использованием коммерческого набора дисков.

Для определения чувствительности *P. aeruginosa* использовали диски: меропенем (30 мкг/мл), цеферазон/сульбактам (50/50мкг/мл), левофлоксацин (30 мкг/мл), цефтазидим (10 мкг/мл), цефоперазон (10 мкг/мл) (НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия); гентамицин (10 мкг/мл), амикацин (30 мкг/мл), имипенем (10 мкг/мл), цефепим (30 мкг/мл), ципрофлоксацин (5 мкг/мл), полимиксим-В (300 ед.), («HiMedia», Индия).

Для определения чувствительности *A. baumannii* – диски: хлорамфеникол (30 мкг/мл), цефтазидим (10 мкг/мл), тигециклин (15 мкг/мл) (НИЦФ, Санкт-Петербург, Россия); гентамицин (10 мкг/мл), имипенем (10 мкг/мл), амикацин (30 мкг/мл), ципрофлоксацин (5 мкг/мл), цефепим (30 мкг/мл), полимиксим-В (300 ед.) (производство «HiMedia», Индия).

Для эксперимента по внутривидовому типированию штаммов *A. baumannii* использовали антибиотики, которые для лечения инфекционной патологии, вызванной этими микроорганизмами не применяются: фузидин (10 мкг) (НИЦФ, г. Санкт-Петербург); ванкомицин (5 мкг), эритромицин (15 мкг), рифампицин (5 мкг), клиндамицин (2 мкг), линезолид (10 мкг) («HiMedia», Индия).

Постановку тестов и интерпретацию результатов оценки чувствительности («R» – устойчивый; «I» –промежуточный; «S» - чувствительный) осуществляли в соответствии с методическими указаниями МУ 4.2.1890-04 [43] и

рекомендациями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST v 2.0) [125].

Определение чувствительности методом серийных разведений

Чувствительность штаммов *P.aeruginosa* к антибактериальным препаратам методом серийных разведений (с оценкой минимальной подавляющей концентрации) проводили в 96-луночных планшетах для иммунологических исследований в бульоне Мюллера-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) на микробиологическом анализаторе BD Phoenix 100 (BECTON DICKINSON, США).

Для определения МПК применяли диапазон конечных концентраций антибиотиков в лунках: от 32,0 до 0,016 мкг/мл – для имипенема, меропенема; от 64,0 до 0,031 – для ципрофлоксацина; от 128,0 до 0,0625 мкг/мл – для всех остальных антибиотиков. За МПК принимали наименьшую концентрацию антибиотика, подавляющую видимый рост микроорганизма. Для проведения исследования использовали следующие антибиотики: гентамицин, амикацин, имипенем, меропенем, цефепим, цефоперазон/сульбактам, ципрофлоксацин, цефтазидим.

Оценку результатов учитывали по изменению оптической плотности среды в автоматическом режиме, руководствуясь МУ 4.2.1890-04 [43]

Определение способности к пленкообразованию

Оценку интенсивности сформировавшихся биопленок проводили с использованием 96-луночных планшетов для иммунологических исследований на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США), по степени окраски – 1% раствором кристаллического фиолетового (ХимМед, Россия) в каждой лунке [112].

Мерой роста биоплёнки считали диапазон значений оптической плотности (ОП). Штаммы со значениями ОП $\geq 2,0$ учитывали, как штаммы с низкой способностью к биоплёнкообразованию, ОП $\geq 3,0$ – умеренной, ОП $\geq 4,0$ – высокой.

Определение чувствительности к анилиновым красителям

Чувствительность к анилиновым красителям определяли диффузионным («чашечным») методом [41].

Испытуемый бактериальный штамм распределяли по поверхности чашки Петри с питательным агаром Мюллер-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия). На газон с впитавшейся культурой наносили по 5 мкл 1% водно-спиртовых растворов анилиновых красителей: бромтимолового синего, метиловый красный, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный, фуксин кислый («НПФ «Абрис+», Россия). После впитывания капель раствора чашки переворачивали и инкубировали при температуре +37 °С в течение 20-24 часов. О наличии антимикробного эффекта анилиновых красителей судили по появлению зон угнетения роста.

Определение чувствительности к дезинфицирующим средствам

В работе использовали: форэкс-хлор (0,1%; 0,06%) (НПК "Альфа", Россия), амиксидин (0,25%) (Медлекспром, Россия), ньюжавел (0,1%) (ООО "Аквилон", Россия). Руководствовались МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях» [44].

Определение чувствительности к бактериофагам

При оценке чувствительности к бактериофагам использовали диффузионный метод (спот-тест) [1].

Испытуемый бактериальный штамм распределяли по поверхности чашки Петри с питательным агаром Мюллера – Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). На газон с впитавшейся культурой наносили по 1 капле бактериофага с последующей инкубацией при температуре + 37 °С в течение 18 часов. Наличие зоны лизиса на посевном газоне свидетельствовало о чувствительности штамма к бактериофагу. Оценку степени лизиса проводили путем визуализации зоны образования «стерильного» пятна на месте нанесения капель бактериофага по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»): «-» отсутствие лизиса; «+»

низкий лизис; «++» лизис с большим количеством колоний вторичного роста; «+++» лизис с единичными колониями вторичного роста; «++++» сплошной лизис без колоний вторичного роста.

Методы исследования бактериофагов

Выделение фагов из сточных вод и биологического материала

С целью выделения бактериофагов, лизирующих *A. baumannii*, исследовали различные образцы биологического материала (БАЛ, раневое отделяемое, мокроту, мочу и др.), смывы с объектов внешней среды стационаров (дренажные трубки, перевязочные материалы, перчатки после осмотра, медицинские отходы), а также пробы сточных вод.

При значительном загрязнении полученных образцов (сточные воды) их предварительно пропускали через ватно-марлевый фильтр для освобождения механических примесей. Затем в 100 мл испытуемой жидкости вносили 10 мл 10% раствора пептона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск), 10 мл 5% раствора NaCl и 0,1 мл 1 млрд. взвеси бактериальной культуры *A. baumannii*. Обогащение биологического материала проводили следующим образом: на 50–100 мл питательной среды (МПБ) (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с биологическим материалом вносили 0,1 мл 1 млрд. взвеси культуры *A. baumannii*. Далее образцы помещали в термостат при температуре +37 °C на 20-24 часа. После инкубации полученную взвесь центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин. Супернатант фильтровали через бактериальные фильтры (шприцевые насадки «Millex GP» (Millipore, Корт, Ирландия) с диаметром пор 0,45; 0,22 мкм. Далее фаговую суспензию обрабатывали хлороформом (Экос, Россия) 10:1 [15].

Наличие активности литических бактериофагов в полученных фильтратах проверяли нанесением капель фага на сплошной газон индикаторной культуры соответствующего микроорганизма с последующей 18–20 часовой инкубацией чашек при + 37 °C. На месте нанесения капель образовывалось негативное пятно с различной степенью лизиса индикаторного штамма в зависимости от активности бактериофага.

Степень лизиса оценивали путем визуализации зоны на месте нанесения капель фага по пятибалльной шкале (см. выше).

Определение активности бактериофагов по методу Анпельмана

Степень литической активности бактериофага на жидких средах МПБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) определяли путем установления его максимально разведения, вызывающего полный лизис бульонной культуры бактерий [1]. Активность бактериофага обозначали отрицательной степенью десяти, где степень указывала разведение бактериофага.

Адаптация штаммов к бактериофагу

На газон питательной среды Мюллер-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) засеивали штрихами чистую культуру *A. baumannii*, затем наносили 0,05 маточной расы ацинетобактерного фага. После 18–20-часовой инкубации при + 37 °С извлекали фрагмент агаровой пластинки из зоны лизиса и суспендировали в 5,0 мл МПБ (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Фаголизат освобождали от бактериальных клеток фильтрованием через мембранный фильтр 0,22 мкм «Millex GP» (Millipore, Корт, Ирландия) и обрабатывали 1%-ным раствором хлороформа (Экос, Россия). Полученный фаголизат повторно наносили на газон той же бактериальной культуры. Повторяли методику не менее четырех последовательных пассажей.

Определение концентрации фаговых частиц по методу Грация

Определение титра бактериофага проводили методом агаровых слоев Грация на питательной среде Мюллер-Хинтона (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) [1]. Подсчитывали количество прозрачных колоний фага и умножали на число, равное степени разведения пробы, что соответствовало количеству бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл образца.

Определение латентного периода, скорости адсорбции, урожайности фаговых частиц

Метод дает возможность определить скорость адсорбции, латентный период и средний урожай фаговых частиц [1]. Готовили адсорбционную смесь с

множественностью инфекции 0,1. Для этого брали инокулят бактерий объемом 4,5 мл в логарифмической стадии роста (около 10^8 клеток/мл) и добавляли к нему 0,5 мл фага в титре 2×10^8 частиц/мл (1-я пробирка). Делали контрольные высева для определения числа жизнеспособных клеток и титра частиц фага в адсорбционной смеси. Смесь инкубировали, после чего 0,1 мл ее количества разводили в 9,9 мл бульона МПБ (2-я пробирка). Переносили 0,1 мл из 2-й пробирки в 9,9 мл бульона (3-я пробирка), а затем из 3-й пробирки 0,1 мл – в 9,9 мл бульона (4-я пробирка); 2-ю пробирку центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин, после чего 0,1 мл инокулята заседали методом агаровых слоев для определения количества частиц неадсорбированного фага.

Аналогичным образом инкубировали 3-ю и 4-ю пробирки, через каждые 5-10 минут пробы из них по 0,1 мл заседали методом агаровых слоев. Увеличение числа негативных колоний, выросших на чашках, указывало на окончание латентного периода. Количество фаговых частиц, обнаруживаемых в течение латентного периода, представляли собой сумму частиц не адсорбированного и адсорбированного фага, а после окончания – сумму частиц неадсорбированного и вновь образовавшегося фага.

$$K = \frac{2,3 \log P_0 P}{Bt},$$

где,

K – константа скорости адсорбции,

P_0 – исходное количество фаговых частиц в смеси фаг-бактерии,

P – число неадсорбированных фаговых частиц через время (t)

Электронно-микроскопическое исследование

Для визуализации морфологии бактериофагов *A.baumannii*, *P.aeruginosa* использовали углеродные пленки-подложки, обработанные тлеющим разрядом в вакууме. Образцы с фагами перед нанесением на пленку фиксировали 1%-ным глютаровым альдегидом, приготовленным на 0,1 М фосфатном буфере (рН 7,0). Нанесенные на подложки препараты контрастировали 1%-ным водным раствором уранилацетата [102]. Визуализацию объектов и их фотографирование проводили

на просвечивающем электронном микроскопе «Hitachi H-300» (Hitachi Ltd, Япония) при ускоряющем напряжении 75 кВ и 5000 кратном увеличении. Для определения морфологии фага было использовано не менее 20 электронных изображений фага.

Определение рН

Определение рН в питательных средах, в препаратах бактериофагов проводили потенциометрически с помощью иономера лабораторного И-160 (НПО Измерительная техника, Россия) согласно ФС 42-3874-99.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК микроорганизмов

Для выделения ДНК *A. baumannii* и *P. aeruginosa* использовали суточную бактериальную культуру, полученную при посеве изолированных колоний на кровяной агар (КА) на основе ГРМ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) с добавлением 10 % ККРС (ООО «ЛейТран», Москва). Выделение ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «РИБО–преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва) в соответствии с инструкцией производителя. Полученные образцы хранили при температуре - 20°C.

Полимеразная цепная реакция для выявления генов бета-лактамаз расширенного спектра

Для выявления генов расширенного спектра (БЛРС) использовали метод ПЦР. Выявление генов БЛРС (*bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}), определяющих резистентность к изучаемым классам β -лактамных антибиотиков (за исключением карбапенемов), были использованы праймеры (Таблица 3).

Общий объем реакционной смеси составлял 20 мкл, содержал 4 мкл ПЦР-микс с полимеразой горячего старта (5xScreenMix-HS, Евроген, Россия), по 2 мкл каждого из праймеров, 10 мкл деионизированной воды и пробы по 2 мкл ДНК. Компоненты реакционной смеси смешивали непосредственно перед проведением эксперимента.

Таблица 3 – Праймеры для идентификации генов *bla*_{СТХ-М} и *bla*_{ТЕМ}) [134]

№	Праймер	Последовательность 5' – 3'	Продукт (bp)
<i>bla</i> _{СТХ-М}			
1	СТХ-М/F	5'-tttgcgatgtgcagtagcag-3'	544
2	СТХ-М/R	5'-gatatcgttggtggtgcat-3'	
<i>bla</i> _{ТЕМ}			
3	ТЕМ/F	5'-ataaaattcttgaagacgaaa-3'	1080
4	ТЕМ/R	5'-gacagttaccaatgcttaatca-3'	

Аmplification осуществляли с помощью прибора Real-Time CFX – 96 (Bio-Rad, США).

Детекция продуктов амплификации с помощью горизонтального электрофореза

Полученные ампликоны смешивали с 6 x DNA Loading Dye («Thermo Fisher Scientific», США) и 10 000 x SYBR Green I (Lumiprobe GmbH, Германия), помещали в лунки 1,5 % агарозного геля (Lonza, США). Электрофорез проводили в 50 x TAE-буфере («Thermo Fisher Scientific», США) в камере SUB-CELL® GT (Bio-Rad Laboratories, США) при 160 V в течение 60 мин. В качестве маркера молекулярных весов использовали GeneRuler 100 bp DNA Ladder («Thermo Fisher Scientific», США). Продукты амплификации визуализировали с помощью гельдокументирующей системы Quantum-ST4-1100/26M (Vilber Lourmat, Франция).

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для выявления генов карбапенемаз

Выявление генов карбапенемаз проведено в режиме мультиплексной ПЦР в реальном времени (Аmplifikator Real-Time CFX - 96, Bio-Rad, США) с использованием диагностических наборов «АмплиСенс® MDR A.b.-OXA -FL» (OXA-23, OXA-40, OXA-58), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (KPC, OXA-

48) и «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (VIM, IMP, NDM) (ЦНИИЭ Роспотребнадзора) в соответствии с инструкциями изготовителя.

Мультилокусное секвенирование–типирование *A.baumannii*

Для генотипирования штаммов *A. baumannii* применяли метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ). Использовали ДНК, экстрагированную из чистых бактериальных культур. Подготовка матриц для секвенирования включала амплификацию внутренних фрагментов генов «домашнего хозяйства»: *gltA* (citrate synthase), *gyrB* (DNA gyrase subunit B), *gdhB* (glucose dehydrogenase), *recA* (homologous recombination factor), *cpn60* (60-kDa chaperonin), *gpi* (glucose-6-phosphate isomerase), *rpoD* (RNA polymerase sigmafactor) [35]. Подбор праймеров для амплификации проводили в базе данных PubMLST [136].

MLST *A. baumannii* проводили с использованием наборов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по методике, описанной производителем. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности генов «домашнего хозяйства» обрабатывали с помощью программы SeqMan, затем сравнивали с базой аллелей, используя программу для обработки результатов типирования. Исследуемой аллели присваивался соответствующий номер.

Сиквенс-тип (sequence type – ST) определяли на основании комбинации аллелей. Штаммы, находящиеся в базе данных, группировали в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) для бактерий вида *A. baumannii*.

Полногеномное секвенирование бактериофага *A. baumannii*

Геномную ДНК фага выделяли из очищенного препарата бактериофага путем инкубации в растворе 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA, 1.5 M NaCl, 2% (w/v) СТАВ, 0.3% (v/v) β-меркаптоэтанола и 50 мг/мл протеиназы К at 50 °C 30 минут, с последующей экстракцией ДНК хлороформом и осаждением добавлением 0,6 объема изопропилового спирта (Россия). Секвенирование генома

выполняли на платформе MiSeq, используя набор Nextera DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Полученные последовательности собраны в единый контиг программой SPAdes v. 3.13 [93]

Биоинформатические и статистические методы исследования

При описании данных для оценки качественных признаков изучаемых явлений находили абсолютные и относительные (в %) частоты; последние снабжали 95 % доверительными интервалами (95 % ДИ), вычисленными по методу Уилсона (Wilson CI for proportion) [217]. Достоверность различий между сравниваемыми показателями оценивали с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Результаты статистической обработки в таблицах представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$). Расчет средней ошибки относительной величины определяли по формуле, где P – соответствующая относительная величина (рассчитанная, в процентах (%)). Обработка данных выполнена с помощью пакетов PAST (v. 3.25) [129].

Геном бактериофага *Acinetobacter_phage_vB_AbaP_PE14* аннотировали с помощью Prokka [182], используя встроенные базы данных. Предсказание функций, закодированных в геноме белков, выполняли с помощью поиска BLAST [88] по известным гомологичным последовательностям и сравнения схожих мотивов НММ с помощью онлайн-сервисов HHpred [120] и Phyre2 [141] с использованием баз данных SCOPe70_2.07, ECOD_ECOD_F70 и UniProt-SwissProt-viral70. В качестве критерия достоверного сходства BLAST использовали величину E-value $<10^{-5}$, в качестве критерия достоверного сходства сравнения НММ использовали величины Phyre2 «confidence» и HHpred «probability» более 95%. Генетическую карту сформировали с помощью программы Geneious Prime <https://www.geneious.com/>.

Личное участие автора в получении результатов

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах выполнения работы. Автор самостоятельно изучил отечественные и зарубежные литературные источники по теме работы. Лично выделил и

охарактеризовал бактериофаг *A. baumannii*, получил комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, изучил его характеристики, выполнил исследования по внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов и разработал метод оценки специфической активности бактериофагов с использованием клеточных культур.

Посев, выделение чистой культуры из собранного материала, изучение биологических свойств микроорганизмов осуществлялся совместно с врачом-бактериологом на базе клиничко-диагностической лаборатории ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России Климашиной А.В. и на базе арбитражной лаборатории Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора совместно с врачом клинической лабораторной диагностики Бажановой У.А.

Секвенирование генома штаммов *A.baumannii* и депонирование нуклеотидных последовательностей в базу данных Pub MLST проводили совместно с д.м.н., руководителем лаборатории микробиологии Лазаревой А.В. и д.м.н., заведующим лабораторным отделом Маянским Н.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России). Аннотирование и депонирование генома бактериофага *A. baumannii* на сайт NCBI совместно с н.с, руководителем Уральского окружного центра по профилактике и борьбе со СПИД Питерским М.В. (ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Выделенный в госпитальных условиях и охарактеризованный бактериофаг *A. baumannii* и созданная коллекция штаммов бактерий-продуцентов бактериофага являются базой для получения комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный.

2. Быстрым и эффективным методом оценки специфической активности комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный является определение индекса адгезии и процента пораженных клеток микроорганизмов на клеточной культуре ЛЭЧ-3.

3. Способ типирования *P. aeruginosa* с изучением минимальной подавляющей концентрации антибиотиков и использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный, а также разработанная микробиологическая панель для дифференцирования полирезистентных штаммов *A. baumannii* сиквенс-типов ST 1167, ST 208, ST 944 являются перспективным направлением внутривидовой идентификации микроорганизмов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается благодаря значительному объему проведенных исследований (5158 лабораторных исследований), использованных для решения поставленных задач и методов исследования (микробиологических, молекулярно-генетических, методов исследования бактериофагов), применением адекватной статистической обработки первичного материала.

Работа выполнена в рамках реализации отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора «Проблемно-ориентированные научные исследования в области надзора за инфекционными и паразитарными болезнями на 2016 – 2020 годы» по теме НИР: «Разработка и изучение фармакологических свойств медицинских иммунобиологических препаратов на основе биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками животного происхождения. Изучение возможностей использования клеточных культур для биотехнологии» п. 3.1.11. Регистрационный номер в ЕГИСУ НИОКТР АААА-А16-116061710034-6.

Апробация работы состоялась на расширенном заседании отделов эпидемиологии вирусных инфекций и индикации и диагностики вирусных инфекций Екатеринбургского научно-исследовательского института вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол № 2021/05/17 от 27 мая 2021 г.).

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: научно-практической конференции «Многоуровневая система инфекционного контроля и надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи» (Екатеринбург, 2012); заседании Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов (Пермь, 2012, 2015); научно-практической конференции «Актуальные вопросы неотложных состояний в работе многопрофильной больницы» (Дмитровград, 2013); Международном Конгрессе «Современные средства и технологии дезинфекции и стерилизации в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Москва, 2014); Российском конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2015); Всероссийской научно-практической конференции «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Москва, 2015); III Конгрессе лабораторной медицины (Москва, 2017); Конгрессе с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» (Москва, 2017, 2019, 2020, 2021); Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2018).

**ГЛАВА 1. РОЛЬ *ACINETOBACTER BAUMANNII* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* В РАЗВИТИИ ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРЕПАРАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ В МЕДИЦИНЕ
(обзор литературы)**

Среди возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в том числе гнойно-септических инфекций (ГСИ), всё более устойчивые позиции занимают неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб) [199].

27 февраля 2017 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список из 12 видов «приоритетных патогенов», устойчивых к противомикробным препаратам, которые представляют наибольшую угрозу для здоровья человека. В представленном списке *Acinetobacter* вместе с *Pseudomonas* и различными видами *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus* и др.) отмечены как «критические» патогены, для которых необходима разработка эффективных противомикробных средств [14, 76, 177].

Как свидетельствуют результаты многолетних исследований в нашей стране и за рубежом, отмечается постоянный рост частоты инфекций, вызванных *A. baumannii* и *P. aeruginosa* [32, 54, 64, 68, 148, 172]. Именно эти микроорганизмы являются причиной внутрибольничных инфекций в отделениях интенсивной терапии (ОРИТ) [202, 208]. Важной их особенностью является широкая распространенность и высокий уровень резистентности к различным классам антибиотиков [60, 65, 79, 81, 89, 139, 183].

Поскольку штаммы *P. aeruginosa* и *A. baumannii* приобрели обширную устойчивость к карбапенемам, клиницисты чаще прибегают к использованию альтернативных препаратов, включая полимиксины-В и Е (колистин) и тигециклин. Однако использование колистина ограничено его высоким профилем

токсичности, а тигециклин имеет ограниченную эффективность при клиническом применении [96, 118, 201].

1.1 Характеристика *Acinetobacter spp.*

Род *Acinetobacter* согласно современной классификации представлен более чем 50 видами [166], большая часть, из которых для человека являются не патогенными. С широким внедрением молекулярно-генетических методов исследования за прошедшие 10 лет число известных видов *Acinetobacter* увеличилось [77].

Согласно последним таксономическим исследованиям род *Acinetobacter* относится к подклассу γ - *Proteobacteria*, семейству *Moraxellaceae* и включает грамотрицательные, неподвижные, оксидазонегативные, глюкозо-неферментирующие, аэробные, каталазоположительные бактерии [180]. Клетки имеют длину около 1,5 мкм, форма варьирует от кокковидной до коккобациллярной – в зависимости от фазы роста.

Большинство *Acinetobacter* метаболически разнообразны и могут легко выращиваться на простых питательных средах, образуя куполообразные гладкие колонии диаметром до 2-3 мм с бледно-желтым и светло-серым пигментом, некоторые штаммы могут продуцировать слизь. Многие из *A. baumannii* (прежде всего клинические изоляты) формируют полисахаридные капсулы [143, 213]. Спор не образуют. Жгутиков не имеют, но обладают твичинг-подвижностью.

Acinetobacter spp. являются частью нормальной микрофлоры кожи, часто колонизируют слизистые оболочки ротоглотки, пищеварительного тракта, дыхательных путей человека и урогенитального тракта [137]. Это позволяет относить их к малопатогенным микроорганизмам, что чаще всего не требуют специфической терапии.

Однако, появление агрессивных свойств у некоторых штаммов ведет к повышению их вирулентности. Продукция ферментов, разрушающих липиды тканей, образовании гемолитическими штаммами *A. baumannii* токсина, вызывающего разрушение и гибель лейкоцитов, все это может привести к

развитию инфекционного процесса. Ряд ферментов – апоптотининдуцирующие белки, сидерофоры, эндотоксин – являются факторами инвазии [100]. К числу ферментов инвазии *Acinetobacter* принадлежат липазы (в т.ч. фосфолипазы С и D), белки с ДНК-белки (OmpA) активностью, а также сериновая протеаза. Механизмы инвазии включают процессы, направленные на разрушение тканевых барьеров – клеток и межклеточного вещества [111, 173].

Важными факторами адгезии микроорганизмов являются пили [126]. Также адгезия может быть обусловлена аморфным (полисахаридсодержащим) материалом, присутствующим в местах контакта адгезированных бактерий. Ацинетобактерии могут активно проникать через эпителиальные барьеры.

Ежегодно в мире регистрируют 1 миллион (от 600 000 до 1 400 000) случаев инфекций, вызванных микроорганизмами *Acinetobacter spp.* [189], что составляет 1,8% всех случаев внутрибольничных инфекций [186].

Наиболее клинически значимый вид рода *Acinetobacter* – *A. baumannii*. В настоящее время он является одним из наиболее важных возбудителей нозокомиальных инфекций (16,8%). Самая высокая частота встречаемости *A. baumannii* наблюдается в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [84, 157, 197].

Внутрибольничные инфекции, вызванные другими видами *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. radioresistens*, *A. schindleri* и *A. ursingii*, чрезвычайно редки и, как правило, ограничиваются катетер-ассоциированными инфекциями кровотока [131, 211].

Одним из факторов вирулентности *A. baumannii* является его способность к формированию биопленки при контакте с различными поверхностями, что приводит к развитию персистирующей инфекции [154]. Таким образом, тяжелые формы пневмонии и септического процесса, обусловленные этим возбудителем, тесно связаны с аппаратами ИВЛ, внутрисосудистыми катетерами, эндотрахеальными трубками, мочевыми катетерами, на которых происходит формирование микробных биопленок [11]. Биопленка обеспечивает устойчивость

к антимикробным средствам, к дезинфицирующим средствам и препятствует влиянию на возбудитель факторов иммунной системы [79].

Ацинетобактерии могут заселять любые локусы пациентов с минимально подходящими для них условиями и контаминировать самые разнообразные материалы и медицинские объекты [115]. Микроорганизм характеризуется универсальностью метаболической активностью, что обеспечивает ему широчайшую экологическую пластичность [77].

Основным резервуаром *A.baumannii* в стационаре являются колонизированные и инфицированные пациенты. К группам риска относят пациентов пожилого возраста, лиц с нарушенной иммунной системой, онкологических больных, пациентов с ожогами, ранами и сепсисом [20, 114, 167, 170, 194]. Входными воротами ацинетобактерной инфекции нередко являются ротоглотка, дыхательные пути, кожные покровы, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ), мочевыводящая система [95, 128].

Данный микроорганизм связан с высокой смертностью, являясь проблемой общественного здравоохранения во всем мире, и считается приоритетным лекарственно-устойчивым патогеном [53, 222].

Представители *Acinetobacter spp.* характеризуются природной устойчивостью к большинству антибактериальных препаратов, зависящей (в числе прочих факторов) от источника выделения и видовой принадлежности возбудителя. Известно, что штаммы, выделенные от больных, более устойчивы, чем штаммы от медицинского персонала или из объектов окружающей среды [10].

Анализ данных ряда научных работ по изучению антибиотикорезистентности *A.baumannii*, циркулирующих на отдельных территориях Российской Федерации и за рубежом, свидетельствует о четко выраженном процессе развития резистентности и даже панрезистентности возбудителя к современным антибиотикам [21, 133, 153, 194, 213].

Исторически сложилось так, что карбапенемы являются наиболее мощными и надежными β -лактамными антибиотиками для лечения инфекций, вызванных *A. baumannii* [121]. Тем не менее распространенность устойчивых к карбапенемам *A. baumannii* серьезно подрывает использование этих антибиотиков в борьбе с такими инфекциями [174].

В 2017 году согласно списку, опубликованному ВОЗ [210], устойчивый к карбапенемам *A. baumannii* занял первое место среди лекарственно-устойчивых бактерий. Показатели резистентности к карбапенемам среди штаммов *A. baumannii* значительно возросли во многих странах мира [142, 163]. Наиболее распространенный механизм устойчивости *A. baumannii* к карбапенемам включает способность синтезировать карбапенем-гидролизующие β -лактамазы класса D (CHDL). CHDL *A. baumannii* делятся на пять филогенетических подгрупп: OXA-23-подобные, OXA-40-подобные, OXA-51-подобные, OXA-58-подобные и OXA-143-подобные карбапенемазы. У 46,8% штаммов *A. baumannii* выявлено наличие генов, приобретенных карбапенемаз OXA-40 (38,0%), OXA-23 (4,6%) и OXA-58 (4,2%) [66]. По данным зарубежной литературы, в мире существуют схожие тенденции. Исследования, оценивающие антибактериальную устойчивость *A. baumannii* в Южной и Латинской Америке, Европе, Южно-Тихоокеанском регионе, показали, что доля нечувствительных штаммов к меропинему и имипенему составила 45,9% и 48,2% соответственно [84]. В Южной Индии доминирует MBL-карбапенемаза – IMP-1(42%) [209]. В Китае карбапенемаза OXA-23 (97%) является преобладающей детерминантной резистентности, причем 82% этих изолятов принадлежит к (ST 92), который широко распространен по всему миру [104].

Устойчивость к карбапенемам штаммов *A. baumannii* в России в 2015-2016 гг. составила соответственно 77,4% и 77,1% [42]. Более 76% штаммов *A. baumannii* являются продуцентами приобретенных карбапенемаз, относящихся к группам OXA-24/40 (57,5%) и OXA-23 (18,4%). Большая часть устойчивы к ципрофлоксацину (99,0%), амикацину (89,2%) и гентамицину (77,4%).

Резистентность к тобрамицину и триметоприму/сульфаметоксазолу отмечается реже (50,6% и 41,2% соответственно). Наиболее высокой активностью *in vitro* обладает колистин (0,9% резистентных штаммов) [66].

Колистин (полимиксин-В) часто называют антибиотиком резерва для лечения ацинетобактерной инфекции, прежде всего при респираторной патологии, однако в последнее время зарегистрирована устойчивость некоторых штаммов и к этой группе препаратов [67, 104]. Последние данные показывают, что *A.baumannii* может легко адаптироваться к воздействию колистина [116, 145, 167, 206].

Анализ накопленной информации об *A.baumannii* позволяет сделать выводы, прогнозирующие дальнейшее распространение резистентных штаммов данного возбудителя и связанное с этим увеличение заболеваемости и смертности населения [122, 184].

1.2 Характеристика *Pseudomonas* spp.

Род *Pseudomonas* является наиболее разнообразной и экологически значимой группой бактерий на планете. Согласно бактериологической систематике он относится к гамма-подклассу *Proteobacteria* и включает в себя представителей *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas pertucinogena*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri* и *Pseudomonas syringae* [83].

Из всех представителей рода *Pseudomonas* наиболее патогенным для человека является *Pseudomonas aeruginosa*.

P. aeruginosa представляет собой грамотрицательную бактерию. Чаще всего ее можно обнаружить в воде и почве, она является возбудителем некоторых инфекционных заболеваний животных, условно патогенна для человека. Является ярким представителем группы нозокомиальных инфекций [169, 204].

Синегнойная палочка – прямая или искривленная с закругленными концами бактерия, длиной 1-3 мкм. Подвижность обеспечивается наличием одного, редко – двух полярно расположенных жгутиков (монотрихи или амфитрихи). Спор не

образует. При определенных условиях может продуцировать капсулоподобную внеклеточную слизь полисахаридной природы.

Является облигатным аэробом (размножается при доступе кислорода, повышенной влажности). Оптимальная температура роста +37°C, однако способна расти при + 42°C, что позволяет отличить ее от других псевдомонад. В жидкой среде дает помутнение и пленку, на МПА образует колонии средней величины: круглые, полупрозрачные, голубовато-серые с перламутровым оттенком. Характерным признаком *P. aeruginosa* является пигменто – и аромато – образование: благодаря этим свойствам питательные среды при росте микроорганизма окрашиваются в сине-зеленый цвет и имеют характерный запах жасмина, земляники. Пигмент (пиоцианин) растворим в воде, принимает участие в дыхании микроорганизма.

Патогенность *P. aeruginosa* связана с наличием ряда факторов вирулентности. Способностью подавлять биосинтез белка обладают экзотоксин А и пиоцианин; нейраминидаза, отщепляя остатки сиаловых кислот от клеточных рецепторов, облегчает специфическую адгезию бактерии к клеткам хозяина [72].

P. aeruginosa, *P. fluorescens* и *P. putida* способны к формированию биопленок на поверхностях [105]. Существование бактерий в биопленках создает большие проблемы в медицине, поскольку бактерии образуют биопленки на медицинских инструментах, имплантируемом оборудовании и фрагментах мертвой и живой ткани, формируя очаги хронической инфекции.

Важнейший фактор адгезии *P. aeruginosa* являются пили, реснички. Вторым по значимости адгезином являются белки жгутиков – флагеллярные протеины. В совокупности пили и флагеллин вносят наибольший вклад в реализацию адгезии на тканях человека и абиотических поверхностях [124]. Белки, ассоциированные с поверхностной мембраной из семейств Omp (LptF), Opr (OprQ, OprF) обеспечивают адгезию беспилевых штаммов на многих субстратах [89, 92].

Однако, как отмечают некоторые исследователи, на экспрессию вирулентных свойств *P. aeruginosa* оказывают влияние как индивидуальные

особенности взаимодействия макроорганизма с бактерией, так и условия внешней среды [30, 187].

Будучи условным патогеном человека, *P.aeruginosa* способна вызвать широкий спектр опасных для жизни и здоровья острых и хронических инфекций, особенно у людей с нарушенной иммунной системой, стать причиной развития ИСМП среди госпитализированных пациентов и медицинского персонала.

Заражение синегнойной палочкой может произойти в результате медицинских манипуляций (катетеризация мочевого пузыря, эндоскопическое исследование, промывание ран, перевязка, обработка антисептиками ожоговой поверхности, использование аппарата ИВЛ и др.), когда инфицирование происходит через руки персонала, инструменты, на поверхности которых микроорганизм образует биопленку. Также известно, что одним из путей передачи синегнойной инфекции является использование контаминированных растворов.

Борьбу с данным патогеном осложняет развитие устойчивости к широкому спектру антимикробных препаратов [37, 90, 190].

Согласно сообщению Международного комитета по контролю и надзору за нозокомиальными инфекциями [179] *P. aeruginosa* и вызываемые ею инфекции стали одной из основных проблем мирового здравоохранения с 2016 года. Результаты многоцентровых европейских исследований свидетельствуют о том, что до 30% случаев внутрибольничных инфекций в ОРИТ вызваны *P. aeruginosa* [157, 202]. На протяжении ряда лет возбудитель остается одним из ведущих патогенов в России: доля изолятов этого микроорганизма среди всех бактериальных представителей нозокомиальных инфекций в 2015-2016 гг. составляла 17,4% [42]. Частота выделения возбудителя в ОРИТ России по данным национального многоцентрового исследования РИОРИТ достигла 29,9% [61].

Резистентность *P. aeruginosa* ко многим противомикробным препаратам основана на взаимодействии нескольких основных механизмов. Один из главных которых является низкая проницаемость наружных мембран по сравнению с

другими граммотрицательными видами, что препятствует переносу многих антибиотиков внутрь клетки [96, 101, 109, 140].

P.aeruginosa характеризуется наличием механизмов естественной устойчивости к ряду лекарственных средств, включая аминопенициллины, большинству цефалоспоринов, тетрациклинам / глицилциклинам, эртапенемам. Кроме того, важной особенностью этого микроорганизма является очень быстрое формирование устойчивости ко многим другим классам антибактериальных препаратов [161].

Частота устойчивости нозокомиальных штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам, по данным Сухоруковой М.В. и др., в 2015-2016 гг. (в порядке возрастания *in vitro*), составила: к колистину – в 1,4% случаев, азтреонаму – в 41,5%, цефтазидиму/авибактаму – в 41,6%, амикацину – в 47,7%, цефепиму – в 51,5%, тобрамицину – в 54,2%, меропенему – в 55,5%, гентамицину – в 56,3%, цефтазидиму – в 56,8%, пиперациллину/тазобактаму – в 62,0%, ципрофлоксацину – в 63,3%, пиперациллину – в 65,2%, имипенему – в 67,5% и тикарциллину/клавуланату – в 97,6% [81]. У *P.aeruginosa* заметно выросла устойчивость к карбапенемам. Основная защита этих бактерий от β -лактамных антибиотиков – выработка металло-бета-лактамаз (MBL), которые разрушают эту группу антибиотиков, включая карбапенемы. К настоящему времени в мире описаны пять основных типов MBL: IMP, VIM, SPM, GIM и SIM. Более 30% изолятов *P.aeruginosa* продуцируют карбапенемазы: MBL групп VIM (30,5%) и IMP (0,3%) [82, 178, 198, 216].

Таким образом, частота неудач в терапии тяжелых госпитальных инфекций, вызванных *P.aeruginosa*, остается крайне высокой на фоне устойчивости к антибиотикам и высокой циркуляции в медицинских организациях.

1.3 Внутривидовое типирование *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

Внутривидовое типирование микроорганизмов (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*) является неотъемлемой частью работы клинического микробиолога при расшифровке вспышек ГСИ и эпидемиолога в рамках эпидемиологического

надзора за ИСМП [114, 193]. Именно внутривидовое типирование (маркирование) позволяет провести сопоставление бактериальных изолятов по биологическим свойствам и ответить на вопрос о видовом (внутривидовом) однообразии циркулирующей популяции в структурном подразделении или медицинской организации в целом.

Методы типирования, используемые для оценки родства микроорганизмов, можно разделить на фенотипические (основанные на изучении культуральных, тинкториальных, биохимических свойств, антибиотикограммы, био-, серо- и фаготипировании, иммуноблотинге и электрофорезе белков, масс спектрометрии и др.) и генотипические (основанные на изучении плазмидного профиля, рестрикционном анализе плазмидной и хромосомной ДНК, амплификации нуклеиновых кислот, а также на секвенировании отдельных фрагментов генома или полногеномном секвенировании).

Приведенные данные методы различаются по таким характеристикам как воспроизводимость, разрешающая способность, трудоемкость проведения, стоимость, следовательно, требуют особой интерпретации результатов. Основным из этих характеристик (за исключением высокой себестоимости) генотипические методы обладают явными преимуществами. Для двух из генотипических методов (PFGE и MLST – multilocus sequence typing) разработаны стандартные протоколы, которые позволяют получать в различных лабораториях сопоставимые результаты и проводить анализ распространения резистентных клонов микроорганизмов в различных географических широтах, а также в пределах всего Земного шара.

Вместе с тем большинство клинических микробиологических лабораторий России в настоящее время для сравнения бактериальных штаммов использует единственный простой и доступный метод антибиотикограмм (преимущественно диско-диффузионный). Значительное число зарубежных и отечественных исследований, а также опубликованных по их результатам аналитических обзоров посвящено обоснованию внедрения молекулярно-генетических методов

внутривидового типирования, в частности секвенирования, в практику надзора за ИСМП [36, 38, 65]. К наиболее простым в проведении относятся методы, основанные на амплификации, однако они отличаются недостаточной воспроизводимостью.

Следовательно, широкая циркуляция и высокая антибиотикорезистентность ведущих возбудителей *A. baumannii* и *P.aeruginosa* ставят актуальными вопросами сопоставление бактериальных изолятов, циркулирующих в медицинских организациях, поиск доступных и достоверных микробиологических тестов для их внутривидовой идентификации, в том числе с использованием препаратов бактериофагов, которое активно проводилось для дифференциальной диагностики актуальных госпитальных штаммов, в частности для фаготипирования *S. aureus*, начиная с 60-х годов XX века [5, 36].

1.4 Бактериофаги, их особенности и перспективы использования

Бактериофаги (с древнегреч. – «пожирающие бактерии»), или просто фаги, – это вирусы, избирательно поражающие бактерии. Бактериофаги широко распространены в природе. Они могут быть обнаружены во всех объектах, где обитают их хозяева микроорганизмы [1, 97, 130].

Бактериофаги выполняют важную роль в контроле численности микробных популяций и эволюции бактерий [80]. Бактериофаги, будучи подвижными генетическими элементами, служат мощным фактором изменчивости бактерий. По средством трансдукции они приносят в бактериальный геном новые гены. Известно, что за 1 секунду фагами могут быть инфицированы до 1024 бактерий [147]. Это означает, что постоянный перенос генетического материала распределяется посредством бактериофагов между бактериями, обитающими в сходных условиях.

Высокий уровень специализации, быстрая репродукция в соответствующем хозяине, долгосрочное существование способствуют сохранению бактериофагов динамическом балансе среди широкого разнообразия видов бактерий в любой природной экосистеме. При отсутствии подходящего хозяина, многие фаги могут

сохранять способность к инфицированию (без воспроизведения) на протяжении десятилетий, если не будут уничтожены экстремальными веществами или внешними условиями среды.

1.4.1 Структура и жизненный цикл бактериофагов

Мир бактериофагов весьма разнообразен: на сегодня известно более 500 разных видов фагов, отличающихся формой и строением. До сих пор их классификация, как и классификация всех вирусов, претерпевает существенные изменения [85]. Имея общие форму и внешний вид, фаги различных видов микроорганизмов различаются между собой по величине отношений между размерами головок и концевых отростков [71].

Согласно Международному комитету по систематике вирусов ICTV в зависимости от типа нуклеиновой кислоты бактериофаги подразделяются на ДНК и РНК-содержащие. По морфологии фаговых частиц и типу нуклеиновой кислоты они распределены на семейства (Таблица 4). Среди всех бактериальных вирусов фаги порядка *Caudovirales* (от лат. *cauda* – хвост) являются самыми распространенными наиболее изученными вирусами бактерий [85].

Таблица 4 – Таксономия бактериофагов [205]

Бактериофаги	Порядок	Семейства	Строение бактериофага
ДНК-содержащие бактериофаги	<i>Caudovirales</i>	<i>Myoviridae</i>	Головка сферической или овальной формы и сокращающийся хвостовой отросток, двунилевая ДНК
		<i>Siphoviridae</i>	Головка сферической формы и длинный несокращающийся хвостовой отросток, двунилевая ДНК
		<i>Podoviridae</i>	Головка сферической формы и короткий несокращающийся хвостовой отросток, двунилевая ДНК
	<i>Ligamenvirales</i>	<i>Lipothrixviridae</i>	Нитевидная форма, двунилевая ДНК
		<i>Plasmaviridae</i>	Округлая форма, двунилевая ДНК
	<i>Vinavirales</i>	<i>Corticoviridae</i>	Округлая форма, липиды в составе многослойной оболочки, шипы, двунилевая ДНК
		<i>Fuselloviridae</i>	Форма лимона, короткий хвостовой отросток, двунилевая ДНК
	<i>Kalamavirales</i>	<i>Tectiviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, шипы, двунилевая ДНК

Продолжение Таблицы 4

Бактериофаги	Порядок	Семейства	Строение бактериофага
	<i>Petitvirales</i>	<i>Microviridae</i>	Округлая форма, отсутствие хвостового отростка, однонитевая ДНК
	<i>Tubulavirales</i>	<i>Inoviridae</i>	Палочковидная форма, однонитевая ДНК
РНК-содержащие бактериофаги	<i>Mindivirales</i>	<i>Cystoviridae</i>	Сферическая форма, сегментированная
	<i>Levivirales</i>	<i>Leviviridae</i>	Сферическая форма, плюс-РНК

По данным HW. Ackermann и D.Prangishvili (2012), более 90% из 6200 фагов, исследованных с помощью электронной микроскопии, представляют собой фаги порядка *Caudovirales* [34]. Среди всех секвенированных фаговых геномов более 95% также представлено геномами хвостатых фагов. Бактериофаги порядка *Caudovirales* разнообразны, но тем не менее, объединены двумя характерными признаками: все они имеют хвостовые отростки и используют общий механизм упаковки ДНК в капсид [106].

Типичная фаговая частица (вирион) состоит из головки, в которой содержится РНК или ДНК (одно – или двухцепочечной), окруженная белковой или липопротеиновой оболочкой (капсидом), и хвоста белковой трубки, которая используется для инъекции вирусного генетического материала в бактериальную клетку.

Размер генома у разных фагов может различаться. У некоторых он очень мал – (от 3,5 тыс. пар нуклеотидов), в таком геноме хранится информация лишь о 3-4 белках. Размер геномов у других фагов сопоставим с размером геномов крупных, сложноорганизованных вирусов многоклеточных животных, достигая 480 тыс. пар нуклеотидов. Такой геном может кодировать уже до двухсот различных белков.

По характеру взаимодействия фага с бактериальной клеткой и типу жизненного цикла фаги можно разделить на две группы: вирулентные и умеренные. Вирулентные фаги (Т-фаги) или литические, представляют особый интерес для фаготерапии.

Жизненный цикл литического фага обычно состоит из прикрепления/адсорбции к клетке-хозяину, включает контакт между волокнами хвоста и её рецепторами – такими как липополисахаридный слой (ЛПС), пептидогликан (ПГ), наружная мембрана (НМ), фимбрии, жгутик [214]. Помимо рецепторного аппарата, адсорбция фага зависит от физико-химических свойств среды, в которой протекает инфекционный процесс (состав, рН, температура, наличия катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) [139]. На бактериях, полностью лишенных клеточных стенок (протопласты), адсорбция фагов не происходит.

Инъекция ДНК фага внутрь бактериальной клетки происходит под воздействием секретируемых специализированных ферментов, которые разрушают ЛПС, ПГ и НМ, чтобы ввести ДНК фага через хвостовую трубку в клетку-хозяина. Далее происходит процесс репликации, где гены фага разрушают нормальные функции клетки, затем реплицированная фаговая ДНК экспрессирует фаговые «поздние» белки, к которым относятся оболочки фага и фаговый лизоцим или эндолизин, необходимые для сборки вирионов. Сборка и упаковка фаговой частицы происходит, как только белки сборки экспрессируются. Капсид собирается путем инкапсуляции генетического материала фага, а затем отдельно собранный хвост присоединяется к капсиду, чтобы превратиться в полную фаговую частицу. Происходит лизис бактерии и высвобождение фага, полностью сформированный бактериофаг выходит в окружающую среду [150, 207]. Количество новых фаговых частиц, образуемых одной клеткой при фаговой инфекции, называют урожайностью.

Для умеренных бактериофагов возможны два пути развития – литический (сходный с развитием вирулентных фагов) и лизогенный, завершающийся установлением в клетке профага – скрытой неинфекционной формы вируса. При этом геном фага встраивается в бактериальную хромосому или находится в свободном состоянии – так же, как плаزمид. Бактерия, несущая профаг, называется лизогенной; она устойчива к повторному заражению бактериофагом. При определённых условиях (облучение, действие химических реагентов) может

произойти активация профага и развитие бактериофага продолжится по литическому пути.

Однако не всегда удаётся однозначно отнести природные бактериофаги к той или иной группе: умеренные фаги могут образовывать вирулентные мутанты, а геномы истинно вирулентных фагов или их фрагменты могут встраиваться в хромосомы бактерий [147].

Способность бактериофага инфицировать ограниченный круг хозяев продиктована спецификой адсорбционного процесса, зависящего от природы и структурных особенностей рецепторов на поверхности бактериальной клетки. Важную роль при этом играет плотность рецепторов и количество на различных участках клеточной поверхности. Природа рецепторов различна для разных представителей таксономических групп бактерий и в основном определяется составом клеточной стенки и поверхностными структурами [39]. Адсорбция бактериофагов проходит три стадии. На стадии первоначального контакта происходят столкновения между фаговыми частицами и бактериальными клетками за счет Броуновского движения, дисперсии, диффузии или движения жидкости. Затем наступает стадия обратимого прикрепления, бактериофаг остаётся вблизи поверхности клеток для поиска специфичных рецепторов. На последней стадии адсорбции происходит необратимое прикрепление бактериофага. Некоторые бактериофаги обладают ферментативной активностью, обеспечивающей доступ к рецепторам [98]. Белки, локализованные на мембране бактериальной клетки, а также различные участки ЛПС могут служить в качестве рецепторов для бактериофагов. В большинстве случаев фаги требуют наличия двух типов рецепторов [39].

Ввиду сложности строения и высокой плотности упаковки клеточной стенки грамположительных бактерий рецепторы, с которыми взаимодействуют специфичные бактериофаги, в настоящий момент изучены недостаточно хорошо. Подавляющее большинство бактериофагов, использующих для адсорбции альтернативные структуры на поверхности бактериальных клеток (белки,

пелликулы), используют пептидогликан и тейхоевые кислоты для обратимого прикрепления [98, 175].

Бактериальные структуры, обращённые в окружающую среду, такие как капсула, жгутики и пили, также могут участвовать в процессе адсорбции бактериофагов [162]. Адсорбция бактериофагов на капсуле, а также в слое слизи образована вырабатываемыми бактериями липкими веществами, состоящими из полисахаридов и белков [156]. Некоторые бактериофаги для рецепции используют одновременно белковые и полисахаридные структуры [123, 144].

Большинство бактериофагов, взаимодействующих с экзополисахаридами и обладающих рецептор-распознающими белками, относятся к семейству *Podoviridae*.

1.4.2 Применение бактериофагов в диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней

Антибиотики, несомненно, являются одной из наиболее важных групп лекарственных препаратов в борьбе с бактериальными инфекциями. Однако их широкое применение и бесконтрольное использование, способствовало появлению и распространению резистентности к ним микроорганизмов [70]. Основными причинами распространения антимикробной резистентности является бесконтрольное применение антибиотиков, назначение препаратов широкого спектра действия без предварительного исследования возбудителей инфекции на чувствительность к ним, назначение лекарственных препаратов в неадекватных дозах.

В мае 2015 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала резистентность к антибиотикам причиной кризиса современной медицины и предложила Глобальный план борьбы с устойчивостью к противомикробным препаратам [223].

В 2017 году постановлением Правительства Российской Федерации принята Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года. Стратегия, прежде всего,

направлена на совершенствование контроля за рецептурным отпуском противомикробных средств и их рациональным использованием в здравоохранении, ветеринарии и сельском хозяйстве [59].

В этой связи ключевыми задачами являются разработка и внедрение в клиническую практику дополнительных средств борьбы с инфекционными заболеваниями, в качестве которых, несомненно, можно рассматривать бактериофаги [24]. Имеющие литературные данные указывают на возможность широкого использования этих препаратов во многих областях инфекционной патологии человека и как средств очаговой и профилактической дезинфекции [7, 33, 40, 103].

Использование бактериофагов в лечении инфекционных заболеваний имеет многолетнюю историю [6]. Первым предложил использовать бактериофаги в терапевтических целях канадский ученый Félix d'Hérelle в 1919 году [113]. В госпитале Hôpital des Enfants-Malades в Париже d'Hérelle вместе с профессором Victor-Henri Hutinel и его ассистентами назначили бактериофаг 12-летнему мальчику, больному тяжелой формой дизентерии. В дальнейшие годы французскими и американскими фармацевтическими компаниями было налажено промышленное производство бактериофагов. Коммерческая лаборатория d'Herelle в Париже выпускала пять разновидностей лечебных бактериофагов. Впоследствии производство фагов во Франции реализовывала компания L'Oréal [191]. В США в 40-е годы XX века Eli Lilly Company (Indianapolis, Ind.) осуществляла производство 6 видов бактериофагов. После появления пенициллинов (1929г.) интерес к фаговой терапии угас [212], а широкое использование бактериофагов в качестве лечебных препаратов не нашло своего дальнейшего распространения [94]. Однако несмотря на это, в Советском Союзе и некоторых странах Восточной Европы научные исследования по фаготерапии не прекращались [22, 33, 138].

В результате, производство бактериофагов сохранилось только в СССР и Польше. На территории бывшего СССР, в Тбилиси, где располагался передовой центр по исследованию лечебных бактериофагов и их фармацевтическому

производству, по инициативе грузинского микробиолога Георгия Элиава был создан Институт исследования бактериофагов. Кроме Тбилиси, на территории бывшего СССР в промышленном масштабе бактериофаги выпускали в г. Уфе, г. Горьком (Нижем Новгороде), г. Перми и др.

Терапия фагами чаще стала рассматриваться как дополнительная, и даже альтернативная позиция для лечения и профилактики инфекционных осложнений. Положительные качества бактериофагов заключаются в их тропности к соответствующим бактериям, полном отсутствии побочных эффектов, как со стороны желудочно-кишечного тракта, так и со стороны других органов и систем организма, а также сочетание со всеми видами антибактериальной терапии. Отличительными чертами фаготерапии являются возможность их применения пациентами с аллергическими реакциями и иммунодефицитами, отсутствие токсических и тератогенных эффектов [203]. Отмечают также возможность стимуляции бактериофагами факторов специфического и неспецифического иммунитета, что особенно значимо при лечении рецидивирующих воспалительных заболеваний [165].

Спектр бактериальных инфекций, где с успехом применяются бактериофаги, достаточно широк [8, 45]. Их можно использовать для лечения пациентов с ГСИ различной локализации – дыхательных путей, ЛОР– и мочеполовых органов, в области хирургического вмешательства и др. [2, 25, 75, 200]. Кроме того, бактериофаги использовали для лечения ряда заболеваний беременных женщин в сочетании с другими антимикробными средствами [13]. Широкие перспективы использования препаратов бактериофагов с профилактической целью обусловлены их воздействием на источник возбудителя инфекций для профилактики заноса в стационар на догоспитальном этапе, прерыванием путей и факторов передачи в качестве средств профилактической и очаговой дезинфекции, воздействием на восприимчивый организм у госпитализированных пациентов с лечебной и профилактической целью [5]. Так, коррекция лечебных мероприятий, направленная на санацию женщин в период

беременности, а также профилактических и противоэпидемических мероприятий при ИСМП в акушерских стационарах с использованием препаратов бактериофагов показали их высокую эффективность, снизив заболеваемость в 5,4 раза [9, 26].

К недостаткам некоторых лечебных препаратов бактериофагов можно отнести их высокую специфичность. Однако эффективность эмпирической фаговой терапии преодолевается путем использования комбинированных препаратов, представляющих собой набор фагов сразу к нескольким возбудителям [74]. В их числе – пиобактериофаг, секстафаг для лечения гнойно-септических заболеваний, интести-бактериофаг против кишечных инфекций и др. [16, 29].

В современных условиях бурного развития высоких медицинских технологий и активной централизации учреждений здравоохранения актуальность проблемы качественного оказания медицинской помощи при высокой интенсивности лечебно-диагностического процесса диктуют необходимость эффективного проведения противоэпидемических и профилактических мероприятий. В этой связи изучение возможности использования препаратов бактериофагов в высокотехнологичных медицинских центрах является актуальным и своевременным. Именно в этих учреждениях отмечается высокая концентрация источников возбудителей инфекций; применение антибиотиков, антисептиков и дезинфицирующих средств резерва, формирующих быструю лекарственную устойчивость; активное распространение внутрибольничных штаммов микроорганизмов, обладающих высоким эпидемическим потенциалом; увеличение контингентов риска – пациентов, выхаживаемых благодаря достижениям современной медицины; возрастание доли тяжелобольных и людей со сниженной неспецифической резистентностью; использование сложной техники, требующей специальных условий и методов обработки.

Бактериофаги *A. baumannii*

Интерес к бактериофагам, поражающим вид *Acinetobacter* вырос в последние годы, в основном, за счет выраженного процесса развития резистентности и даже панрезистентности *A. baumannii* к современным антибиотикам.

С 1966 года зарегистрировано более 100 бактериофагов, специфичных для рода *Acinetobacter*, принадлежащих к семействам *Leviviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae* [86]. Также в последнее время увеличились сообщения о получении терапевтических фагов в качестве биоконтролирующего агента против *A. baumannii* [181, 185].

Сегодня не существует коммерческих препаратов бактериофагов для лечения инфекций, вызванных *A. baumannii*. На территории РФ зарегистрирован бактериофаг *A. baumannii* AP22, который в 2010 году получен сотрудниками Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) [58]. Данный бактериофаг выделен из клинического материала от пациента из ожогового центра Научно-исследовательского института скорой помощи им. Н.В. Склифосовского (г. Москва). По таксономии вирусов бактериофаг AP22 отнесен к семейству *Myoviridae*, морфотипу A1. Бактериофаг AP22 специфически инфицировал и лизировал 68 % (89 из 130) штаммов *A. baumannii*. Обладает высокой скоростью адсорбции к бактериям (более 99 % фаговых частиц адсорбировались в течение 5 минут) и высокой урожайностью – 240 фаговых частиц на одну инфицированную бактериальную клетку.

Также в исследовании двух новых бактериальных вирусов (vB_AbaP_AS11 и vB_AbaP_AS12 (AS11 и AS12), специфически инфицирующих *A. baumannii*, участвовали ученые из МФТИ, Института антимикробной химиотерапии Смоленского медицинского университета, Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии, Института молекулярной генетики и биологии гена РАН, Сколтеха, Института биоорганической химии им.

Шемякина-Овчинникова, Санкт-Петербургского медуниверситета. Выделенные и охарактеризованные два бактериофага, которые были отнесены к роду *Fri1virus*, подсемейству *Autographivirinae* семейства *Podoviridae* характеризовались быстрой адсорбцией к бактериальной клетке-хозяину и высоким выходом фагового потомства [171].

По литературным данным, во многих странах мира ведётся активная работа по получению новых видов бактериофагов против *A. baumannii* [219].

Так, фаги АВ1 и фАВ2 против *A. baumannii* подробно охарактеризованы и зарегистрированы в 2010 году в Китае [152, 218]. Фаг АВ1 принадлежал к семейству *Siphoviridae*, обладал узкой специфичностью. Длительность латентного периода составляла 18 минут, урожайность фаговых частиц – 409, в то время как фаг фАВ2 семейства *Podoviridae* характеризовался быстрой адсорбцией (более 99% фаговых частиц проникает в клетку в течение 8 минут), латентным периодом менее 10 минут, урожайностью 200 фаговых частиц и широким кругом биологических хозяев. Было установлено, что фаг фАВ2 потенциально может использоваться в качестве антибактериального средства для мытья рук [110].

Бактериофаги *A. baumannii* WCHABP1 и WCHABP12 рода Ap22virus в семействе *Myoviridae* были выделены из образцов сточных вод, собранных на притоке очистных сооружений Западного Китая в сентябре 2016 года. Исследования показали, что оба фага обладали хорошей активностью в отношении карбапенем-устойчивых штаммов *A. baumannii* [221]. Аналогичные результаты установили высокую эффективность фагов SH-Ab15519 и AB 5057 на мышинной модели [132, 176]. Также сообщалось, что фаг vB_AbaM-IME-AB2, принадлежащий семейству *Myoviridae* с латентным периодом 20 минут и выходом фаговых частиц 62, обладал высокой чувствительностью к штаммам *A. baumannii* [168, 195].

К последним разработкам можно отнести получение фага *A. baumannii* Вф-R2096 (2019), выделенного из сточных вод в Южной Корее. Был проанализирован его полный геном, установлена принадлежность к семейству *Myoviridae*.

Исследования *in vivo* не выявили серьезных побочных эффектов в группах живых экспериментальных моделей, обработанных фагом [135].

Бактериофаги *P. aeruginosa*

Согласно данным научной литературы, из 137 известных в мире секвенированных фагов против *Pseudomonas*, 85% принадлежат к отряду *Caudovirales* и являются специфичными для вида *P. aeruginosa*. Большинство (60%) из них представляют собой литические фаги, тогда как 21,8% являются умеренными, а 18,2% не классифицированы. Среди фагов *P. aeruginosa* 41% принадлежат к семейству *Myoviridae*, 38% – к семейству *Podoviridae*, наименее представительной является группа сифовирусов – 20%. Только 1% от количества литических фагов остается неклассифицированным [91, 108].

В России для лечения и профилактики синегнойной инфекции фаги *P. aeruginosa* используются широко. Клиническая практика применения таких препаратов свидетельствует об их эффективности в 77- 93% случаях [4, 23].

Ряд исследователей за рубежом также отмечает высокую антимикробную активность выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* [117, 188]. Так, Ken Fukuda с соавторами [119] изучали терапевтический эффект фага *P. aeruginosa* KPP12 (семейства *Myoviridae*), выделенного из реки Кочи (Япония) на 8-недельных мышах. Фаги *P. aeruginosa* фMR299-2 (семейства *Podoviridae*) и фNH-4 (семейства *Myoviridae*), бактериофаг *P. aeruginosa* P3_СНА (семейства *Myoviridae*) были выделены из сточных вод [87, 160]. Для оценки эффективности и безопасности терапии у человека Wright et al. использовали фаговый коктейль под названием BioPhage-PA – для проведения в 2009 году первого контролируемого клинического исследования фазы I/II в лечении пациентов с синегнойной инфекцией, которая вызвала у пациентов хронический отит [215]. Первое подробное описание мелкосерийного производства препарата, состоящего из бактериофагов, используемых для лечения инфекций *P. aeruginosa*, привело к испытанию их безопасности и эффективности у пациентов с ожоговыми ранами. Коктейль состоял из фагов *P. aeruginosa* 14/1 (*Myoviridae*) и PNM (*Podoviridae*),

его распыляли на инфицированную рану в ожоговом центре военного госпиталя Королевы Астрид в Брюсселе (Бельгия) [158].

Следует отметить, что основной проблемой фаготерапии, как и антибиотикотерапии, может стать формирование устойчивости. Первичная фагорезистентность бактерий может быть связана с отсутствием специфических рецепторов для бактериофагов на поверхности микробной клетки [149]. Заслуживает внимания распространение приобретенной устойчивости к бактериофагам именно среди *P. aeruginosa* [7, 17]. В этой связи определение чувствительности микроорганизмов к препаратам бактериофагов является не менее важным, чем к антибиотикам [5]. Перспективным является создание препаратов, содержащих несколько рас бактериофагов, что позволит расширить спектр эффективной фаготерапии. Такой подход позволит снизить риск возникновения невосприимчивых к разнородному «фаговому коктейлю» бактериальных штаммов за счет присутствия в нем бактериофагов, взаимодействующих с различными рецепторами на поверхности бактериальной клетки [3, 56, 146].

Таким образом, перечисленные выше проблемы позволяют сделать вывод о необходимости получения нового комплексного бактериофага *A. baumannii* и *P. aeruginosa* с изучением возможности его использования с лечебной, профилактической и диагностической целью.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО БАКТЕРИОФАГА АЦИНЕТОБАКТЕР-СИНЕГНОЙНЫЙ. СОЗДАНИЕ МУЗЕЙНОЙ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ – ПРОДУЦЕНТОВ БАКТЕРИОФАГА *ACINETOBACTER BAUMANNII*. ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ К АНТИБИОТИКАМ И К КОМПЛЕКСНОМУ БАКТЕРИОФАГУ

2.1. Распространенность в медицинских организациях и чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

В 2013–2017 гг. проведен анализ результатов бактериологических исследований 18693 биологических образцов, выделенных от пациентов из отделений многопрофильных стационаров и поликлинического звена, а также с объектов внешней среды (ФГБУЗ ПКЦ ФМБА России, г.Пермь; МБМУ «Городская Больница № 3», г. Соликамск). Микробиологические исследования проведены на базе бактериологических лабораторий (отделов) медицинских организаций (МО) и представлены в рамках годовых отчетных форм Пермского края (ф.30), постановление Госкомстата России от 4 сентября 2000 г. №76 «Об утверждении статистического инструментария для организации Минздравом России статистического наблюдения за деятельностью медицинских учреждений».

Установлено, что в структуре микрофлоры, циркулирующей в медицинских организациях, представители рода *Staphylococcus* составили 29,0%, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОб) – 25,8%, *Enterobacteriaceae* – 22,6%, *Enterococcus* – 19,4%, прочие микроорганизмы (*Candida spp.*, *Streptococcus spp.*, *Corynebacterium spp.* и др.) – 3,2% (Рисунок 1).

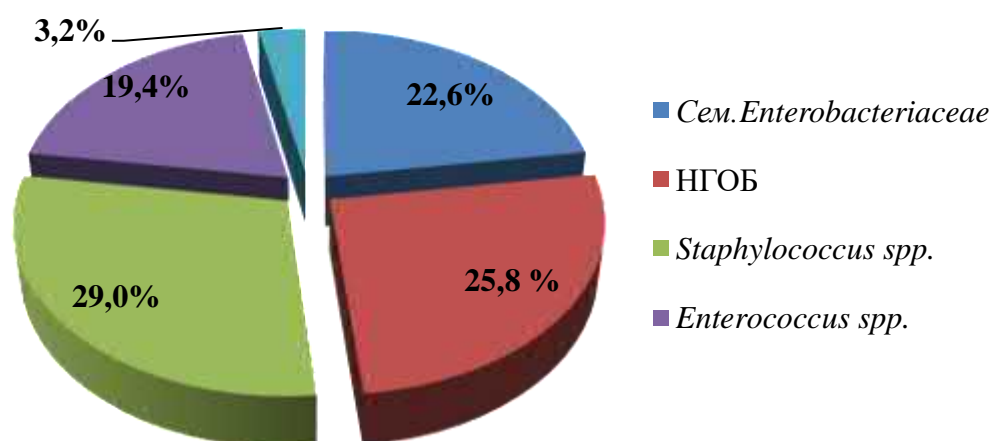


Рисунок 1 – Структура микрофлоры от пациентов и из объектов внешней среды из 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.)

Частота встречаемости НГОБ в биологических материалах от пациентов и объектов внешней среды за 5 лет составила 25,8 % (95% ДИ [25,0 – 26,5]) с интервалом колебания показателя от 17,2 (95% ДИ [15,9– 18,7]) в 2015г. до 36,0 (95% ДИ [34,5– 37,6]), $p=0,0001$ в 2017г. (Таблица 5).

Таблица 5 – Частота встречаемости НГОБ неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ), циркулирующих в 2-х медицинских организациях Пермского края (2013 – 2017 гг.)

Годы	Всего образцов	Количество выделенных микроорганизмов (абс.)	Количество выделенных НГОБ		95% ДИ
			(абс.)	%	
2013	2843	1705	390	22,8	[20,9 – 24,9]
2014	3238	1915	610	31,8	[29,8 – 34,0]
2015	3733	2721	469	17,2	[15,9 – 18,7]
2016	4349	2954	542	18,3	[17,0 – 19,8]
2017	4540	3787	1364	36,0	[34,5 – 37,6]
Всего	18693	13082	3375	25,8	[25,0 – 26,5]

Наиболее часто НГОБ обнаруживали в образцах из нижних отделов дыхательных путей (НОДП) – 1360 (40,3 %) и раневого отделяемого – 891 (26,4%). Из мочи выделено 229 (11,2%), мазков из уха – 250 (7,4%), зева – 145

(6,2%), секционного материала (ткань легкого, сегментарные бронхи) – 125 (3,7%), крови – 88 (2,6%), фекалий – 74 (2,2%) штаммов (Рисунок 2).

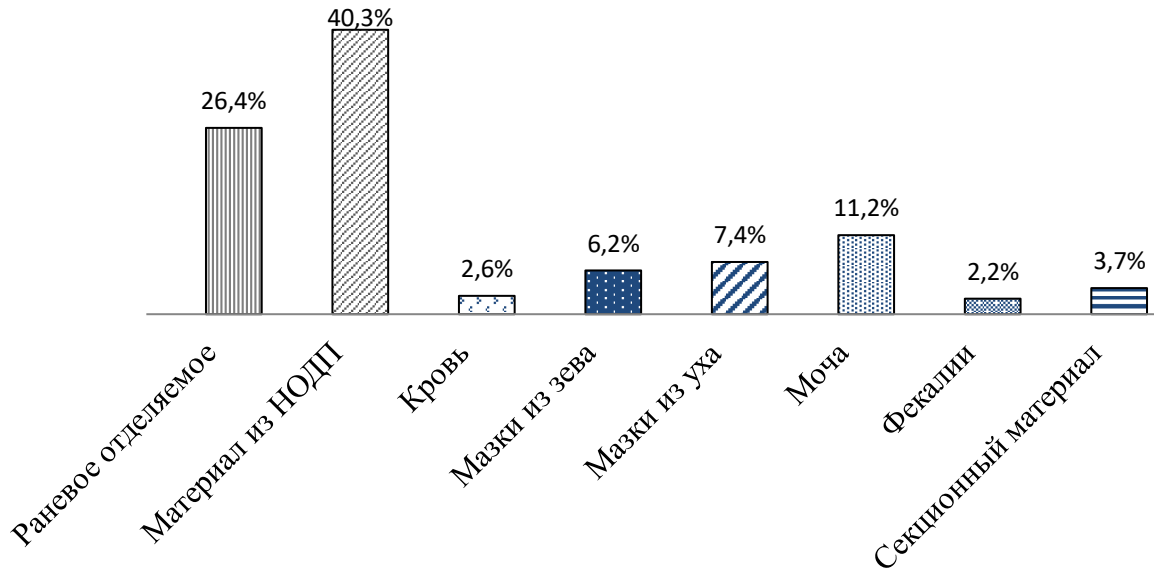


Рисунок 2 – Биологические образцы от пациентов из 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.) с выделенными неферментирующими грамотрицательными бактериями

Примечание: НОДП – нижние отделы дыхательных путей

Из объектов внешней среды представители НГОБ выделены в 213 (6,3%) случаях. Следует отметить, что НГОБ чаще встречались на санитарно-техническом оборудовании (74,2%) (Рисунок 3).

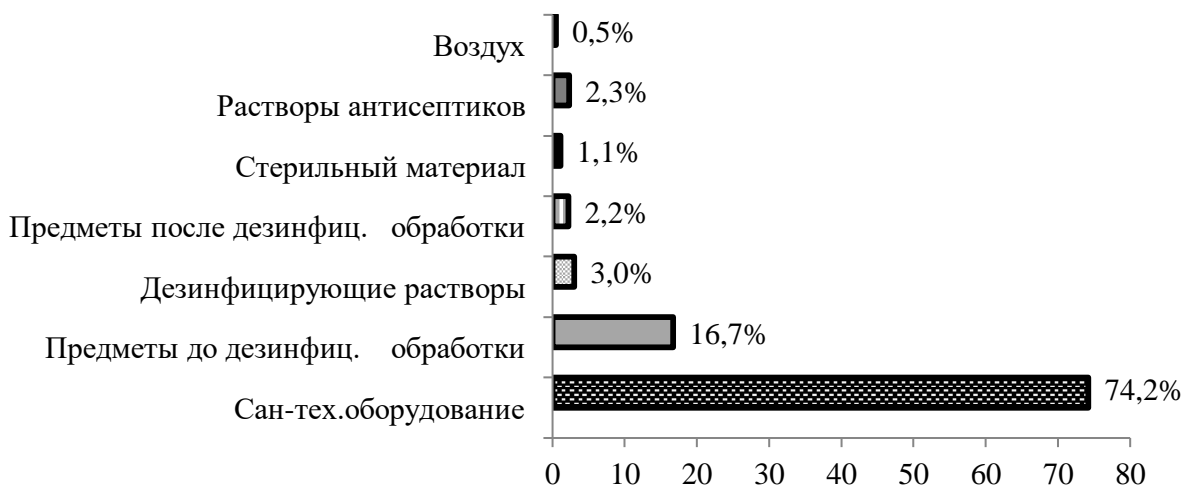


Рисунок 3 – Объекты внешней среды из 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.) с выделенными неферментирующими грамотрицательными бактериями

Установлено, что чаще других были контаминированы: поддоны в душевой, ванны, раковины, канализационные трубы и соединительные части к ним. В меньшей степени НГОБ обнаруживали в воздухе (0,5%) и в материалах, прошедших стерилизационную или дезинфекционную обработку (1,1 % – 2,2 %).

Представители НГОБ в биологическом материале от пациентов и на объектах внешней среды медицинских организаций обнаруживали 33,6% (*P.aeruginosa*) и в 30,8% (*A. baumannii*) случаев (Таблица 6).

Таблица 6 – Видовой состав и доля НГОБ, выделенных из биологических образцов от пациентов и с объектов внешней среды 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.)

Вид микроорганизма	Выделено из биологических образцов от пациентов и объектов внешней среды		Выделено из биологических образцов от пациентов		Выделено с объектов внешней среды	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1135	33,6	518	23,4	617	53,1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1041	30,8	846	38,2	195	16,8
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	445	13,2	312	14,1	133	11,5
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	80	2,4	64	2,9	16	1,4
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	265	7,9	122	5,5	143	12,3
<i>Acinetobacter pittii</i>	98	2,9	71	3,2	27	2,3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	87	2,6	68	3,1	19	1,6
<i>Pseudomonas putida</i>	10	0,3	10	0,5	0,0	0,0
<i>Acinetobacter junii</i>	140	4,1	140	6,3	0,0	0,0
<i>Alcaligenes calcoaceticus</i>	74	2,2	63	2,8	11	0,9
Всего:	3375	100	2214	100	1161	100

Меньшую долю занимали *S. maltophilia* (13,2%). Удельный вес других представителей, не превышал 7,9% – *A.lwoffii*, 4,1% – *A.junii*, 2,9% – *A. pittii*, 2,6% – *A.faecalis*, 2,4% – *P.alcaligenes*, 2,2% – *A.calcoaceticus*, 0,3% – *P.putida*.

A. baumannii чаще встречался у пациентов (38,2%) случаях, *P. aeruginosa* – в объектах внешней среды (53,1 %).

Для оценки чувствительности *P. aeruginosa* (n=1135) к антибактериальным препаратам были проанализированы данные статистической отчетной формы (ф.

30). Штаммы *P. aeruginosa* обладали высокой чувствительностью к полимиксину – $96,8 \pm 0,5\%$ и цефоперазон/сульбактаму – $93,8 \pm 0,7\%$ (Рисунок 4).

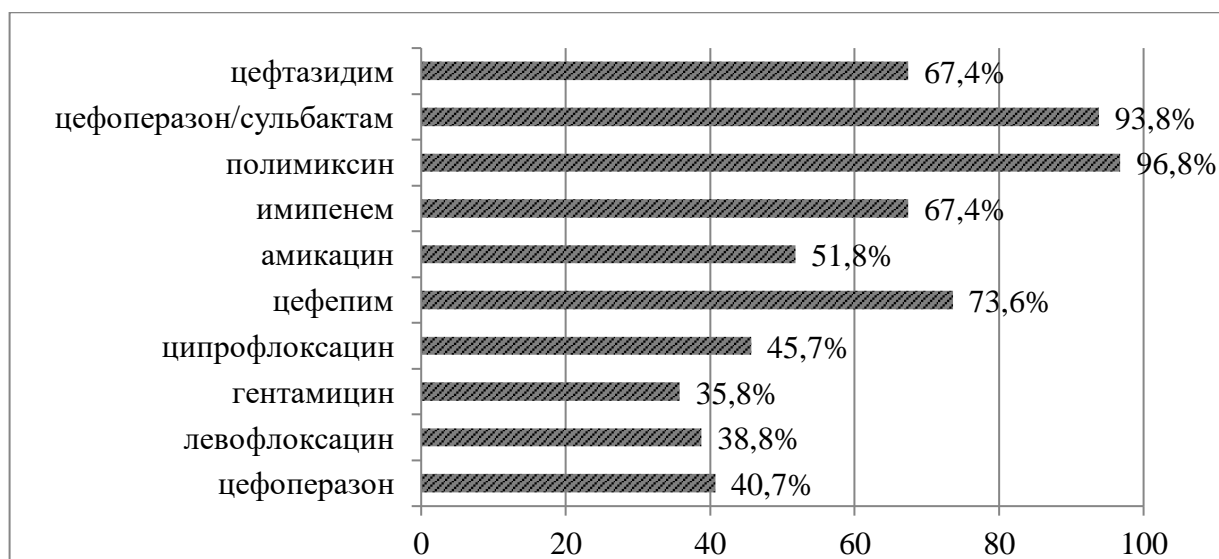


Рисунок 4 – Результаты оценки чувствительности штаммов *P.aeruginosa* (n=1135), выделенных из 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.) к антибактериальным препаратам

Чувствительность к цефепиму составила $73,6 \pm 1,3\%$, имипенему – $67,4 \pm 1,4\%$, цефтазидиму – $67,4 \pm 1,4\%$. Ниже уровень чувствительности оказался к амикацину – $51,8 \pm 1,5\%$, ципрофлаксацину – $45,7 \pm 1,5\%$, цефоперазону – $40,7 \pm 1,5\%$ и левофлоксацину – $35,8 \pm 1,5\%$.

Мониторинг чувствительности *A. baumannii* (n=1041) к цефтазидиму (10 мкг/мл), цеферазон/сульбактаму (50/50мкг/мл), полимиксину (300 ед.), имипенему (10 мкг/мл), амикацину (30 мкг/мл), цефепиму (30 мкг/мл), ципрофлоксацину (5 мкг/мл), гентамицину (10 мкг/мл), левофлоксацину (30 мкг/мл), цефоперазону (10 мкг/мл), тигециклину (15 мкг/мл) аналогично выявил высокий уровень только к цефоперазон/сульбактаму – $98,0 \pm 0,4\%$ и полимиксину – $97,4 \pm 0,5\%$. Большая часть штаммов *A. baumannii* была резистентна к испытуемым антибиотикам. Самый низкий уровень чувствительности выявлен к гентамицину – $14,8 \pm 1,1\%$ (Рисунок 5).

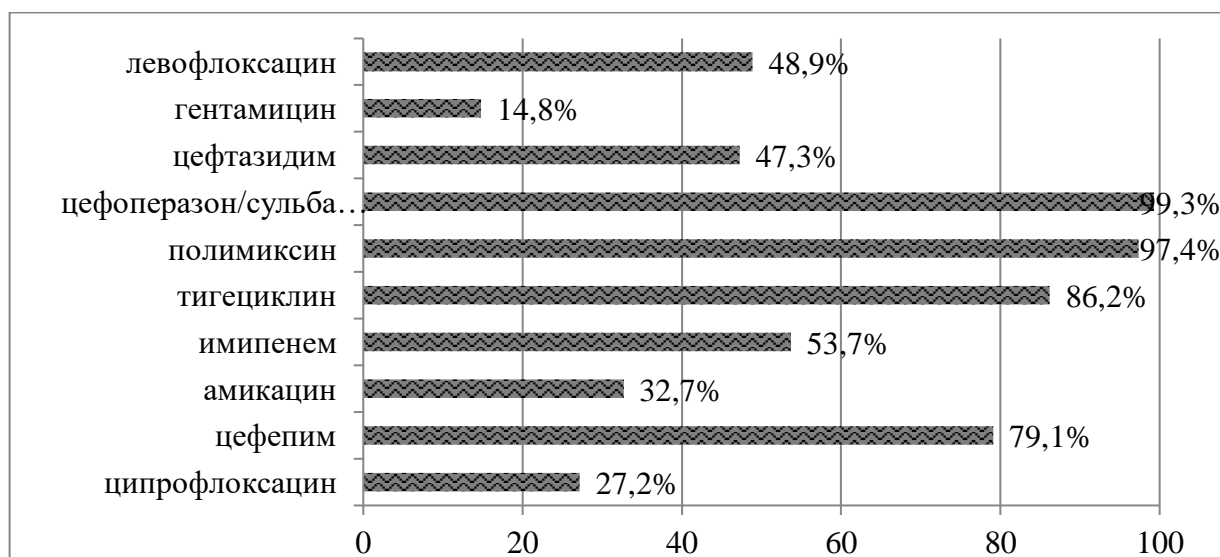


Рисунок 5 – Результаты оценки чувствительности штаммов *A.baumannii* (n=1041) выделенных из 2-х медицинских организаций Пермского края (2013 – 2017 гг.) к антибактериальным препаратам

К имипенему чувствительность составила $53,7 \pm 1,5\%$, цефтазидиму – $47,4 \pm 1,5\%$, левофлоксацину – $40,9 \pm 1,5\%$, цефепиму – $36,7 \pm 1,5\%$, амикацину – $32,7 \pm 1,4\%$, ципрофлоксацину – $27,3 \pm 1,4\%$.

Таким образом, в медицинских организациях в структуре неферментирующих грамотрицательных бактерий установлена высокая доля циркуляции штаммов *P. aeruginosa* (33,6%) и *A. baumannii* (30,8%).

Исходя из полученных результатов, наши дальнейшие исследования были направлены на выделение из биологических материалов от пациентов и объектов больничной среды бактериофага *A.baumannii* с формированием коллекции штаммов бактерий-продуцентов бактериофага *A.baumannii*.

2.2. Выделение бактериофага *A.baumannii* из биологических образцов и объектов внешней среды

При выборе объектов поиска бактериофагов исходили из того обстоятельства, что в естественных условиях фаги должны обнаруживаться там, где встречаются их бактерии-хозяева.

Исследовано 152 образца из ОРИТ хирургического и терапевтического профиля, сомато-психиатрического отделения (СПО) (ФГБУЗ ПКЦ ФМБА

России, ГБУЗ ПК «КМСЧ№1»). В их числе от пациентов – 102 (67,1%) проб, с объектов больничной среды – 50 (32,9%). Из них 8 образцов дали положительный результат (частота выделения бактериофагов составила 5,3 на 100 проб исследуемого материала). Таким образом, каждая 20-я проба, взятая в медицинском учреждении, содержала бактериофаг *A. baumannii*. Из них 6 положительных проб были получены из биологического материала от пациентов (бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), раневое отделяемое и 2 положительные пробы – из объектов внешней среды (сточные воды) (Таблица 7).

Таблица 7 – Объекты поиска и выделения ацинетобактерного бактериофага из медицинских организаций (2014 – 2017гг.)

Материал	Количество образцов (абс.)	Количество выделенных фагов	
		(абс.)	(%)
Биологический материал			
Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ)	26	3	37,5
Мокрота	22	-	-
Мазок из зева	15	-	-
Раневое отделяемое	30	3	37,5
Моча	9	-	-
Итого:	102	6	75,0
Объекты внешней среды			
Содержимое дренажей	14	-	-
Мембранные фильтры ИВЛ	19	-	-
Перевязочный материал	12	-	-
Перчатки после манипуляции	8	-	-
Смыв с аппарата ИВЛ	6	-	-
Стол медицинский манипуляционный	2	-	-
Сточные воды	3	2	25,0
Итого:	50	2	25,0

Большинство фаголизатов (75,0%) были выделены из образцов биологического материала от пациентов.

Для получения максимального титра бактериофагов штамм-хозяин *A. baumannii* выращивали в жидкой среде МПБ до середины логарифмической фазы роста ($OD_{600\text{ нм}} = 0,3$) и инокулировали фаговым лизатом для получения множественности инфекции 0,001 (заражали бактериофагом таким образом,

чтобы множественность инфицирования составляла 1 бактериофаг на 10 бактериальных клеток, и инкубировали до заметного лизиса жидкой культуры). Полученные фаговые лизаты очищали от клеточного дебриса центрифугированием при 3500 об/мин в течение 15 мин и последовательным фильтрованием через мембранные фильтры 0,45 мкм и 0,22 мкм (Millipore, Корт, Ирландия), обрабатывали хлороформом в соотношении 10:1 с энергичным встряхиванием в течение одной минуты.

Концентрацию бактериофага в фаголизатах оценивали стандартным методом титрования по Грациа. Для изучения спектра литического действия полученных фаголизатов использовали контрольный штамм *A. baumannii* (ATCC® 19606) из ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России и штаммы рабочей коллекции *A. baumannii*, выделенных из 2-х организаций (n=10).

На бактериальном газоне чувствительного к фагу штамма *A. baumannii* (№12) ацинетобактерный бактериофаг формировал круглые прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 2-3 мм, окружённые непрозрачным ореолом (Рисунок 6).

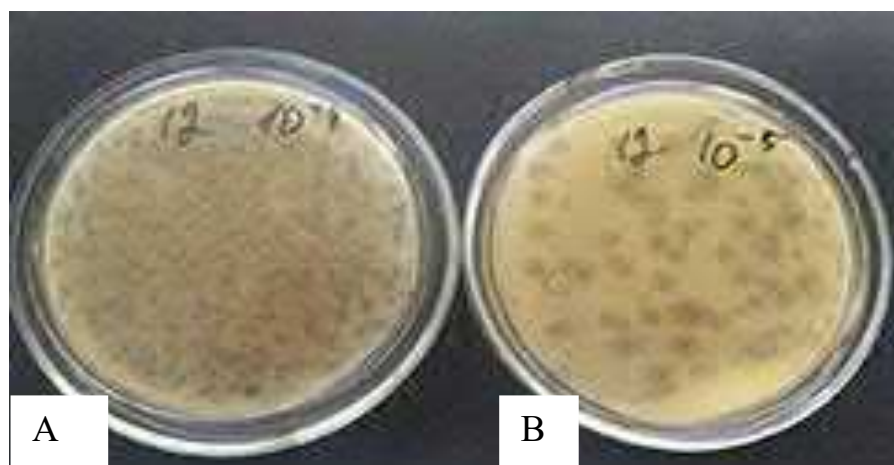


Рисунок 6 – Негативные колонии бактериофага *A. baumannii* при титровании по методу Грациа на газоне бактериальной культуры в разведении фага 10^{-4} (А), в разведении фага 10^{-5} (В)

Негативные колонии фага формировались на чашках уже после 4-х часов инкубации при температуре + 37 °С. Зоны фаголизиса (прозрачных бляшек) оставались постоянными.

Активность фага определяли способом титрования в жидкой питательной среде (МПБ) по величине, соответствующей последнему разведению инокулята, в котором рост бактерий визуально не наблюдался (метод Аппельмана). Результат обозначали отрицательной степенью десяти, где степень указывала на разведение фага в питательном бульоне (Таблица 8).

Таблица 8 – Специфическая активность фаголизатов *A. baumannii*, полученных из медицинских организаций г. Перми (2014 – 2017 гг.) и оцененных по методу Аппельмана

№	Номер пробы	Материал	Специфическая активность фага по методу Аппельмана
1	28	Бронхоальвеолярный лаваж	10 ⁻⁵
2	29	Бронхоальвеолярный лаваж	10 ⁻⁵
3	31	Бронхоальвеолярный лаваж	10 ⁻⁴
4	70	Раневое отделяемое	10 ⁻⁵
5	74	Раневое отделяемое	10 ⁻⁴
6	80	Раневое отделяемое	10 ⁻⁴
7	23	Сточные воды	10 ⁻⁵
8	25	Сточные воды	10 ⁻⁵
	$\bar{x} \pm SE$		10 ^{-4,62 \pm 0,18}

Далее, методом «спот-тест» на питательном агаре Мюллер-Хинтона проверяли чувствительность штаммов *A. baumannii* к полученным фаголизатам. При визуальном осмотре на чашках питательного агара с чувствительными культурами *A. baumannii* в месте нанесения фаголизата наблюдалось образование прозрачной зоны лизиса (стерильного пятна) и сохранялось 24 часа.

Исходя из того, что все 8 полученных фаголизатов обладали однотипными свойствами: лизисом штаммов *A. baumannii* с одинаковыми биохимическими и культуральными свойствами, уровнем литической активности фага по методу Аппельмана, было принято решение объединить их в один фаголизат.

2.2.1. Свойства ацинетобактерного бактериофага

Экспериментальный образец ацинетобактерного бактериофага получали из изолированной негативной колонии, образованной на чашке МПА с посевной

культурой и нанесенным на поверхность фагом, после 3-х последовательных пересевов. Штамм *A. baumannii* № 204, выделенный из раневого отделяемого пациента сомато-психиатрического отделения ФГБУЗ ПКЦ ФМБА России, показал самую высокую восприимчивость к фагу и был выбран в качестве штамма-хозяина для дальнейшего увеличения фагов.

Полученный бактериофаг подвергли электронно-микроскопическому анализу. По оценке результата, в смеси фаголизатов был обнаружен один вид бактериофага (Рисунок 7). По морфологическим признакам он принадлежал к морфогруппе C1 семейства *Podoviridae*.

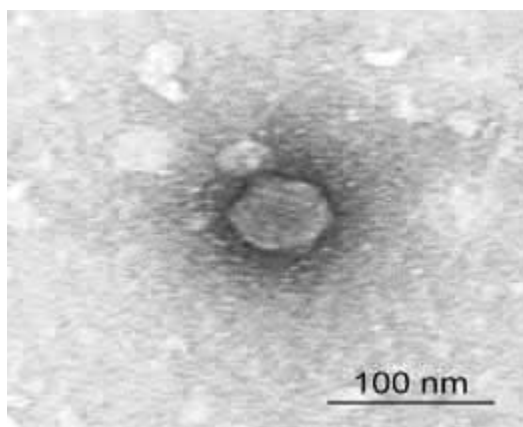


Рисунок 7 – Электронная микроскопия бактериофага *A. baumannii* («Hitachi H-300, 5 000-кратное увеличение)

Обнаруженные в поле зрения микроскопа частицы бактериофага представляли собой правильные икосаэдрические капсиды диаметром 55 нм с коротким несократимым хвостом длиной 5-7 нм. Отчетливо и воспроизводимо видимые минорные элементы структуры вируса (шипы, фибриллы, аксессуарные капсомеры) при полученном разрешении не зафиксированы.

В базе данных GenBank содержится информация о 64 референсных геномах бактериофагов *A. baumannii*, принадлежащих к семейству *Podoviridae* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), результаты отфильтрованы по референсным сиквенсам ("RefSeq"). Все описанные фаги имели литический (вирулентный) цикл развития и достаточно узкий спектр активности в отношении инфицируемых штаммов *A. baumannii*. По строению генома их можно классифицировать на группы:

- 1) КМV – подобные фаги, Abp1, φ AB1, Petty (капсид 50-55 нм, размер генома 41-45 т.п.н.).
- 2) T7 – подобный фаг, Vφ- B 1251 (капсид 55 нм, размер генома 45 т.п.н.).
- 3) N4 – подобный фаг φ AB2 и Presley (капсид 57 нм, размер генома 77 т.п.н.).
- 4) Неклассифицированный фаг AB7 – IBV2 (капсид 35 нм, размер генома 70 т.п.н.).

За исключением последнего типа (неклассифицированный фаг AB7 – IBV2), заметно меньшего по размеру, представленный бактериофаг *A. baumannii* может принадлежать к любой из трёх перечисленных выше групп, а также к неизвестным ранее группам.

Анализ генома бактериофага, при полногеномном секвенировании показал, что фаг является представителем вида *Acinetobacter virus AS11*, рода *Friunavirus*, подсемейства *Beijerinckvirinae*, семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales* (ictvonline.org). До 2019 года считалось, что семейство *Autographiviridae* является подсемейством и входило в семейство *Podoviridae* порядка *Caudovirales* [196, 205]. Данный вид бактериофага уже известен на территории России и характеризуется литическим циклом развития [171]. Линейный двухцепочечный ДНК-геном бактериофага состоял из 41655 пар оснований (bp) нуклеотидных последовательностей.

Полученный бактериофаг депонировали, в GenBank как *Acinetobacter_phage_vB_AbaP_PE14*, с присвоенным номером 2532137 Seq1 OL964948.

При оценке литической активности бактериофага по методу Аппельмана показатель составил $10^{-4,62 \pm 0,18}$ с концентрацией фаговых частиц (методом Грация) составила $2,8 \times 10^5$ БОЕ.

2.3. Формирование коллекции штаммов бактерий – продуцентов бактериофага *A. baumannii*

Известно, что обязательным начальным этапом работы при получении препарата бактериофага является выделение чистых культур перспективных

штаммов бактерий, то есть создание рабочей коллекции штаммов бактерий – продуцентов бактериофага.

Для формирования такой коллекции с 2014 по 2020 гг. изучено 1320 культур *A. baumannii*. В работе использованы штаммы *A. baumannii*, выделенные из биологического материала от пациентов с заболеваниями ЛОР-органов, бронхолегочной системы, мочеполового тракта, с хирургической патологией, желудочно-кишечными заболеваниями, а также штаммы с объектов внешней среды МО. Получение ацинетобактерного бактериофага в рамках собственных исследований заключалось в подборе штаммов из двух городов (г. Пермь, г. Екатеринбург). Формирование рабочей коллекции составило 7 лет. В коллекцию вошли 1320 штаммов *A. baumannii*.

Видовую принадлежность бактериальных штаммов устанавливали на основе морфологических, культуральных, биохимических свойств.

На этапе формирования музейной коллекции исследовали чувствительность штаммов *A. baumannii* к бактериофагу. С этой целью определяли степень лизиса тестируемых культур ацинетобактерным бактериофагом методом «спот-тест», оценивалась путем визуализации зоны образования «стерильного» пятна на месте нанесения капель фага по пятибалльной шкале. Из 1320 штаммов, представленных в коллекции, нечувствительными (резистентными) к ацинетобактерному фагу оказались 912 штаммов (69,1%), слабочувствительными на «+» или «++» – 272 (20,6%), высокочувствительными («+++», «++++») – 136 (10,3%) (Таблица 9).

Таблица 9 – Географическое место выделения штаммов *A. baumannii* и их чувствительность к ацинетобактерному бактериофагу

Город	Количество исследуемых культур	Отношение к фагу					
		Нечувствительных		Слабочувствительных		Высокочувствительных	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Пермь	1178	812	68,9	240	20,4	126	10,7
Екатеринбург	142	100	70,4	32	22,5	10	7,0
Всего:	1320	912	69,1	272	20,6	136	10,3

Далее штаммы *A. baumannii*, слабочувствительные (n=272) и высокочувствительные (n=136), тестировали по Аппельману в титрах последовательных разведений от 10^{-2} до 10^{-5} . По фаголизабельности штаммы также делили на 2 категории: 1) слабочувствительные (лизис культуры в разведении фага до $10^{-2} - 10^{-3}$); 2) высокочувствительные (лизис в разведении $10^{-4} - 10^{-5}$).

Дальнейшая работа заключалась в повышении уровня чувствительности слабочувствительных штаммов (272 шт.) с целью увеличения активности маточного бактериофага.

2.3.1. Адаптация слабочувствительных штаммов *A. baumannii* к бактериофагу

Адаптацию слабочувствительных штаммов *A. baumannii* к фагу проводили путем последовательных селектирующих пассажей.

В результате на слаболизирующихся культурах происходила постепенная адаптация маточного ацинетобактерного бактериофага, и его литическая активность по методу Аппельмана повышалась с титра 10^{-2} до 10^{-5} (Таблица 10).

Таблица 10 – Результат адаптации штаммов *A. baumannii* к ацинетобактерному бактериофагу

Микроорганизм	Количество исследованных штаммов (абс.)	Количество адаптированных штаммов (абс.)	Специфическая активность фага, титр по методу Аппельмана			
			I-й пассаж	II-й пассаж	III-й пассаж	IV-й пассаж
<i>A.baumannii</i>	272	54	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

На рисунке 8 представлен результат адаптации *A.baumannii* бактериофага к штаммам слабочувствительной культуре.

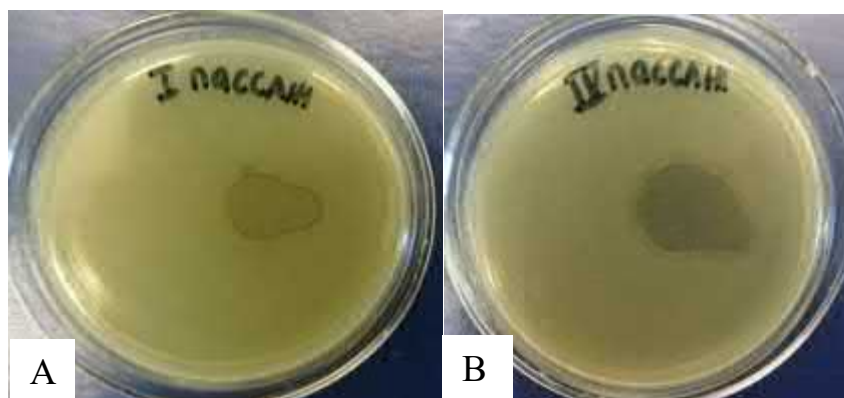


Рисунок 8 – Результат адаптации маточного ацинетобактерного фага к штамму *A. baumannii* (№283) А – до адаптации; В – после адаптации

В процессе адаптации количество штаммов *A. baumannii*, лизирующихся маточным бактериофагом в титре не ниже $10^{-4,0-5,0}$ по методу Аппельмана, увеличилось на 54 (с 136 до 190).

При этом 218 штаммов по-прежнему оставались слабочувствительными к фагу, несмотря на несколько последовательных пассажей. Эти штаммы были законсервированы, поскольку при выделении новых рас ацинетобактерного бактериофага их можно повторно тестировать для определения чувствительности.

Таким образом, в основу рабочей коллекции штаммов бактерий – продуцентов ацинетобактерного бактериофага из 1320 вошли 190 высокочувствительных штаммов *A. baumannii*.

2.3.2. Генотипическая характеристика штаммов-продуцентов

Известно, что самыми актуальными ферментами резистентности ацинетобактерий являются β -лактамазы (карбапенемазы, металло- β -лактамазы). С целью исключения горизонтального переноса генов, ответственных за продукцию β -лактамаз из бактериальной клетки в бактериофаг, штаммы бактерий – продуценты бактериофага *A. baumannii* были протестированы на наличие генов, кодирующих карбапенемазы групп OXA-23, OXA-40, OXA-58, NDM и VIM, методом ПЦР. У изученных претендентов, вошедших в коллекцию, у 190 штаммов *A. baumannii* гены указанных карбапенемаз отсутствовали.

Все штаммы обладали свойствами, представленными в Таблице 11.

Таблица 11 – Характеристика штаммов бактерий – продуцентов бактериофага *A. baumannii*

Характеристика штаммов			Наличие генов антибиотико резистентности
Морфологические, тинкториальные, культуральные свойства	Литические свойства	Биохимические свойства	
1	2	3	4
<p>Грамотрицательные, форма варьирует от кокковидной до коккобациллярной. На плотной питательной среде Эндо образуют лактозонегативные или лактозодефективные колонии, иногда слизистые. На кровяном агаре (5%) растут в виде серых слизистых колоний без зоны гемолиза. Строгие аэробы. Оптимальная температура для большинства штаммов +33-35°C. Спор, капсул не образуют.</p>	<p>Лизируются маточным бактериофагом в титре $10^{-4},^{-5}$ по методу Аппельмана (чтение реакции через 18-20 час).</p>	<p>Оксидаза (отр). Среда Хью-Лейфсона (окисление)+ /- (ферментация) (разлагают глюкозу только в аэробных условиях). Цитрат Симмонса (положит). Метил-рот (вариабельный). Уреаза (вариабельный). Желатиназа (отр.). Рост на МПА при плюс 42 °С (положит). Лизиндекарбоксилаза (отр). Аргининдекарбоксилаза (отр). Фенилаланиндезаминаза (вариабельный).</p>	<p>Отсутствуют гены резистентности основных групп (карбапенем аз, металло-β-лактамаз).</p>

Таким образом, нами был получен бактериофаг *A.baumannii* семейства *Autographiviridae* (ранее сем. *Podoviridae*) с уровнем литической активности по методу Аппельмана $10^{-4,62\pm 0,18}$ и сформирована коллекция высокочувствительных штаммов бактерий-продуцентов (190 шт.) бактериофага с отсутствием генов, кодирующих карбапенемазы основных, часто встречаемых групп.

2.4. Получение комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный

Для получения комплексного препарата бактериофага *A. baumannii* и *P.aeruginosa*, в качестве одного из компонентов был использован готовый коммерческий препарат «Бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный)» с. Н11 от 11.2017 г. производства НПО «Микроген» г. Пермь.

2.4.1. Характеристика бактериофага *P. aeruginosa*

Коммерческий препарат синегнойного бактериофага предварительно подвергли электронной микроскопии и визуализировали в нем присутствие трех видов бактериофага (Рисунок 9).

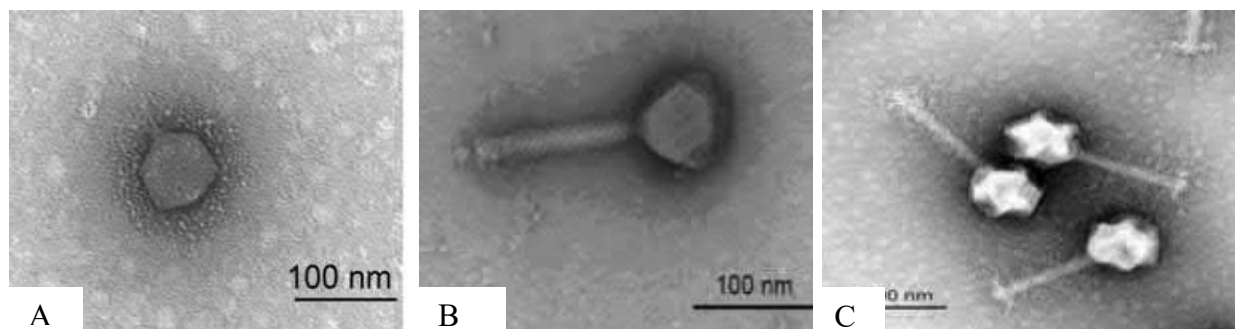


Рисунок 9 – Электронная микроскопия препарата бактериофага *P.aeruginosa*: фА) КМV (семейство *Podoviridae*); В) РВ1(семейство *Myoviridae*); С) КZ (семейство *Myoviridae*) («Hitachi H-300, 5 000-кратное увеличение)

В препарате было установлено наличие *Podoviridae* КМV-подобных бактериофагов, наличие *Myoviridae* фКZ, РВ1-подобных фагов. Эти две группы фагов принадлежат к вирулентным, допустимы к применению в терапевтических целях [52]. Для оценки морфологии колонии бактериофага *P. aeruginosa* использовали штамм №1430 из рабочей коллекции, выделенный из уха пациента оториноларингологического отделения ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, используемый в качестве штамма-продуцента. Фаговые бляшки характеризовались стандартными параметрами: диаметр 3,0–4,5 мм, полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса (Рисунок 10).



Рисунок 10 – Негативные колонии синегнойного бактериофага *P. aeruginosa* при титровании по методу Грациа на бактериальной культуре (штамм *P. aeruginosa* №1430) в разведении фага 10^{-6}

Концентрация фаговых частиц, установленная методом Грация составила $2,8 \times 10^6$ БОЕ, активность по методу Аппельмана – $10^{-5,75 \pm 0,25}$.

Таким образом, были охарактеризованы бактериофаги *A.baumannii* и *P.aeruginosa* для дальнейшего получения комплексного бактериофага.

2.4.2. Характеристика бактериофага ацинетобактер-синегнойный

Культивирование – это основная технологическая стадия сложного производственного процесса получения препаратов бактериофагов. Главной её задачей является создание оптимальных условий для размножения и развития штаммов-продуцентов и обеспечение максимального выхода биомассы бактериофага. Наш эксперимент по созданию комплексного препарата бактериофагов ацинетобактер-синегнойный проводили на лабораторном ферментере – биореакторе BIOSTAT® Aplus («Sartorius», Германия). Это автоклавируемый ферментер-биореактор, позволяющий управлять температурой, рН, уровнем растворенного кислорода, скоростью перемешивания, субстратом, а также проводить отбор проб в процессе культивирования.

Известно, что в производстве бактериофагов применяют различные варианты питательных сред: бульон Хоттингера, бульон Мартена, МПБ, казеиново-кислотная среда, бульон на основе ферментативного гемогидролизата [48, 49]. Мы сделали выбор в пользу казеиново-кислотной среды, поскольку она считается универсальной для культивирования условно-патогенных бактерий [49].

Первоначальным этапом эксперимента было получение ацинетобактерного бактериофага (монофага).

Для получения посевной культуры штаммы *A. baumannii* (не менее 20 штаммов бактерий-продуцентов из коллекции) перенесли платиновой петлей во флаконы с 200 мл казеиново-кислотной среды (HiMedia Laboratories, Индия) с последующей инкубацией в термостате в течение 20 ± 4 ч при температуре $+ 37$ °С.

Для приготовления маточного ацинетобактерного бактериофага использовали 100 мл посевной культуры и 0,2 мл бактериофага (фаголизата).

Культивирование компонентов осуществляли совместно при температуре + 37 °С в течение 20±4 часов до полного лизиса бактериальной культуры (визуальная оценка).

Для получения ацинетобактерного бактериофага (экспериментального образца) в емкость, содержащую 1 литр казеиново-кислотной среды (предварительно подвергали автоклавированию при 1,2 атм. 45 мин при температуре + 121° С), вносили 50 мл суточной бульонной культуры *A.baumannii* с концентрацией микробных клеток 1×10^9 КОЕ/мл и добавляли 2,0 мл маточного ацинетобактерного бактериофага (Рисунок 11).

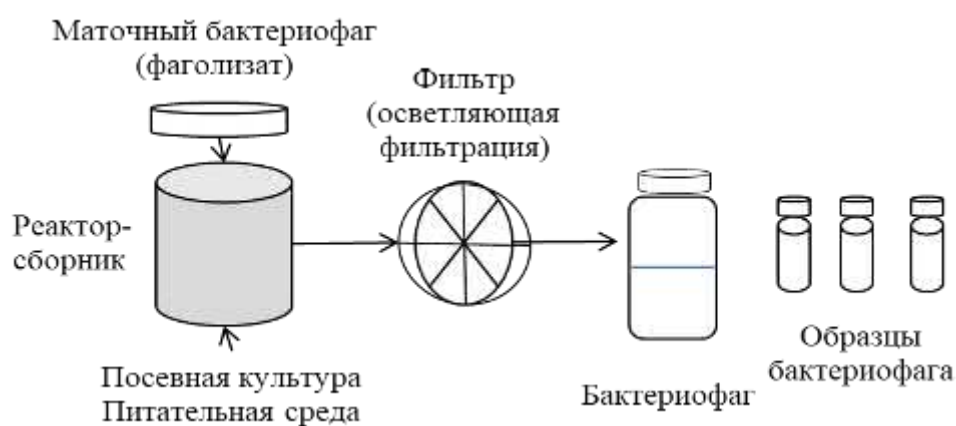


Рисунок 11 – Схема получения ацинетобактерного бактериофага в биореакторе BIOSTAT® Aplus

Посевы инкубировали в биореакторе при температуре + 37 °С в течении 20±4 часов. В процессе культивирования в биореакторе отбирали пробы каждые 2 часа, для определения значений pH. Уровень pH находился в пределах 7,2-7,4. Фаголизат пропускали через микропористые мембраны Sartorius Midisart®2000 («Sartorius», Германия), размеры пор которых соответствовали 0,2 μm.

К полученному раствору фаголизата добавляли консервант хинозол («ГРАНХИМ», Россия) (конечная концентрация в препарате 0,0001 г/мл), разливали во флаконы по 20 мл, герметизировали резиновыми пробками и хранили в холодильной камере при температуре плюс +5° С.

В следующей серии эксперимента определили возможность совместного культивирования фагов в реакционной смеси – ацинетобактерного

(экспериментальный образец) и синегнойного (коммерческий препарат «Бактериофаг псевдомонас аэругиноза»). Для получения комплексного препарата использовали объемы каждого бактериофага (ацинетобактерного и синегнойного) в равных соотношениях (1:1).

Для изучения основных свойств полученного комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный с доказательством его вирулентности произвели три экспериментальных образца (О.1; О.2; О.3)

Анализ литической активности полученных экспериментальных образцов препарата установил, что все образцы были сопоставимы между собой и совместное использование фагов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* не влияло на степень литической активности его компонентов (Таблица 12). Исходная активность по методу Аппельмана компонента бактериофага *A. baumannii* составляла $10^{-5,0}$, *P. aeruginosa* – $10^{-6,0}$.

Таблица 12 – Литическая активность экспериментальных образцов (О.1; О.2; О.3) бактериофага ацинетобактер-синегнойный

№ серии препарата	Литическая активность ацинетобактерного бактериофага по методу Аппельмана	Литическая активность синегнойного бактериофага по методу Аппельмана
О.1	$10^{-5,1}$	$10^{-6,0}$
О.2	$10^{-4,9}$	$10^{-5,9}$
О.3	$10^{-5,0}$	$10^{-6,1}$
X± SE	$10^{-4,93±0,12}$	$10^{-5,97±0,09*}$
p - значение t (df)	p = 0,63 t (2) = 0,55	p = 0,74 t(2)=0,37

Примечание: df – число степеней свободы; * - статистические значимые различия с константой (по одновыборочному t – критерию Стьюдента $p < 0,05$)

Усредненный показатель титра активности комплексного препарата бактериофагов трех экспериментальных образцов по методу Аппельмана для *A.baumannii* составил $10^{-4,93±0,12}$ и для *P.aeruginosa* $10^{-5,97±0,09}$.

2.4.3. Изучение адсорбции и основных фаз внутриклеточного развития

Согласно литературным данным, при получении препарата бактериофага соотношение фагов и бактерии (множественность инфекции) при посеве в питательную среду может быть различным от 1:1 до 1:500 [47]. Чтобы произошла единичная инфекция, т.е. на одной бактериальной клетке адсорбировалось не

более одной фаговой частицы, множественность инфекции должна составлять 0,01-0,1 [57].

Известно, что главным признаком воздействия бактериофага на чувствительные бактерии является их лизис, сопровождающийся выходом в среду новых вирионов фага [28]. Представление о параметрах инфекционного процесса – адсорбции, латентного периода и урожайности фага – изучали в опыте одиночного цикла развития фага. В качестве биологической модели использовали полученный образец комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный (из трех экспериментальных образцов О.1; О.2; О.3 делали одну общую пробу) и индикаторные штаммы *A. baumannii* № 212 - мокрота (МАУ «ГКБ 14») и *P. aeruginosa* № 233 – раневое отделяемое (ГБУЗ ПК «КМСЧ №1»). Штаммы взяты методом случайной выборки из коллекции штаммов. На начальном этапе исследования изучали длительность латентного периода, определяемую как время от начала адсорбции фага на клетке до ее лизиса и освобождения фагового потомства (Таблица 13).

Таблица 13 – Взаимодействие комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный со штаммами *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

Время, мин	Этапы исследования	Количество фаговых частиц <i>A.baumannii</i>	Количество фаговых частиц <i>P.aeruginosa</i>
0	Приготовление адсорбционной смеси, контроли: фага и бактерий	$1,0 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^8$
		$1,1 \cdot 10^8$	$1,1 \cdot 10^7$
20	Определение свободного фага в адсорбционной смеси	$7,0 \cdot 10^6$	$4,0 \cdot 10^6$
25		$2,0 \cdot 10^6$	$2,6 \cdot 10^6$
30		$5,9 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^6$
35		$7,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^6$
40		$2,3 \cdot 10^8$	$2,4 \cdot 10^8$
45		$3,6 \cdot 10^8$	$3,5 \cdot 10^8$
50		$5,2 \cdot 10^8$	$4,7 \cdot 10^8$
55		$5,5 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^8$
60		$6,6 \cdot 10^8$	$8,7 \cdot 10^8$
65		$6,5 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^9$
70		$6,7 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^9$
75		$6,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^9$
80		$6,4 \cdot 10^8$	$9,8 \cdot 10^8$
85		$7,3 \cdot 10^8$	-
90		$6,8 \cdot 10^8$	-

Начало репродукции фаговых частиц ацинетобактерного фага отмечалось между 25 и 30 минутами, что и определило длительность латентного периода. Суммарное количество фага в бактериальной клетке составило $49,15 \times 10^7$ фаговых частиц. На долю вновь образовавшихся фаговых частиц приходилось $48,95 \times 10^7$. Инфицированных к этому времени фагом бактерий по расчетным данным оказалось $8,0 \times 10^6$.

Определение одиночного цикла репродукции фага проводили по суммарному количеству не адсорбированных и вновь образовавшихся фагов. К 25 минуте адсорбировалось 80% частиц фага. Оценку константы скорости адсорбции проводили расчетным путем, она составила $5,85 \times 10^{-10}$ мл/мин.

Среднее количество вновь образовавшихся частиц фага на одну инфицированную клетку (урожайность фага) *A. baumannii* составило 61,18.

Начало репродукции частиц фага для *P. aeruginosa* отмечалось между 35 и 40 минутами. Суммарное количество фага составило $88,6 \times 10^7$. Из этого количества на долю вновь образовавшихся частиц фага приходилось $88,47 \times 10^7$. Инфицированных фагом оказалось $0,97 \times 10^7$ бактерий. К 35 минутам адсорбировалось 88,2% частиц фага. Константа скорости адсорбции составила $5,0 \times 10^{-10}$ мл/мин. Средний урожай фага на одну бактериальную клетку *P. aeruginosa* был равен 91,2 фаговых частиц.

Обобщенные результаты основных параметров инфекционного процесса взаимодействия фага с бактериальной клеткой представлены в Таблице 14.

Таблица 14 – Показатели инфекционного процесса (взаимодействия) бактериофага ацинетобактер синегнойный со штаммами *A. baumannii* и *P. aeruginosa*

Параметры инфекционного процесса	Компоненты бактериофага	
	Бактериофаг ацинетобактерный	Бактериофаг синегнойный
Константа скорости адсорбции, мл/мин	$5,8 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-10}$
Латентный период, мин	25-30	35-40
Урожайность, фаг/частицы	61,2	91,2

Сравнение аналогичных параметров других препаратов бактериофагов на примере бактериофага *P. aeruginosa* ph57 (из коллекции НИИ ККМ ГНЦ

«Вектор» №V-357) установило, что продолжительность латентного периода с его участием при взаимодействии с бактериальной клеткой составляла 45-50 мин [51]. Для ацинетобактерного бактериофага известен штамм *A. baumannii* AP 22ph. Длительность его латентного периода при инфицировании составляет 40 мин. Константа скорости адсорбции $-1,53 \times 10^{-7}$ мл/мин [58].

Таким образом, параметры инфекционного процесса полученного нами комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный находились на аналогичном уровне с другими изученными фагами.

2.4.4. Литическая активность

Для определения литической активности комплексного бактериофага использовали не менее 8-ми штаммов бактерий *P. aeruginosa* и *A. baumannii* из рабочей коллекции (штаммы не использованы при получении бактериофага) и типовые штаммы АТСС. Результаты представлены в Таблице 15.

Таблица 15 – Литическая активность комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный со штаммами *A. baumannii* и *P. aeruginosa* (метод Аппельмана и метод Грация)

Микроорганизм	№ штамма	Активность по методу Аппельмана	Титр по методу Грация, частиц/мл
<i>P. aeruginosa</i>	107	$10^{-5,0}$	$1,2 \times 10^6$
	278	$10^{-5,0}$	$3,4 \times 10^6$
	260	$10^{-5,0}$	$2,7 \times 10^6$
	337	$10^{-6,0}$	$1,6 \times 10^7$
	364	$10^{-6,0}$	$2,3 \times 10^7$
	378	$10^{-6,0}$	$3,4 \times 10^7$
	428	$10^{-6,0}$	$2,8 \times 10^7$
	382	$10^{-6,0}$	$4,3 \times 10^7$
	АТСС 27853	$10^{-6,0}$	$3,8 \times 10^7$
<i>A. baumannii</i>	112	$10^{-4,0}$	$3,5 \times 10^5$
	761	$10^{-5,0}$	$4,8 \times 10^5$
	684	$10^{-4,0}$	$3,2 \times 10^5$
	245	$10^{-4,0}$	$3,7 \times 10^5$
	339	$10^{-5,0}$	$4,6 \times 10^5$
	388	$10^{-4,0}$	$5,2 \times 10^5$

Продолжение Таблицы 15

Микроорганизм	№ штамма	Активность по методу Аппельмана	Титр по методу Грация, частиц/мл
<i>A. baumannii</i>	259	$10^{-5,0}$	$3,4 \times 10^6$
	456	$10^{-5,0}$	$3,2 \times 10^5$
	ATCC 19606	$10^{-4,0}$	$3,4 \times 10^5$

Литическая активность бактериофага по методу Аппельмана составила $10^{4,33 \pm 0,17}$ - *A. baumannii* и $10^{-5,66 \pm 0,17}$ - *P. aeruginosa*, титр по Грация соответственно - $3,2 \times 10^5$ - $3,4 \times 10^6$ и $1,2 \times 10^6$ - $4,3 \times 10^7$.

2.4.5. Диапазон действия

Следующая серия экспериментов включала оценку специфичности действия комплексного бактериофага капельным методом («спот-тест») в отношении штаммов микроорганизмов различных видов, родов, семейств (60 штаммов). В эксперименте участвовало по 5 штаммов различных представителей микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*), а также не менее чем по 10 штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* из рабочей коллекции, не используемых при изготовлении экспериментальных образцов комплексного бактериофага (Таблица 16).

Таблица 16 – Специфичность комплексного бактериофага

Наименование микроорганизмов	Количество штаммов (n=60)	Наличие лизиса бактериальной культуры	Лизис бактериальной культуры (%)
<i>S. aureus</i> , в т.ч. штамм ATCC 29213	5	отсутствует	0%
<i>Streptococcus spp.</i>	5	отсутствует	0%
<i>P. vulgaris</i>	5	отсутствует	0%
<i>P. mirabilis</i>	5	отсутствует	0%
<i>K. pneumoniae</i>	5	отсутствует	0%
<i>E. coli</i> , в т.ч. штамм ATCC 25922	5	отсутствует	0%
<i>Shigella spp.</i>	5	отсутствует	0%
<i>Salmonella spp.</i>	5	отсутствует	0%
<i>A. baumannii</i> , в т.ч. штамм ATCC 19606	10	полный	100%
<i>P. aeruginosa</i> , в т.ч. штамм ATCC 27853	10	полный	100%

Доказательством высокой специфической активности комплексного бактериофага служило полное отсутствие роста бактериальной культуры на месте нанесения капли фага или появление полусливного лизиса колоний бактериофага. Комплексный бактериофаг лизировал только штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* (100% литическая активность). Результаты исследования позволили сделать вывод о хорошем уровне специфической активности комплексного бактериофага, к которому были чувствительны все штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* при отсутствии лизиса микроорганизмов других видов (родов).

2.4.6. Оценка специфической активности на основе клеточной культуры ЛЭЧ-3 с изучением адгезивных свойств бактерий

Адгезия микроорганизмов к поверхности эпителия можно рассматривать как начальный этап колонизации различных биотопов организма, который предшествует инвазии патогена.

Преимущество моделей *in vitro* заключается в возможности работы непосредственно на культурах клеток человеческого происхождения, что делает полученные результаты более адекватными при их проекции на организм человека [60].

Тестирование бактериофагов и штаммов микроорганизмов осуществляли с использованием диплоидной клеточной культуры легкого эмбриона человека ЛЭЧ-3 («банк-музей» «Коллекция перевиваемых соматических клеток позвоночных медицинского назначения» Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора). Культура представляет собой монослой однородных фибробластоподобных клеток, обладающих ориентированным ростом, с ядрами овальной формы. Клетки ЛЭЧ-3 были свободны от контаминирующих агентов, не обладали туморогенной активностью и на протяжении первых двух фаз деления стабильно сохраняли свои биологические свойства, присущие штаммам диплоидных клеток человека.

В работе использовали по 20 штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, а также в качестве контроля штаммы *S. aureus* (n= 20) из рабочей коллекции, выделены из

ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, ГБУЗ ПК «КМСЧ№1», г. Перми, МАУ «ГКБ 14», ГБУЗ СО «Полевская ЦГБ», МАУ «ДГБ №8» г. Екатеринбург.

В исследование включали экспериментальный образец комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный и коммерческий препарат бактериофага «Бактериофаг Стафилококковый», производства «НПО «Микроген» (Россия).

Способ осуществляли следующим образом.

В пробирку на покровное стекло с монослоем клеток ЛЭЧ-3 наносили 0,2 мл суточной культуры соответствующего микроорганизма в дозе $\sim 1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (стандарт-мутности 0,5 по МакФарланду) с добавлением 0,2 мл специфического бактериофага с уровнем литической активности $10^{-5} - 10^{-7}$ (опытный инокулят). В качестве контрольного инокулята использовали смесь 0,2 мл питательной среды Игла МЕМ (ПанЭко, Россия) с 0,2 мл суточной культуры соответствующего микроорганизма в той же дозе. Пробирки инкубировали в течение одного часа при температуре + 37 °С, периодически встряхивая, затем клетки монослоя отмывали 3-хратно от не прикрепившихся микроорганизмов фосфатно-буферным раствором рН 7,4 (ПанЭко, Россия), фиксировали 96-процентным этиловым спиртом, окрашивали красителем Азур-Эозин (по Романовскому) (МиниМед, Россия) и исследовали под микроскопом Axioscop 40 (объектив ACHROLAN 100 x 1,25Oil; окуляр W-PI 10 x /23 (Carl Zeiss, Германия). Интенсивность процесса адгезии оценивали по следующим показателям:

- 1) индекс адгезии (ИА) выражали средним числом бактериальных клеток на одной эукариотической клетке;
- 2) процент пораженных клеток монослоя (ПК, %) рассчитывали на 100 клеток.

Полученные экспериментальные данные свидетельствовали о том, что специфические бактериофаги блокировали адгезивную активность изучаемых штаммов. Так, индекс адгезии микроорганизмов достоверно снизился относительно контроля, соответственно у *P.aeruginosa* – $27,54 \pm 1,17$ до $4,47 \pm$

1,17, *A.baumannii* – с $15,58 \pm 1,1$ до $4,68 \pm 1,12$, *S.aureus* – с $19,95 \pm 1,07$ до $4,79 \pm 1,12$ (Таблица 17).

Таблица 17 – Характеристика адгезивной активности микроорганизмов на клеточной культуре ЛЭЧ-3

Показатель	КК+бактерии+бактериофаг (I. опыт)	КК+бактерии (II. контроль)	Однофакторный дисперсионный анализ
	n = 20m±SE [95% ДИ]		
<i>P. aeruginosa</i>			
log ₁₀ (ИА)	0,65±0,07* [0,52–0,79]	1,44±0,07 [1,31–1,58]	F _(1, 38) = 73,48 p < 0,001
ИА®	4,47±1,17* [3,31–6,17]	27,54±1,17 [20,42–38,02]	
φ-преобр (ПК)	0,51±0,04* [0,43–0,60]	1,55±0,10 [1,34–1,75]	F _(1, 38) = 95,42 p < 0,001
ПК©	6,36±0,04* [4,55–8,73]	48,96±0,25 [38,56–58,91]	
<i>A. baumannii</i>			
log ₁₀ (ИА)	0,67±0,05* [0,56–0,77]	1,20±0,06 [1,08–1,33]	F _(1, 38) = 46,28 p < 0,001
ИА®	4,68±1,12* [3,63–5,89]	15,58±1,15 [12,02–21,38]	
φ-преобр (ПК)	0,60±0,03* [0,54–0,66]	1,53±0,12 [1,29–1,77]	F _(1, 38) = 62,14 p < 0,001
ПК©	8,73±0,02* [7,11–10,50]	47,96±0,36 [36,14–59,89]	
<i>S.aureus</i>			
log ₁₀ (ИА)	0,68±0,05* [0,57–0,78]	1,30±0,03 [1,23–1,37]	F _(1, 38) = 101,23 p < 0,001
ИА®	4,79±1,12* [3,72–6,03]	19,95±1,07 [16,98–23,44]	
φ-преобр (ПК)	0,32±0,02* [0,28–0,36]	1,42±0,07 [1,27–1,58]	F _(1, 38) = 205,66 p < 0,001
ПК©	2,54±0,01* [1,95–3,21]	42,49±0,12 [35,19–50,46]	

Примечание: m±SE [95% ДИ]- стандартная ошибка среднего с указанием доверительного интервала; One-wayANOVA–однофакторный дисперсионный анализ; F – значение критерия Фишера; φ – угловое фи-преобразование; * – статистически значимые различия между группами I и II (p < 0,05); ® – данные приведены к исходным значениям путем потенцирования логарифмированных значений: $\log_{10}(x+1) = y$ – логарифмирование; $10^{(y)}$ = x – «антилогарифм»; © – данные приведены к исходным значениям путем обратного преобразования: $y = 2 * \arcsin(\sqrt{x/100})$ – угловое фи-преобразование; $x = ((\sin(y/2))^2) * 100$ – ретрансформация

При исследовании такого показателя как процент пораженных клеток (ПК%) в монослое клеточных культур ЛЭЧ-3 были получены аналогичные результаты у *P. aeruginosa* – $48,96 \pm 0,25$ % без бактериофага, $6,36 \pm 0,04$ % – с бактериофагом, у *A. baumannii* с $47,96 \pm 0,36$ % до $8,73 \pm 0,02$ (Рисунок 12).

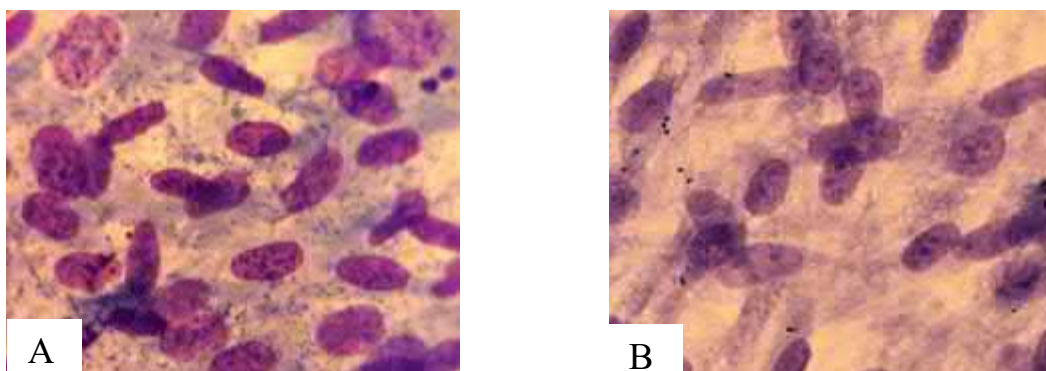


Рисунок 12 – Микроорганизмы *A. baumannii*, адгезированные на клеточной культуре (ЛЭЧ-3): А – без воздействия бактериофага, В - с бактериофагом (Аxiоссop 40, объектив АСНROLAN 100 x 1,25Oil; окуляр W-PI 10 × /23)

Среднее значение пораженных клеток монослоя у штаммов *S. aureus* составило – $42,49 \pm 0,12\%$ и $2,54 \pm 0,01\%$ соответственно.

Таким образом, специфическая активность комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный к соответствующим видам микроорганизмов наряду с коммерческим бактериофагом «Бактериофаг Стафилококковый» была доказана на культуре клеток ЛЭЧ-3. Совместное культивирование бактериофагов с микроорганизмами (в течение 1 часа) приводило к статистически значимому снижению показателей адгезии ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольными штаммами без добавления бактериофага.

На представленную выше методику оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур получен патент RU 2723188 C1 (дата регистрации 09.06.2020).

2.4.7. Сравнительная оценка чувствительности штаммов *A. baumannii* к антибиотикам и комплексному бактериофагу (2014-2020 гг.)

Решающая роль в оценке эффективности любого разработанного антимикробного препарата заключается в оценке чувствительности к нему бактериальных штаммов, выделенных с разницей во времени (в определенном временном промежутке) и в сравнении показателей с другими аналогичными средствами. Исследования проводили в два этапа.

На первом этапе были протестированы 116 штаммов *A. baumannii*, выделенных от пациентов СПО урологического, терапевтического,

отоларингологического отделений стационаров, ОРИТ и амбулаторного звена (ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, ГБУЗ ПК «КМСЧ№1») в 2014-2016 гг.

Чувствительность штаммов *A. baumannii* к цефоперазон/сульбактаму и полимиксину составила $97,4 \pm 1,5\%$, тигециклину – $87,0 \pm 3,1\%$. Существенно ниже оказался уровень чувствительности к амикацину – $59,4 \pm 4,6\%$ и имипенему – $52,2 \pm 4,6\%$. Низкой антибактериальной активностью характеризовались хлорамфеникол – $11,1 \pm 2,9\%$ и цефоперазон – $13,7 \pm 3,2\%$. Чувствительность *A. baumannii* к комплексному бактериофагу составила $51,7 \pm 4,6\%$.

Все тестируемые штаммы *A. baumannii* из представленной коллекции (n=116) были разделены на три группы: штаммы, выделенные из амбулаторного звена (1 группа); штаммы, выделенные из отделений стационара (2 группа); штаммы, выделенные из ОРИТ (3 группа).

Штаммы первой группы (14 штаммов) имели максимальную чувствительность к тигециклину и полимиксину (100%), высокую чувствительность к цефоперазон-сульбактаму – $92,8 \pm 6,9\%$, имипенему – $85,7 \pm 9,3\%$, ципрофлоксацину – $85,7 \pm 9,3\%$, амикацину – $85,7 \pm 9,3\%$ (Рисунок 13).

К цефоперазону и хлорамфениколу чувствительность составила по $42,8 \pm 13,2\%$, к комплексному бактериофагу – $14,2 \pm 9,3\%$.

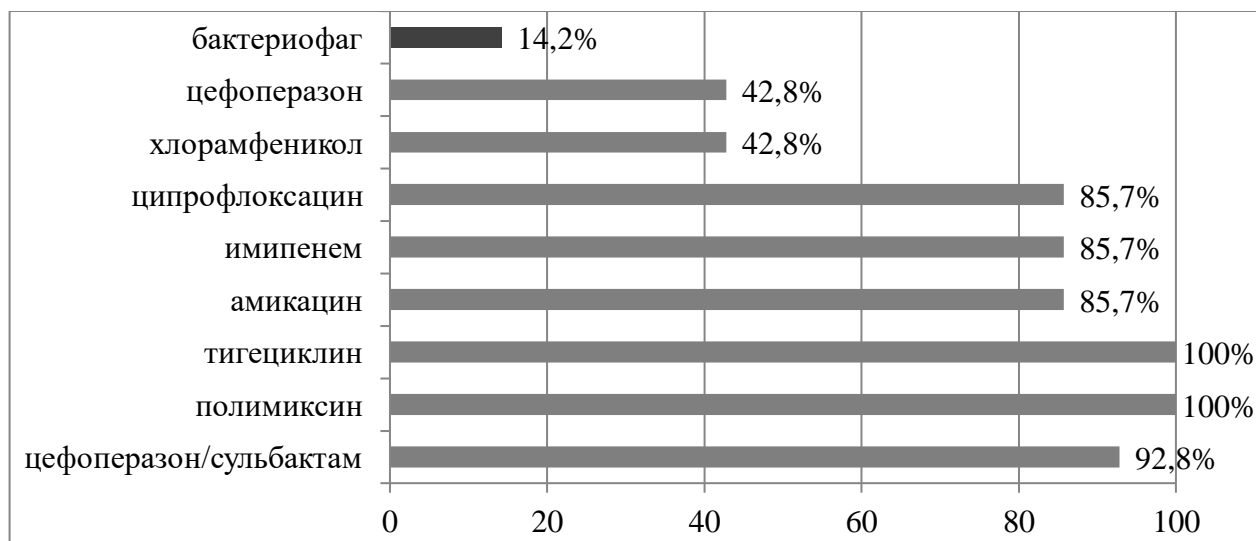


Рисунок 13 – Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций в 2014-2016 гг. (амбулаторное звено)

Штаммы второй группы (49 изолятов) были выделены от пациентов и объектов внешней среды отделений стационара. При изучении их антибиотикочувствительности высокую активность показали цефоперазон/сульбактам – $95,9 \pm 2,8\%$, полимиксин – $93,8 \pm 3,4\%$ и тигециклин – $87,7 \pm 4,7\%$ (Рисунок 14).

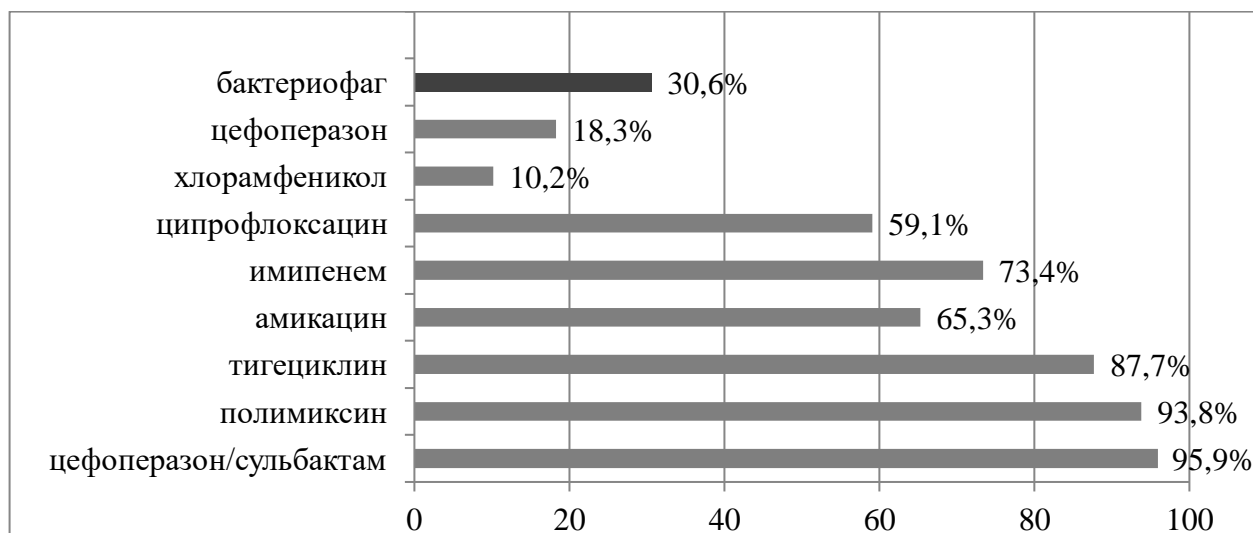


Рисунок 14 – Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций в 2014-2016 гг. (отделения стационара)

К имипенему были чувствительны $73,4 \pm 6,3\%$ штаммов, амикацину – $65,3 \pm 6,8\%$, ципрофлоксацину – $59,1 \pm 7,0\%$. Минимальная чувствительность выявлена к цефоперазону – $18,3 \pm 5,5\%$ и хлорамфениколу – $10,2 \pm 4,3\%$. Чувствительность к фагу в этой группе находилась на уровне $30,6 \pm 6,6\%$.

Штаммы третьей группы, выделенные из ОРИТ (53 штамма), также, как штаммы второй группы имели высокий уровень чувствительности лишь к трем из восьми тестируемых антибиотиков: тигециклину ($83,0 \pm 3,7\%$), полимиксину (100%), цефоперазон/сульбактаму (100%) (Рисунок 15).

Вместе с тем, их чувствительность к комплексному бактериофагу составила $81,1 \pm 5,4\%$ и была сопоставима с уровнем чувствительности антибиотика резерва – тигециклином $83,0 \% \pm 3,7\%$ ($\chi^2 = 0,06$, d.f. = 1, $p = 0,8$).

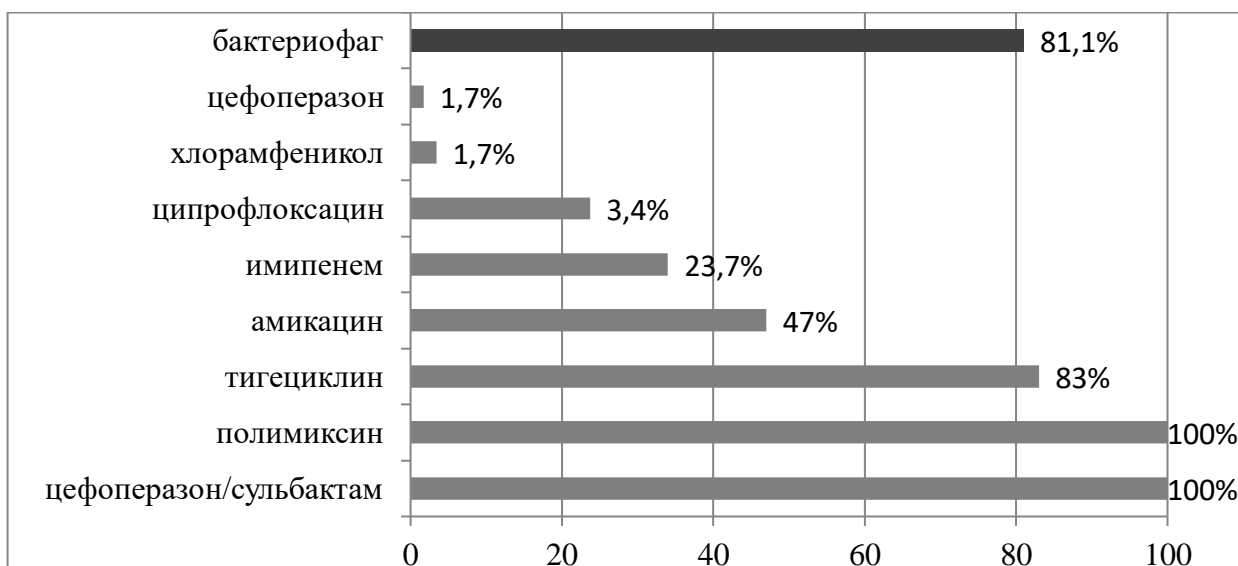


Рисунок 15 – Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций в 2014-2016 гг. (отделения реанимации и интенсивной терапии)

Таким образом, полученный комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный обладал высокой специфичностью и выраженным антибактериальным эффектом по отношению к штаммам, циркулирующим в ОРИТ. Его уровень чувствительности и не уступал уровню современных антибиотиков резерва, резерва, что предопределяет его широкое использование в период эпидемического неблагополучия с лечебной и профилактической целью среди пациентов, а также в качестве средства очаговой и профилактической дезинфекции.

На втором этапе представленного раздела работы были тестированы 83 полирезистентных штаммов *A. baumannii*, выделенных из нижних отделов дыхательных путей пациентов ОРИТ (МАУ «ГКБ 14», ГБУЗ СО «Полевская ЦГБ», ГБУЗ ПК «КМСЧ№1», ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России) в 2018-2020 гг.

Уровень чувствительности штаммов к комплексному бактериофагу составил $72,3 \pm 1,2$ % (Таблица 18) и не имел существенных отличий от полученных нами ранее результатов из ОРИТ г. Перми (2014-2016 гг.) – $81,1 \pm 5,4$ % ($\chi^2 = 1,37$, d.f. = 1, $p = 0,24$).

Таблица 18 – Чувствительность к бактериофагу ацинетобактер-синегнойный штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций 2018-2020 гг.

Географическое место выделения	Количество исследуемых культур	Бактериофаг ацинетобактер-синегнойный			
		Нечувствительные		Чувствительные	
		абс.	%	абс.	%
г. Пермь	53	12	22,6	41	77,4
г. Екатеринбург	30	11	36,7	19	63,3
Всего:	83	23	27,7	60	72,3

Таким образом, мониторинг чувствительности штаммов *A. baumannii* к разработанному комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный, проведенный нами на основе пространственной и временной характеристики (в динамике по годам и в различных медицинских организациях двух крупных промышленных центров РФ), установил высокую эффективность комплексного бактериофага в отношении штаммов, выделенных от пациентов ОРИТ с заболеваниями нижних отделов дыхательных путей. Данное исследование подтвердило высокую перспективность использования бактериофага в комплексе с антибиотиками резерва при тяжелых инфекционных осложнениях, обусловленных антибиотикорезистентными штаммами.

Отметим, что полученные нами результаты не исключают необходимость постоянного обновления и актуализации бактериофагов для расширения спектра их литической активности путем подбора высоковирулентных фаголизатов на основе эпидемически значимых госпитальных штаммов конкретного региона.

ГЛАВА 3. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ ПОЛИРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *ACINETOBACTER BAUMANNII* И *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСНОГО БАКТЕРИОФАГА АЦИНЕТОБАКТЕР-СИНЕГНОЙНЫЙ

3.1. Внутривидовая идентификация *P. aeruginosa*

Для проведения внутривидового типирования *P. aeruginosa* с использованием метода серийных разведений отобрано 53 штамма от 106 пациентов и 131 – с объектов больничной среды хирургических и акушерских стационаров (МБМУ "Городская Больница № 3"), устойчивых к имипенему диско-диффузионным методом. По фенотипическим признакам коллекция была разделена на 3 группы.

В первую группу (I группа) вошли 13 полирезистентных штаммов *P. aeruginosa* из городского хирургического стационара. Штаммы выделены из содержимого гнойных ран от пациентов (11 штаммов) и с объектов внешней среды (2 штамма) перевязочного кабинета – смыв с перчаток, дезинфицирующий раствор.

В ходе исследований у всех 13 тестируемых штаммы первой группы подтверждена резистентность к антибиотикам (методом серийных разведений с определением МПК): гентамицину, амикацину, имипенему, меропенему, цефепиму, цефоперазон/сульбактаму, ципрофлоксацину, цефтазидиму (Таблица 19).

По МПК к гентамицину, имипенему, меропенему, цефоперазон/сульбактаму, ципрофлоксацину сопоставимыми (отсутствие расхождений в показателях МПК) оказались все 13 (100,0%) тестируемых изолятов, по чувствительности к цефепиму, амикацину – 12 штаммов (92,3%). Наибольшее расхождение в МПК имел цефтазидим (61,5%).

Таблица 19 – Чувствительность к антибиотикам, продукция β -лактамаз и фаголизабельность штаммов *P. aeruginosa* городского хирургического стационара I группа)

№ п/п	Объекты исследования	Чувствительность к антибиотикам МПК (мкг/мл)								АТБ		ПЦР TEM, CTX-M, KPC, OXA, MBL	Комплексный бактериофаг
		гентамицин	амикацин	имипенем	меропенем	цефепим	цефоперазон/ сульбактам	ципрофлоксацин	цефтазидим	азтреонам	имипенем		
1	пац. Щ.	128	8	8	16	16	32	64	16	I	R	-	S
2	пац. С.	>128	8	8	16	32	32	64	16	I	R	-	S
3	пац. Н.	128	8	8	32	32	64	64	64	R	R	-	S
4	пац. Ч.	128	8	8	32	64	64	32	128	R	R	-	S
5	пац. М.	>128	16	16	>32	64	128	64	>128	R	R	-	S
6	пац. В.	>128	32	16	32	64	128	64	128	R	R	-	S
7	пац. Т.	>128	32	8	32	64	64	>64	128	R	R	-	S
8	пац. Ш.	>128	32	16	32	64	128	>64	128	R	R	-	S
9	пац. П.	128	16	16	>32	64	128	64	128	R	R	-	S
10	пац. Щ	64	8	8	16	16	32	64	16	I	R	-	S
11	пац. См.	64	8	4	16	16	32	64	16	I	R	-	S
12	Смыв с перчаток	64	4	4	8	8	32	>64	8	S	R	-	S
13	Дез. р-в.	>128	32	16	32	64	64	>64	128	R	R	-	S

Примечание: «R» – устойчивый; «I» – промежуточный; «S» - чувствительный

Оценка чувствительности *P.aeruginosa* к АБП по МПК (мкг/мл) – оценивали по критериям согласно МУК 4.2.1890-04 (гентамицин ≤ 4 , амикацин ≤ 16 , имипенем ≤ 4 , меропенем ≤ 4 , цефепим ≤ 8 , цефоперазон/сульбактам ≤ 16 , ципрофлоксацин ≤ 1 , цефтазидим ≤ 8)

При детекции генов, кодирующих продукцию β -лактамаз групп TEM, CTX-M, KPC, OXA и MBL методом ПЦР, ни у одного из штаммов представленные гены обнаружены не были, что также не исключало наличие эпидемиологических связей между типизируемыми штаммами.

В целом штаммы I группы показали высокий уровень сопоставимости по показателям МПК (мкг/мл). К комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный штаммы первой группы были чувствительны.

Вторую группу (II группа) составили 19 штаммов *P. aeruginosa* из перинатального центра. В их числе 6 штаммов выделены из палаты интенсивной

терапии (ПИТ) – первая подгруппа и 13 штаммов из физиологического отделения «мать-дитя» – вторая подгруппа.

Из первой подгруппы (6 штаммов ПИТ) 3 штамма выделены от новорожденных с тяжелой септической формой инфекции (отделяемое пупочной ранки, отделяемое кишечника) и 3 штамма – с объектов внешней среды (смыв с рук санитарки, смыв с перчаток санитарки, смыв со сливного отверстия раковины).

Из второй подгруппы (13 штаммов отделения физиологии «мать-дитя») 1 штамм выделен от родильницы, 3 штамма – от новорожденных (с ГСИ), 9 штаммов с объектов внешней среды (4 – смывы с перчаток после осмотра пациента, 1 – смыв с перчатки после дезинфекции, 2 – дезинфицирующий раствор, 2 – смыв со сливного отверстия раковины).

Анализ данных МПК (мкг/мл) изучаемых штаммы выявил сопоставимость их значений к цефоперазон/сульбактаму и цефтазидиму – в 100,0% случаев, амикацину, цефепиму, имипенему, ципрофлоксацину – в 94,7%, гентамицину – 89,5%, меропенему – в 73,7% (Таблица 20).

Таблица 20 – Чувствительность к антибиотикам, продукция β -лактамаз и фаголизательность штаммов *P.aeruginosa* перинатального центра (II группа)

№ п/п	Объекты исследования	Чувствительность к антибиотикам МПК (мкг/мл)								АТБ		ПЦР	Комплексный бактериофаг
		гентамицин	амикацин	имипенем	меропенем	цефепим	цефоперазон / сульбактам	ципрофлоксацин	цефтазидим	азтреонам	имипенем	TEM, CTX, KPC, OXA MDR	
II группа 1 подгруппа <i>P.aeruginosa</i> (детская палата интенсивной терапии)													
1	р.Н.отд.пуп.ранки	2	4	1	0,25	2	4	0,062	2	R	R	-	R
2	р.К.отд.пуп.ранки	1	8	1	0,25	4	4	0,125	1	I	S	-	R
3	р.Ш.отд.кишечника	1	4	0,5	0,25	1	4	0,25	1	I	R	-	R
4	Руки санитарки	1	8	1	0,125	4	2	0,125	2			-	R
5	Слив раковины	2	4	1	0,25	1	4	0,062	1	I	S	-	R
6	Перчатки санитарки	2	4	1	0,25	1	4	0,125	2	R	R	-	R

Продолжение Таблицы 20

№ п/п	Объекты исследования	Чувствительность к антибиотикам МПК (мкг/мл)								АТБ		ПЦР TEM, СТХ-М, KPC, OXA MBL	Комплексный бактериофаг
		гентамицин	амикацин	имипенем	меропенем	цефепим	цефоперазон / сульбактам	ципрофлоксацин	цефтазидим	азтреонам	имипенем		
II группа 2 подгруппа <i>P.aeruginosa</i> (физиологическое отделение новорожденных)													
1	Род.Г	2	4	1	0,125	2	4	0,062	1	R	R	-	S
2	Реб.Д	2	4	1	0,062	1	4	0,062	1	S	S	-	S
3	Реб.Т	2	4	1	0,062	2	4	0,125	1	S	S	-	S
4	Реб.Г	2	4	1	0,25	2	4	0,25	1	S	S	-	S
5	Перчатки	2	2	1	0,5	4	4	0,125	1	R	R	-	S
6	Дезинфицирующий р-р	4	8	0,25	0,5	2	4	0,125	1	R	R	-	S
7	Перчатки после осмотра	4	8	0,25	0,25	2	8	0,125	2	I	S	-	S
8	Перчатки после осмотра	4	8	0,5	2	4	8	0,25	2	I	R	-	S
9	Перчатки после осмотра	4	8	0,5	1	4	4	0,25	2			-	S
10	Слив раковины	8	16	4	2	8	8	0,5	2	I	S	-	S
11	Перчатки после дез.обработки	4	8	0,25	0,5	2	8	0,125	2	R	R	-	S
12	Слив раковины	4	4	0,25	0,5	2	4	0,062	1	R	R	-	S
13	Дезинфицирующий раствор	0,5	8	0,25	0,25	2	4	0,062	2	I	S	-	S

При детекции генов, ответственных за продукцию β -лактамаз групп TEM, СТХ-М, KPC, OXA и MBL, методом ПЦР ни в одной группе представленные гены обнаружены не были.

Отметим, что штаммы из второй подгруппы II группы были выделены спустя 3 месяца относительно штаммов первой подгруппы. В целом у изучаемых штаммов 2 подгруппы выявили высокий уровень сопоставимости по МПК. Анализ чувствительности штаммов к бактериофагу также свидетельствовал о формировании второй линии госпитальных штаммов *P.aeruginosa*. Изучаемые штаммы первой подгруппы были резистентны к бактериофагу, второй – чувствительны.

В третью группу (III группа) вошли 5 штаммов, выделенных от пациентов и внешней среды отделения гнойной хирургии краевого хирургического стационара (Таблица 21).

Таблица 21 – Чувствительность к антибиотикам продукция β -лактамаз и фаголизательность штаммов *P. aeruginosa* гнойной хирургии краевого хирургического стационара (III группа)

№ п/п	Объекты исследования	Чувствительность к антибиотикам МПК (мкг/мл)								АТБ		ПЦР	Комплексный бактериофаг
		гентамицин	амикацин	имипенем	меропенем	цефепим	цефоперазон/сульбактам	ципрофлоксацин	цефтазидим	азтреонам	имипенем	TEM, CTX, KPC OXA, MBL	
1	пац. В.	2	8	1	0,5	4	4	0,06	2	I	R	-	R
2	пац. С.	>128	128	1	4	8	16	64	2	I	S	-	S
3	пац. К.	>128	32	16	32	32	64	>64	32	I	R	-	R
4	Смыв с перчатки медсестры	2	4	1	2	8	16	0,5	8	I	R	-	R
5	Мед.отходы	>128	128	1	8	8	16	64	4	I	S	-	S

Анализ значений МПК (мкг/мл) пяти штаммов: 3-х – от пациентов (В., С., К.) и 2-х – из внешней среды (смыв с перчатки медсестры, медицинские отходы) – установил циркуляцию в отделении гнойной хирургии как минимум двух вариантов возбудителя. Все 5 штаммов по значениям МПК к антибиотикам имели существенные отличия. Максимальные различия по ципрофлоксацину достигали 1067 раз.

При оценке чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом клинические штаммы от пациентов В. и К., а также со смыва с перчаток медсестры были устойчивы к имипенему и азтреонаму. Гены резистентности данных групп TEM, CTX-M, KPC, OXA и MBL обнаружены не были. Штамм *P. aeruginosa* от пациента С. и штамм, выделенный с медицинских отходов, обладали чувствительностью к имипенему, но

устойчивостью к азтреонаму. К комплексному бактериофагу, в отличие от перечисленных выше штаммов, эти два штамма были чувствительны.

Полученные нами результаты в третьей группе не исключали вывод о возможности заноса *P. aeruginosa* пациентами из других МО или внебольничный характер инфицирования.

Проведенные исследования по оценке антибиотикочувствительности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов и объектов внешней среды отделений стационаров хирургического и акушерского профиля методом серийных разведений с определением МПК, с определением генов, кодирующих продукцию β -лактамаз групп TEM, CTX-M, KPC, OXA и MBL методом ПЦР, а также по изучению чувствительности к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный (спот-тест), позволили установить наличие (отсутствие) связей между циркулирующими в структурных подразделениях стационаров изолятами. Вместе с тем, оценивая уровень гомологии штаммов внутри групп (сформированных по эпидемиологическим признакам, месту выделения), по количественным критериям (мкг/мл) разница в показателях по отдельным антибиотикам могла достигать 8-ми последовательных разведений антибиотика в тестовой панели (по ципрофлоксацину), что необходимо учитывать при оценке результатов.

К биотическим факторам, оказавшим влияние на различия результатов вследствие изменения уровня чувствительности штаммов к антибиотикам, можно отнести состояние системы антиинфекционной защиты пациента, взаимодействие с представителями нормофлоры локусов пациента, особенность фармакокинетики препаратов. Среди абиотических можно выделить такие агрессивные физические и химические факторы воздействия на микроорганизмы, как температура, ультрафиолетовое и электромагнитное излучение, переменный ток, кислоты, щелочи, антисептики, дезинфицирующие средства и т.д., широко используемые в лечебных учреждениях. Поэтому нельзя не учитывать зависимость результатов исследования от технических лабораторных погрешностей (в пределах 1-2 последовательных разведений), которые могли иметь место при постановке теста

(человеческий фактор). Таким образом, на примере изучения чувствительности штаммов *P.aeruginosa*, выделенных из различных медицинских учреждений и в разном временном интервале, установлено, что изучение чувствительности штаммов к антибиотикам методом серийных разведений и определение чувствительности штаммов к бактериофагу можно считать маркерами их сопоставимости при внутривидовом типировании.

3.2. Внутривидовая идентификация отдельных сиквенс-типов *Acinetobacter baumannii*

Для внутривидового типирования отобраны 74 полирезистентных штаммов *A. baumannii* из четырех многопрофильных МО. Медицинская организация А (ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России (МСЧ №140 стационар №1, поликлиника №1), медицинская организация В (ГБУЗ ПК «КМСЧ №1»), медицинская организация С (ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России МСЧ №133 (стационар №2)), медицинская организация Д (МСЧ №140: стационар №1 отделение СПО, в том числе штаммы от пациентов, поступивших из Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Пермского края "Краевая клиническая психиатрическая больница").

Бактериальные штаммы с типичными признаками, характерными для вида *A. baumannii*, выделены из биологического материала от пациентов с гнойно-септическими заболеваниями – 42 штамма: раневое отделяемое (8), мазок из носа (5), мокрота (7), БАЛ (9), плевральная жидкость (3), моча (5), материал при аутопсии ткани легкого (5), и с объектов внешней среды – 32 штамма: содержимое дренажей (12), смыв с аппарата ИВЛ (13), фильтр аппарата ИВЛ (7).

На начальном этапе работы проведено мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) 15 штаммов, выбранных в случайном порядке (Таблица 22). Исследование проведено совместно с д.м.н., руководителем лаборатории микробиологии Лазаревой А.В. и д.м.н., заведующим лабораторным отделом Маянским Н.А. (ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России).

Таблица 22 – Характеристика сиквенс-типов (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208) *A baumannii*, выделенных из медицинских организаций 2014-2017 гг.

№ п/п	№ штамма <i>A baumannii</i>	Место выделения	Материал	Сиквенс-тип (ST)
1	286	Медицинская организация А (стационар)	аутопсия ткани легкого	1167
2	680	Медицинская организация А (стационар)	отделяемое раны	1167
3	673	Медицинская организация А (стационар)	отделяемое носа	1167
4	568	Медицинская организация А (стационар)	аутопсия ткани легкого	1167
5	603	Медицинская организация А (стационар)	отделяемое раны	1167
6	624	Медицинская организация А (поликлиника)	мокрота	1167
7	2179	Медицинская организация А (стационар)	мокрота	944
8	31	Медицинская организация А (стационар)	БАЛ	944
9	6	Медицинская организация Д (стационар)	смыв с аппарата ИВЛ	944
10	1698	Медицинская организация Д (стационар)	мокрота	944
11	28	Медицинская организация В (стационар)	фильтр аппарата ИВЛ	944
12	3	Медицинская организация Д (стационар)	смыв с аппарата ИВЛ	208
13	23	Медицинская организация В (стационар)	отделяемое дренажа	208
14	22	Медицинская организация В (стационар)	БАЛ	208
15	32	Медицинская организация С (стационар)	БАЛ	208

По результатам типирования 15 штаммов *A. baumannii* были отнесены к трем сиквенс-типам (ST). К ST 1167 принадлежали 6 штаммов, ST 944 – 5 штаммов, ST 208 – 4.

Дальнейшая работа была посвящена характеристике фенотипических свойств штаммов *A. baumannii* разных сиквенс-типов, которая включала изучение:

1) биохимического профиля «NEFERMtest 24»: уреазы, аргинин, орнитин, лизин, ацетамид, β -глюкозидаза, N- ацетил β -D-глюкозидаза, цитрат Симмонса, лактоза, маннитол, трегалоза, ксилоза, арабиноза, α – галактозидаза, β

– галактозидаза, малонат, галактоза, мальтоза, целлобиоза, сахароза, инозитол, Y
– глутамилтрансфераза, фосфатаза, эскулин. Всего: 24 теста;

2) зон задержки роста на агаре Мюллера-Хинтон вокруг дисков с непрофильными антибиотиками диско-диффузионным методом: к эритромицину (15 мкг), ванкомицину (5 мкг), рифампицину (5 мкг), клиндамицину (2 мкг), фузидину (10 мкг), линезолиду (10 мкг). Всего 6 препаратов;

3) пленкообразующей способности на твердой поверхности (полистироловая панель) с оценкой оптической плотности;

4) чувствительности к анилиновым красителям диффузионным методом на МПА: 0,1% водно-спиртовой раствор бромтимолового синего, метиловый красный, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный, фуксин кислый. Всего 5 красителей;

5) чувствительности к дезинфицирующим средствам диффузионным методом: форэкс-хлор (0,1%; 0,06%), амиксидин (0,25%), ньюжавел (0,1%). Всего 4 наименования;

6) чувствительности к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный (спот-тест).

Изучение биохимической активности

Идентификацию штаммов *A. baumannii* по биохимическим свойствам проводили с использованием коммерческого набора «NEFERMtest 24» (производства «Erba Lachema», Чехия).

В ходе работы выявлена высокая биохимическая сопоставимость штаммов внутри сиквенс-типов и отсутствие таковой между ними по нескольким параметрам.

Все штаммы ST 1167 (100%) были положительными в тестах: цитрат Симмонса, ксилоза, арабиноза, малонат, галактоза, Y – глутамилтрансфераза, фосфатаза. Отрицательными по уреазе, аргинину, орнитину, лизину, ацетамиду, β-глюкозидазе, N- ацетил β-D-глюкозидазе, лактозе, маннитолау, трегалозе, α – галактозидазе, β – галактозидазе, мальтозе, целлобиозе, сахарозе, инозитолу, эскулину (Таблица 23).

Таблица 23 – Биохимическая активность штаммов *A.baumannii* (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

№	Тест	Код	Интерпретация результатов		
			ST 1167	ST 944	ST 208
1	Уреаза	URE	-	-	-
2	Аргинин	ARG	-	-	-
3	Орнитин	ORN	-	-	-
4	Лизин	LYS	-	-	-
5	Ацетамид	AAM	-	-	-
6	β – глюкозидаза	bGL	-	-	-
7	N- ацетил β -D-глюкозидаза	NAG	-	-	-
8	Цитрат Симмонса	SCI	+	+	+
9	Лактоза	LAC	-	-	-
10	Маннитол	MAN	-	-	-
11	Трегалоза	TRE	-	-	-
12	Ксилоза	XYL	+	-	+
13	Арабиноза	ARA	+	+	+
14	α – галактозидаза	aGA	-	-	-
15	β - галактозидаза	bGA	-	-	-
16	Малонат	MAL	+	-	-
17	Галактоза	GAL	+	+	+
18	Мальтоза	MLT	-	-	-
19	Целлобиоза	GEL	-	-	-
20	Сахароза	SUC	-	-	-
21	Инозитол	INO	-	-	-
22	Y – глутамилтрансфераза	gGT	+	-	-
23	Фосфатаза	PHS	+	+	+
24	Эскулин	ESL	-	-	-

Примечание: «-» – отрицательный результат; «+» – положительный результат

Штаммы ST 944 дали положительный результат в тестах: цитрат Симмонса, арабиноза, галактоза, фосфатаза. Были отрицательными по уреазе, аргинину, орнитину, лизину, ацетамиду, β -глюкозидазе, N- ацетил β -D-глюкозидазе, лактозе, маннитолу, трегалозе, ксилозе, α – галактозидазе, β – галактозидазе, малонату, мальтозе, целлобиозе, сахарозе, инозитолу, Y – глутамилтрансферазе, эскулину. Штаммы ST 208 были положительными по цитрату Симмонса, ксилозе, арабинозе, галактозе, фосфатазе. Отрицательными по уреазе, аргинину, орнитину, лизину, ацетамиду, β -глюкозидазе, N- ацетил β -D-глюкозидазе, лактозе, маннитолу, трегалозе, α – галактозидазе, β – галактозидазе, малонату, мальтозе, целлобиозе, сахарозе, инозитолу, Y – глутамилтрансферазе, эскулину.

Наименьшей биохимической активностью характеризовались штаммы ST 944, были положительными лишь в четырёх из 24-х тестов.

По результатам оценки биохимических свойств трех сиквенс-типов, были отобраны тесты в качестве кандидатов для проведения внутривидового типирования: малонат (MAL), ксилоза (XYL), Y – глутамилтрансфераза (gGT).

Изучение зон задержки роста вокруг дисков с антибиотиками

В качестве эксперимента были использованы антибиотики, которые для лечения инфекционной патологии с участием *A. baumannii* не применяются: эритромицин (15 мкг), ванкомицин (5 мкг), рифампицин (5 мкг), клиндамицин (2 мкг), фузидин (10 мкг), линезолид (10 мкг). Постановку тестов осуществляли, согласно МУК 4.2.1890—04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Оценку результатов проводили по признаку отсутствия зоны роста бактериальной культуры, выросшей на питательном агаре Мюллера-Хинтона вокруг диска с испытуемым антибиотиком (Рисунок 16).



Рисунок 16 – Зоны задержки роста *A. baumannii* к антибиотикам (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

Установлено, что все штаммы, отнесенные к ST 1167, имели зоны задержки роста к эритромицину, ванкомицину, рифампицину, клиндамицину, линезолиду. (Таблица 24).

Исключение составил фузидин – два штамма из шести дали рост вокруг диска сплошным газоном.

Штаммы ST 944 имели зону задержки роста к рифампицину. Штаммы ST 208 росли в присутствии эритромицина, клиндамицина, линезолида, фузидина. Подавляли их рост только ванкомицин и рифампицин.

Таблица 24 – Результаты зон задержки роста *A. baumannii* вокруг дисков с антибиотиками (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

Антибиотики № штамма <i>A. baumannii</i>	Интерпретация результатов														
	ST 1167						ST 944					ST 208			
	286	680	673	568	603	624	2179	31	6	1698	28	3	23	22	32
эритромицин	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ванкомицин	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
рифампицин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
клиндамицин	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
фузидин	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
линезолид	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие зоны задержки роста; «+» – присутствие зоны задержки роста

Таким образом, наименьшей активностью по отношению к выбранным антибиотикам, как и в случае изучения биохимических свойств, обладали штаммы сиквенс-типа ST 944, наибольшей – ST 1167. Как показали результаты исследования, для внутривидового типирования трех сиквенс-типов *A. baumannii* можно использовать диски с 4-мя антибиотиками: эритромицином, ванкомицином, клиндамицином, линезолидом.

Изучение пленкообразующей способности

Способность микроорганизмов формировать биопленки изучалась путем культивирования *A. baumannii* в лунках полистироловых микротитровальных планшетов с последующей окраской их адгезировавшей части и определением оптической плотности (ОП) на спектрофотометре Multiskan FC (Thermo Scientific, США) [164]. Оценку результатов проводили по критериям: высокое (ОП $\geq 4,0$), умеренное (ОП $\geq 3,0$), низкое пленкообразование (ОП $\geq 2,0$).

По результатам исследований все штаммы ST 1167 имели умеренную биопленкообразующую способность (ОП=2,03-3,05), штаммы ST 944 – высокую (ОП=4,03-5,12), штаммы ST 208 – низкую (ОП=1,07-1,82) (Таблица 25). Таким образом, штаммы ST 944 наряду с низкой биохимической активностью и

отношением к непрофильным антибиотикам обладали высокими пленкообразующими свойствами, что свидетельствовало об их высоком эпидемическом потенциале (наличие факторов вирулентности и адаптационной способности).

Таблица 25 – Биопленкообразующая способность штаммов *A.baumannii* (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

Сиквенс-тип	№ штамма <i>A. baumannii</i>	Биопленкообразующая способность, ОП ₄₅₀ М± m	Выраженность биоопленкообразования
ST 1167	286	2,03±0,14	Умеренная
	680	2,40±0,14	Умеренная
	673	2,95±0,11	Умеренная
	568	2,26±0,07	Умеренная
	603	2,73±0,21	Умеренная
	624	3,0±0,17	Умеренная
ST 944	2179	5,12±0,14	Высокая
	31	4,62±0,06	Высокая
	6	4,60±0,16	Высокая
	1698	4,41±0,18	Высокая
	28	4,03±0,19	Высокая
ST 208	3	1,82±0,11	Низкая
	23	1,20±0,08	Низкая
	22	1,33±0,13	Низкая
	32	1,07±0,08	Низкая

Установлено, что все эти штаммы (ST 944) были выделены из ОРИТ (мокрота, БАЛ, смывы с аппарата ИВЛ и фильтр аппарата ИВЛ), где, по мнению ряда авторов, и происходит формирование госпитальных популяций микроорганизмов [12, 55].

Изучение чувствительности к анилиновым красителям

Изучение признака проводилось путем определения чувствительности штаммов к 5-ти анилиновым красителям. Использовали 0,1% - ные водно-спиртовые растворы бромтимолового синего, метилового красного, фуксина основного, бромкрезолового пурпурного, фуксина кислого («НПФ «Абрис+», Россия).

Рост штаммов ST 1167 подавляли два красителя: фуксин кислый и фуксин основной (Таблица 26).

Таблица 26 – Чувствительность штаммов *A. baumannii* к анилиновым красителям (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

Анилиновые красители № штамма <i>A. baumannii</i>	Интерпретация результатов														
	ST 1167						ST 944					ST 208			
	286	680	673	568	603	624	2179	31	6	1698	28	3	23	22	32
бромтимоловый синий (1)	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
метиловый красный (2)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
фуксин основной (3)	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R
бромкрезоловый пурпурный (4)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
фуксин кислый (5)	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	R	R

Примечание: «R» – отсутствие зоны задержки роста, «S» – наличие зоны задержки роста

Штаммы ST 944 имели различный профиль чувствительности. К метиловому красному и бромкрезоловому пурпурному у них отсутствовали зоны задержки роста. К остальным трем красителям выявлена различная степень чувствительности. Штаммы ST 208 проявили устойчивость ко всем тестируемым анилиновым красителям (Рисунок 17).

Исходя из представленных выше результатов, данный признак не может быть применим с целью внутривидового типирования трех сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) в силу его высокой вариабельности внутри групп.



Рисунок 17 – Чувствительность штаммов *A. baumannii* ST 1167, ST 944, ST 208 к анилиновым красителям

Прежде всего, это относится к штаммам ST 944. Однако использовать данный тест можно для дифференцирования сиквенс-типов: ST 1167 и ST 208

между собой. По отношению к фуксину основному и фуксину кислому у ST 1167 признак положительный, у ST 208 – отрицательный.

Изучение чувствительности к дезинфицирующим средствам

Для исследования использовали дезинфектанты: форэкс-хлор (0,1% и 0,06%), амиксидин (0,25%), ньюжавел (0,1%). Чувствительность возбудителей к дезинфектантам оценивали согласно МУ 3.5.1.3439-17 «Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях». Штаммы считались чувствительными, если гибель тестируемого микроорганизма составляла 100 % (отсутствие роста во всех пробах), если менее 100 % (наличие роста в одной или более пробах) – считали устойчивым к данному дезинфицирующему средству в исследуемом режиме применения (Таблица 27).

Полученные результаты оказались вариабельными внутри всех трех групп. Отметим, что наиболее устойчивыми к дезинфицирующим средствам явились *A. baumannii*, выделенные из объектов внешней среды и из секционного материала (штаммы № 286, 568 – аутопсия ткани легкого; № 3, 6 – смыв с аппарата ИВЛ, № 28 – фильтр аппарата ИВЛ).

Таблица 27 – Чувствительность штаммов *A. baumannii* к дезинфицирующим средствам (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

Дезинфиц. сред-ва	Интерпретация результатов															
	№ штамма	ST 1167					ST 944					ST 208				
		286	680	673	568	603	624	2179	31	6	1698	28	3	23	22	32
<i>A. baumannii</i>																
форэкс-хлор 0,1%	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S	
форэкс-хлор 0,06%	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
амиксидин 0,25%	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	
ньюжавел 0,1%	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	

Примечание: «R» – устойчивые; «S» – чувствительные

Оценка результатов чувствительности *A. baumannii* к дезинфицирующим средствам позволила сделать вывод о нецелесообразности использования данного

признака при внутривидовом типировании трех сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208).

Изучение чувствительности к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный

Исследования проведены диффузионным методом (спот-тест) на питательной среде Мюллера-Хинтона. Критериями чувствительности считали степень лизиса бактериальной культуры на месте нанесения капель фага: «-» отсутствие литической активности; «+» низкая литическая активность; «++» лизис с большим количеством колоний вторичного роста; «+++» лизис с единичными колониями вторичного роста; «++++» сплошной лизис без колоний вторичного роста [1].

Штаммы *A. baumannii* ST 1167 имели высокий уровень чувствительности к бактериофагу (пять штаммов получили оценку «++++»). Штамм № 680 из этой группы отличался наличием единичных колоний вторичного роста в зоне лизиса, поэтому результат был оценен на «+++» (Таблица 28). Однако такой результат также относится к чувствительности к фагу.

Таблица 28 – Чувствительность штаммов *A. baumannii* к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208)

№ штамма <i>A. baumannii</i>	Результат														
	ST 1167						ST 944					ST 208			
	286	680	673	568	603	624	2179	31	6	1698	28	3	23	22	32
Комплексный бактериофаг	++	+++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	++	+++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие зоны лизиса; «+++» – с единичными колониями вторичного роста; «++++» – сплошной лизис без колонии вторичного роста

Штаммы сиквенс-типов (ST 944, ST 208) проявили устойчивость к комплексному бактериофагу «-».

В результате изучения фенотипических свойств штаммов *A. baumannii* трех сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) был сформирован оптимальный набор дифференциальных тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности микроорганизмов, в их числе: отношение к ксилозе, малонату, Y –

глутамилтрансферазе (биохимические тесты), отношение к эритромицину, клиндамицину, линезолиду (зоны задержки роста к антибиотикам), пленкообразующая способность, чувствительность к комплексному препарату бактериофага ацинетобактер-синегнойный. Полученная итоговая диагностическая панель по ключевым тестам отображена в Таблице 29.

Таблица 29 – Ключевые фенотипические признаки штаммов *A. baumannii* (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208) для внутривидового типирования

Признаки	ST 1167	ST 944	ST 208
1. Биохимические свойства			
ксилоза (XYL)	+	-	+
малонат (MAL)	+	-	-
Υ– глутамилтрансфераза (gGT)	+	-	-
2. Наличие зон задержки роста к непрофильным антибиотикам			
эритромицин	+	-	-
клиндамицин	+	-	-
линезолид	+	-	-
ванкомицин	+	-	+
3. Биопленкообразующая способность			
биопленкообразующая способность	умеренная	высокая	низкая
4. Чувствительность к бактериофагу			
фаголизабельность	+	-	-

Внутривидовое типирование штаммов *A. baumannii* ST 1167, ST 944 и ST 208 с использованием разработанной экспериментальной тестовой панели позволило провести эпидемиологическое расследование очагов из циркулирующих внутрибольничных штаммов в медицинских учреждениях, выявить между ними эпидемиологические связи (Рисунок 18) с целью принятия адекватных управленческих решений, направленных на их локализацию.

Установлено, что штаммы ST 1167 циркулировали только в одной МО (А). При этом местом их локализации было определено сомато-психиатрическое отделение, из которого их представители распространялись в другие структурные подразделения (выделены от пациентов терапевтического отделения и амбулаторного звена). Наряду со штаммами ST 1167 в СПО также циркулировали штаммы ST 944, которые были занесены в отделение из других медицинских организаций – В и Д.

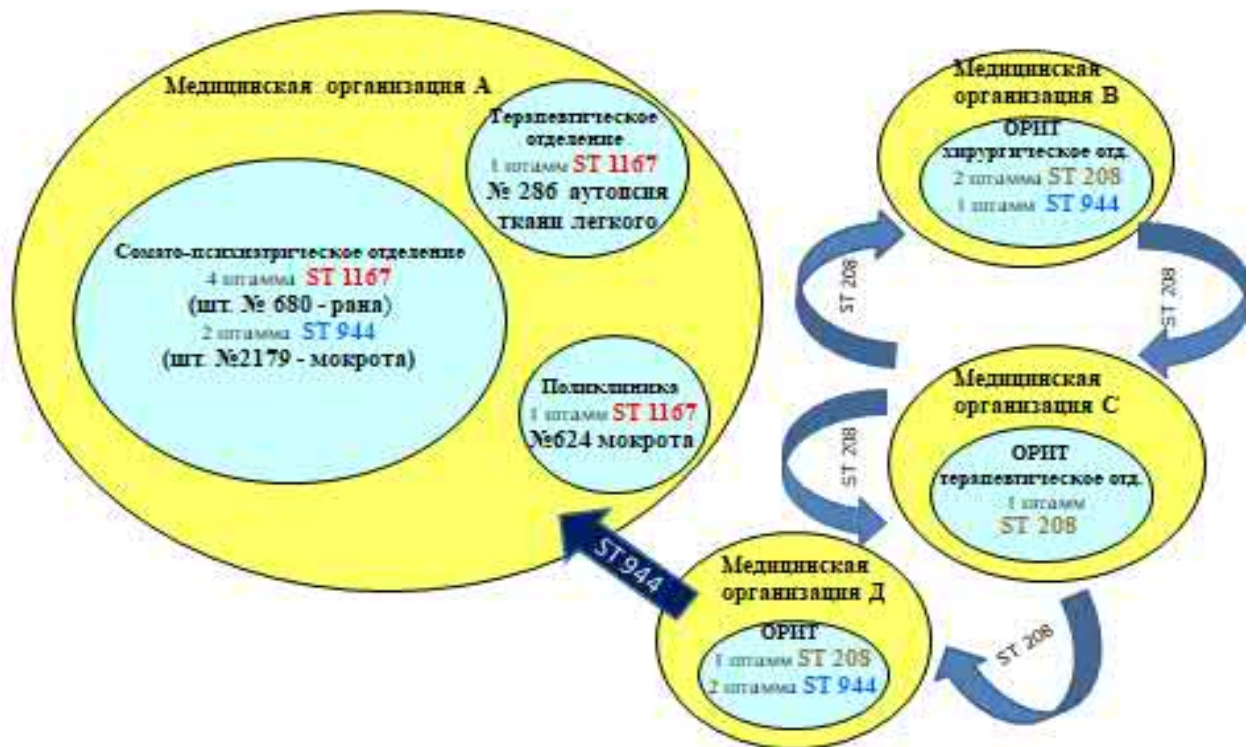


Рисунок 18 – Эпидемиологические связи между полирезистентными штаммами *A. baumannii* (сиквенс-типы ST 1167, ST 944, ST 208), циркулирующими в МО крупного промышленного центра (2015-2016 гг.)

СПО является специализированным городским централизованным структурным подразделением, куда в рамках маршрутизации поступают пациенты из перечисленных учреждений.

Сиквенс-тип ST 208 активно циркулировал в трех МО (B, C и D). Эти стационары имеют краевое подчинение и объединены между собой широкой сетью профильных подразделений.

Использование новой диагностической панели позволило в последующем провести внутривидовую дифференциацию оставшихся 59 из 74 штаммов *A. baumannii* (15 штаммов были использованы при ее разработке). По результатам тестирования из 59 штаммов *A. baumannii* 28 отнесены к ST 1167, 14 – к ST 944, 15 – к ST 208. Оставшиеся 2 штамма по изучаемым фенотипическим признакам, не подходили ни к одной из представленных групп. В дальнейшем их

генетическая принадлежность была подтверждена методом MLST. Штамм *A. baumannii* №80, выделенный из БАЛ (г. Пермь), был отнесен к ST 502, штамм № 76, выделенный из раны (г. Пермь) – к ST 450.

По результатам проведенных исследований в международную базу данных Pub MLST депонированы 6 сиквенс-типов (ST) *A. baumannii*, выделенных из медицинских организации г. Перми (№942 (22F); № 943 (32F); № 944 (23F); № 945 (28F); № 946 (2179F); № 952 (31) [136].

Таким образом, усовершенствованные и разработанные методы внутривидового типирования (идентификации) *A. baumannii* и *P. aeruginosa* с использованием гено – и фенотипических методов, а также определения чувствительности к разработанному комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный, могут быть востребованы и широко использованы в научных и практических целях (госпитальными микробиологами и эпидемиологами).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что *A. baumannii* и *P. aeruginosa* являются ведущими нозокомиальными патогенами во всем мире [141, 149, 173]. Оба представителя характеризуются природной устойчивостью к большинству антимикробных препаратов, имеют высокий потенциал приобретенной резистентности и чаще других циркулируют в отделениях реанимации и интенсивной терапии многопрофильных лечебных организаций [60, 62, 127, 209]. Одним из альтернативных (антибиотикам) средств для лечения и профилактики бактериальных инфекций предлагается использование бактериофагов, их спектр достаточно широк, однако отсутствует препарат бактериофага против *A. baumannii*. Актуальным является разработка комплексного препарата бактериофага с направленностью против *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. По данным литературы эти препараты могли бы успешно применять в лечении и диагностике бактериальных инфекций, прежде всего обусловленных возбудителями с высоким профилем антибиотикорезистентности [7, 27, 36, 128, 160].

Целью представленного исследования явилось получение комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный на основе созданной коллекции штаммов бактерий-продуцентов бактериофага и выделенного в госпитальных условиях бактериофага *A. baumannii* с изучением возможности его использования для идентификации (внутривидового типирования) полирезистентных штаммов микроорганизмов. В работе применены общенаучные подходы и специальные методы: микробиологические, молекулярно-генетические, статистической обработки данных.

На первом этапе работы проведен анализ учётно-отчётных форм (ф.30) и о циркуляции микроорганизмов в условиях больничной среды 2-х медицинских организаций Пермского края. Изучены результаты исследований 18693 образцов биологических материалов от пациентов и проб с объектов внешней среды.

Частота встречаемости неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) в медицинских организациях (выделено 13082 штамма) за 5 лет составила

25,8 % (95% ДИ [25,0 – 26,5]) с интервалом колебания показателя от 17,2 (95% ДИ [15,9– 18,7]) в 2014 г. до 36,0 (95% ДИ [34,5– 37,6]). Наиболее часто их представителей обнаруживали в нижних отделах дыхательных путей пациентов – 1360 (40,3 %), раневом отделяемом при инфекциях кожи и мягких тканей – 891 (26,4%). Существенно ниже был удельный вес НГОБ, выделенных из мочи – 6,8% (229 штаммов) (мазка из уха – 7,4% (250 штамма), зева – 4,3% (145 штамма), секционного материала (ткань легкого, сегментарные бронхи) – 3,7% (125 штамма), крови – 2,6% (88 шт.), фекалий – 2,2% (74 штамма). На объектах внешней среды НГОБ обнаружены в 6,3% (213 штамма) случаях. Лидирующее место среди представителей НГОБ занимали *P. aeruginosa* – 1135 (33,6%) и *A. baumannii* – 1041 (30,8%). При анализе данных о чувствительности *A. baumannii* и *P. aeruginosa* к антибиотикам с использованием традиционных микробиологических методов (в лабораториях практического звена МО) выявлен их низкий уровень чувствительности. Чувствительность *P. aeruginosa* (n=1135) к левофлоксацину составила $35,8 \pm 1,5\%$, к цефоперазону – $40,7 \pm 1,5\%$, к ципрофлоксацину – $45,7 \pm 1,5\%$, к амикацину – $51,8 \pm 1,5\%$, цефепиму – $73,6 \pm 1,3\%$, имипенему – $67,4 \pm 1,4\%$, цефтазидиму – $67,4 \pm 1,4\%$. Лишь к полимиксину и цефоперазон/сульбактаму она находилась на высоком уровне ($96,8 \pm 0,5\%$ и $93,8 \pm 0,7\%$ соответственно). Мониторинг клинических штаммов *A. baumannii* (n=1041) определил, что к гентамицину чувствительность составила $14,8 \pm 1,1\%$, ципрофлоксацину – $27,3 \pm 1,4\%$, амикацину – $32,7 \pm 1,4\%$, цефепиму – $36,7 \pm 1,5\%$, левофлоксацину – $40,9 \pm 1,5\%$, цефтазидиму – $47,4 \pm 1,5\%$, имипенему – $53,7 \pm 1,5\%$. Аналогично высокая чувствительность была отмечена к цефоперазон/сульбактаму – $98,0 \pm 0,4\%$ и полимиксину – $97,4 \pm 0,5\%$.

Результаты наших исследований соответствовали данным, полученным другими авторами [77, 79, 80], с уточнением, что эти данные являются корректными только для штаммов, выделенных в медицинских организациях Пермского края.

Полученные результаты позволили обосновать перспективность разработки нового комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный с направленностью на антибиотикорезистентные штаммы.

На начальном этапе исследований был получен экспериментальный образец ацинетобактерного бактериофага. Поиск бактериофагов (с 2014 по 2017 гг.) проводился на базе медицинских организаций с высокой частотой встречаемости возбудителей в образцах биологического материала от пациентов (102 образца) и в объектах внешней среды (50 образцов), включая сточные воды. Получено 8 фаголизатов, содержащих бактериофаги *A. baumannii*. При электронной микроскопии фаголизата визуализировали бактериофаг *A. baumannii*, принадлежащий к морфогруппе C1 семейства *Autographiviridae* (*Podoviridae*). Выделенный фаг имел головку икосаэдрической формы диаметром 55 нм с коротким несократимым хвостом длиной 5-7 нм. В ходе эксперимента установлено, что его средняя литическая активность по методу Аппельмана составила $10^{-4,62 \pm 0,56}$, а концентрация фаговых частиц по методу Грация – $2,8 \times 10^5$ БОЕ. По данным полногеномного секвенирования фаг относится к представителям недавно (2019 г.) обозначенного рода *Friunavirus*, подсемейства *Beijerinckvirinae*, семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales* [197, 206]. Линейный двухцепочечный ДНК-геном бактериофага *Acinetobacter phage_vB_AbaP_PE14* состоял из 41655 пар оснований (bp) нуклеотидных последовательностей. Данный вид бактериофага известен на территории России и его относят к литической группе фагов [172].

При создании экспериментального образца ацинетобактерного бактериофага с целью повышения литической активности мы провели последовательную работу по отбору штаммов – продуцентов бактериофага с формированием рабочей коллекции. Учитывая узкий спектр антимикробного действия фага, формирование коллекции заняло длительный период времени (2014-2020 гг.). Изучено 1320 бактериальных культур, из них нечувствительными (резистентными) к полученному и охарактеризованному фаголизату ацинетобактерного бактериофага оказались 912 штаммов (69,1%),

слабочувствительными – 272 (20,6%), высокочувствительными – 136 (10,3%). Адаптация 272 слабочувствительных штаммов проводилась путем последовательных селектирующих пассажей с бактериофагом под контролем оценки специфической активности. В процессе адаптации количество штаммов, лизирующихся маточным бактериофагом в титре не ниже 10^{-5} по методу Аппельмана, увеличилось на 28,4 % и достигло 190. Эти чувствительные штаммы легли в основу коллекции штаммов бактерий-продуцентов бактериофага. Бактериальные культуры были протестированы на наличие генов, кодирующих карбапенемазы групп OXA-23, OXA-40, OXA-58, NDM и VIM. У изученных претендентов, гены всех указанных выше карбапенемаз отсутствовали.

При получении комплексного бактериофага в качестве одного из компонентов использовали коммерческий бактериофаг «Бактериофаг псевдомонас аеругиноза (синегнойный)» производства «НПО «Микроген» (Россия). Его также подвергли электронно-микроскопическому исследованию, в ходе которого были визуализированы 3 разновидности синегнойного фага (KMV, фKZ, PB1), развивающиеся по литическому циклу.

На лабораторном ферментере – биореакторе BIOSTAT® Aplus («Sartorius», Германия) произвели три экспериментальных образца комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный (O.1; O.2; O.3).

При изучении основных свойств бактериофага и доказательства его вирулентности установлена длительность латентного периода (для *A. baumannii* 25-30 мин, для *P. aeruginosa* 35-40 мин) и средний выход фаговых частиц (61,2 и 91,2 соответственно). Полученные данные были сопоставимы с результатами изучения соответствующих свойств известных бактериофагов [51, 57].

Для определения литической активности комплексного бактериофага использовали референтные штаммы *A. baumannii* ATCC 27853 и *P. aeruginosa* ATCC 19606 и 8 штаммов бактерий *P. aeruginosa* и 8 штаммов *A. baumannii* из рабочей коллекции, не применяемых ранее при изготовлении препарата. Литическая активность комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный по методу Аппельмана составила $10^{-4,33 \pm 0,17}$ - *A. baumannii* и $10^{-5,66 \pm 0,17}$ - *P.*

aeruginosa, титр по Грация соответственно – $3,2 \times 10^5$ – $3,4 \times 10^6$ и $1,2 \times 10^6$ – $4,3 \times 10^7$.

Специфичность бактериофага проверяли на 60 штаммах микроорганизмов, представителей различных семейств, родов и видов (*S. aureus*, *Streptococcus spp.*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*). В процессе тестирования комплексный бактериофаг лизировал только штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* (100%).

Дополнительно оценку специфической (литической) активности бактериофага с определением индекса адгезии и процента пораженных клеток проводили на клеточной культуре ЛЭЧ-3 с использованием *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus*. По результатам эксперимента в течение 1 часа после совместного культивирования бактериальных культур с соответствующим бактериофагом на клетках ЛЭЧ-3 (опытная группа) индекс адгезии микроорганизмов достоверно ($p < 0,05$) снизился относительно эксперимента без добавления бактериофага (контрольная группа), у *A. baumannii* – с $15,58 \pm 1,1$ до $4,68 \pm 1,12$, у *P. aeruginosa* – с $27,54 \pm 1,17$ до $4,47 \pm 1,17$, у *S. aureus* – с $19,95 \pm 1,07$ до $4,79 \pm 1,12$. Аналогичные результаты получены по показателю процента пораженных клеток (ПК%) в монослое ЛЭЧ-3: у штаммов *A. baumannii* с бактериофагом – с $47,96 \pm 0,36\%$ до $8,73 \pm 0,02$ ($p < 0,001$), у *P. aeruginosa* – с $48,96 \pm 0,25\%$ до $6,36 \pm 0,04\%$ ($p < 0,001$), у *S. aureus* – с $42,49 \pm 0,12\%$ до $2,54 \pm 0,01\%$ ($p < 0,001$). Полученные данные свидетельствовали о том, что бактериофаг блокировал адгезивную активность изучаемых штаммов, тем самым препятствуя развитию инфекционного процесса. Таким образом, установлена высокая специфическая активность комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный наряду с коммерческим бактериофагом «Бактериофаг Стафилококковый» на культуре клеток ЛЭЧ-3.

Решающая роль в оценке эффективности любого разработанного антимикробного препарата заключается в оценке чувствительности к нему бактериальных штаммов. Исследования осуществляли в два этапа. На первом этапе оценку чувствительности проводили в 2014-2016гг. (г. Пермь) с

использованием 116 штаммов *A. baumannii*, выделенных от пациентов ОРИТ, а также от больных урологического, терапевтического, отоларингологического, СПО и амбулаторного звена. Результаты показали высокий уровень литической активности комплексного бактериофага ($81,0 \pm 5,4\%$) в ОРИТ. Уровень чувствительности штаммов *A. baumannii* к бактериофагу оказался сопоставим с антибиотиком резерва – тигециклином $83,0 \pm 3,7\%$ ($\chi^2 = 0,06$, d.f. = 1, $p = 0,8$).

В 2018-2020 гг. (г. Пермь, г. Екатеринбург) протестированы 83 полирезистентных штамма *A. baumannii*, выделенных из нижних отделов дыхательных путей пациентов ОРИТ. Средний уровень чувствительности штаммов к комплексному бактериофагу составил $72,3 \pm 1,2\%$.

Результаты свидетельствовали о высокой эффективности препарата бактериофага, уровень которой не снижался спустя пять лет, так как существенных отличий результатов, проведенных в 2018 – 2020 гг. ($72,3 \pm 1,2\%$) от результатов 2014 – 2016 гг. ($81,1 \pm 5,4\%$; $\chi^2 = 1,37$, d.f. = 1, $p = 0,24$) не выявлено.

Существует широкий набор методик для проведения внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов микроорганизмов, которые включают молекулярные, фенотипические и аналитические подходы [33, 39, 43, 135]. В нашем исследовании на примере полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*, выделенных от пациентов и объектов внешней среды отделений стационаров хирургического и акушерского профиля из МБМУ "Городская Больница № 3" ($n=53$), апробирован метод серийных разведений антибиотиков (с определением МПК), ПЦР-тест на продукцию генов β -лактамаз (часто встречаемых групп) и тест комплексным бактериофагом. Проведенные исследования установили наличие (отсутствие) связей между циркулирующими в структурных подразделениях штаммами и выявили с характерными признаками (количественными критериями МПК (мкг/л) антибиотиков при оценке антибиотикочувствительности и отношению к бактериофагу однотипные популяции полирезистентных штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующие в различных подразделениях стационаров в определенные временные интервалы.

Вместе с тем, при оценке уровня гомологии штаммов внутри групп (критерии МПК (мкг/л) разница в показателях по отдельным антибиотикам достигала 8-ми последовательных разведений, что необходимо учитывать при оценке и интерпретации результатов.

Резистентность госпитальных штаммов *A. baumannii* к различным классам антибиотиков, ряду дезинфицирующих средств существенно затрудняет проведение внутривидовой характеристики (внутривидового типирования) микроорганизмов. В нашей работе на примере *A. baumannii* использовали общедоступные тесты для проведения внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов (n=74) из четырех многопрофильных медицинских учреждений ФГБУЗ ПКЦ ФМБА России (МСЧ№140 (стационар №1, поликлиника №1, поликлиника №2, МСЧ №133 (стационар №2), г.Пермь. Проведено мультилокусное сиквенс-типирование, в ходе которого были отобраны 15 штаммов *A. baumannii*, отнесенных к трем сиквенс-типам (ST). К ST 1167 принадлежали 6 штаммов, к ST 944 – 5 штаммов, к ST 208 – 4. Дальнейшая работа была посвящена групповой характеристике их фенотипических свойств: биохимический профиль («NEFERMtest 24») – уреазы, аргинин, орнитин, лизин, ацетамид, β -глюкозидаза, N- ацетил β -D-глюкозидаза, цитрат Симмонса, лактоза, маннитол, трегалоза, ксилоза, арабиноза, α – галактозидаза, β – галактозидаза, малонат, галактоза, мальтоза, целлобиоза, сахароза, инозитол, Y – глутамилтрансфераза, фосфотаза, эскулин; изучение зон задержки роста (диско-диффузионным методом) вокруг дисков с непрофильными антибиотиками – эритромицином, ванкомицином, рифампицином, клиндамицином, фузидином, линезолидом; пленкообразующая способность на твердой поверхности (полистерол) по оценке оптической плотности; чувствительность к анилиновым красителям (0,1% водно-спиртовой раствор бромтимолового синего, метиловый красный, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный, фуксин кислый); чувствительность к дезинфицирующим средствам – форэкс-хлор (0,1%; 0,06%), амиксидин (0,25%), ньюжавел (0,1%); чувствительность к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный.

По результатам оценки биохимических свойств штаммы ST 1167 отличались от ST 944 и ST 208 по γ -глутамилтрансферазе и малонату, а ST 944 от ST 1167 и ST 208 – по ксилозе.

Изучение зон задержки роста вокруг дисков с непрофильными антибиотиками было проведено в качестве эксперимента, поскольку данные антибиотики в клинической практике для лечения инфекционной патологии с участием *A. baumannii* не применяются. Установлено, что все штаммы (100%), ST 1167, имели зону задержки роста вокруг дисков с эритромицином, ванкомицином, рифампицином, клиндамицином, линезолидом. Штаммы ST 944 имели зоны задержки роста вокруг единственного антибиотика – рифампицина. Изоляты ST 208 росли в присутствии эритромицина, клиндамицина, линезолида, фузидина. Подавляли их только ванкомицин и рифампицин.

Биопленки формировали все (100%) штаммы *A. baumannii*, однако у ST 1167 выявлена умеренная пленкообразующая способность (ОП=2,03-3,05), у ST 944 – высокая (ОП=4,03-5,12), у ST 208 – низкая (ОП=1,07-1,82).

При изучении чувствительности штаммов к анилиновым красителям (бромтимолового синего, метиловый красный, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный, фуксин кислый) определен различный профиль признака, как среди сиквенс-типов, так и внутри групп. Аналогичные результаты получены при изучении чувствительности микроорганизмов к дезинфицирующим средствам (форэкс-хлор (0,1% и 0,06%), амиксидин (0,25%), ньюжавел (0,1%).

Все штаммы *A. baumannii* ST 1167 (100%) имели высокий показатель чувствительности к разработанному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный. Штаммы сиквенс-типов ST 944 и ST 208 проявили устойчивость.

В результате был сформирован оптимальный набор дифференцирующих тестов, позволяющий выявить внутривидовые особенности 3-х широко распространенных сиквенс-типов *A. baumannii* по фенотипическим признакам: отношению к ксилозе, малонату, γ – глутамилтрансферазе (биохимическим тестам), отношению к эритромицину, клиндамицину, линезолиду (зонам задержки роста вокруг дисков с антибиотиками), пленкообразующей способности,

чувствительности к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный. Внутривидовое типирование штаммов *A. baumannii* ST 1167, ST 944 и ST 208 позволило провести эпидемиологическое расследование циркулирующих внутрибольничных штаммов в медицинских организациях и выявить между ними эпидемиологические связи.

Изложенное выше доказывает перспективность использования эффективного и экономичного набора для лаборатории научных подразделений, не имеющих возможности использовать методы секвенирования.

Итогом представленной диссертационной работы явилось выделение в больничных условиях с характеристикой основных параметров бактериофага *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae* (ранее сем. *Podoviridae*), депонирование последовательности ацинетобактерного бактериофага *Acinetobacter phage_vB_AbaP_PE14* в GenBank OL964948. Сформирована музейная коллекция высокочувствительных штаммов бактерий – продуцентов *A.baumannii*. Впервые на ее основе разработан экспериментальный образец комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный, установлен высокий уровень чувствительности к бактериофагу штаммов *A. baumannii*, циркулирующих в ОРИТ, соответствующий уровню чувствительности антибиотиков резерва (тигециклин). Разработан новый способ быстрой оценки специфической (литической) активности бактериофага на основе клеточной культуры ЛЭЧ-3. С использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный и метода серийных разведений усовершенствован способ внутривидового типирования *P. aeruginosa*, разработан и апробирован набор экономичных и доступных фенотипических дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности полирезистентных штаммов *A. baumannii* распространенных сиквенс типов ST 208, ST 944 и ST 1167.

ВЫВОДЫ

1. Доля штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* в структуре неферментирующих грамотрицательных бактерий, циркулирующих в медицинских организациях Пермского края, составляет 30,8% и 33,6%. В биологических материалах от пациентов преобладал *A. baumannii* (38,2%), во внешней среде – *P. aeruginosa* (53,1%).

2. Выделен и охарактеризован бактериофаг *A. baumannii*. По молекулярно-генетическому профилю – относится к роду *Fri1virus* семейства *Autographiviridae* (ранее сем. *Podoviridae*). Средний уровень литической активности фага по методу Аппельмана составил $10^{-4,62 \pm 0,18}$, концентрация фаговых частиц по Грациа – $2,8 \times 10^5$ БОЕ. Получен комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, с высокой литической активностью.

3. На модели клеточной культуры ЛЭЧ-3 с использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный разработан быстрый способ, позволяющий в течение 1 часа оценить специфическую активность бактериофага и адгезивные свойства микроорганизмов (индекс адгезии, процент пораженных клеток).

4. Уровень чувствительности штаммов *A. baumannii*, выделенных у пациентов ОРИТ к бактериофагу ацинетобактер-синегнойный – $81,1 \pm 5,4\%$ сопоставим с уровнем чувствительности к тигециклину – $83,0\% \pm 3,7\%$ ($\chi^2 = 0,06$, d.f. = 1, $p = 0,8$), что предполагает возможность широкого применения бактериофага с лечебно-профилактической целью в структурных подразделениях высокого риска развития гнойно-септических инфекций.

5. Метод серийных разведений антибиотиков с определением МПК (мкг/л) и использование бактериофага ацинетобактер-синегнойный являются внутривидовым маркером для изучения сопоставимости бактериальных штаммов в пространственном (разных отделениях стационара) и временном (3-6 месяцев) промежутке. Определен набор дифференцирующих тестов, позволяющих выявить внутривидовые особенности полирезистентных штаммов *A. baumannii* трех сиквенс-типов (ST 1167, ST 944 и ST 208).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. На основе изучения распространенности и особенностей циркуляции *A. baumannii* и *P. aeruginosa* в медицинских организациях рекомендовать к широкому использованию в отделениях реанимации и интенсивной терапии комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный в качестве средства очаговой и профилактической дезинфекции.

2. Внедрить в работу диагностических лабораторий, лабораторий научно-исследовательских институтов, предприятий по выпуску иммунобиологических препаратов эффективный и экономически значимый способ оценки специфической активности бактериофагов с использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3.

3. Использовать в системе микробиологического мониторинга за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи ацинетобактерной и синегнойной этиологии, новые методические подходы по идентификации (внутривидовому типированию) полирезистентных штаммов микроорганизмов с использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Использовать созданную и охарактеризованную коллекцию штаммов *A. baumannii*, коллекцию штаммов-продуцентов ацинетобактерного бактериофага и полученный из биологического материала и сточных вод бактериофаг *A. baumannii* Acinetobacter_phage_vB_AbaP_PE14 семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales* для изучения экологии микробных сообществ и развития эволюционных механизмов микроорганизмов, оценки их взаимоотношений на уровне «хозяин-паразит».
2. Полученные результаты о возможности применения клеточных линий ЛЭЧ-3 для оценки адгезивных свойств и фаголизабельности *A. baumannii* и *P. aeruginosa* открывают новые возможности изучения фенотипических свойств и факторов вирулентности актуальных бактериальных возбудителей гнойно-септической группы инфекций на клеточных культурах животных и человека.
3. Перспективным направлением исследований является продолжение исследовательской работы по оценке фенотипических и молекулярно-генетических особенностей внутрибольничных штаммов микроорганизмов с целью создания высокоэффективных диагностических тест-систем для проведения их внутривидовой идентификации, в том числе с использованием бактериофагов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБП	– антибактериальные препараты
БОЕ	– бляшкообразующая единица
ГСИ	– гнойно-септические инфекции
ДИ	– доверительный интервал
ИВЛ	– искусственная вентиляция легких
КК	– клеточная культура
ЛПС	– липополисахарид
ЛЭЧ -3	– легочные фибробласты эмбриона человека
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МО	– медицинские организации
МУ	– методические указания
НГОБ	– неферментирующие грамотрицательные бактерии
НИЦФ	– Научно-исследовательский центр фармакотерапии
НИР	– научно-исследовательская работа
НМ	– наружная мембрана
ОП	– оптическая плотность
ОРИТ	– отделение реанимации и интенсивной терапии
ПГ	– пептидогликан
ПИТ	– палата интенсивной терапии
ПКЦ	– Пермский клинический центр
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
РФ	– Российская Федерация
СПО	– сомато-психиатрическое отделение
ATCC	– American Type Culture Collection
MBL	– металло-бета-лактамазы
MLST	– мультилокусное сиквенс-типирование

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс, М. Бактериофаги. Методы изучения вирусов бактерий / Пер. с англ. Т. С. Ильиной и др.; Под ред. и с предисл. канд. биол. наук А. С. Кривинского / М. Адамс. – Москва: Изд-во иностр. лит. – 1961. – 527 с.
2. Акимкин, В.Г. Эпидемиологическая эффективность применения бактериофагов для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах / В.Г. Акимкин, А.В. Алимов, В.С. Поляков // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – Т. 10, № 283. – С. 36-43.
3. Алексюк, М.С. Фаги *Pseudomonas aeruginosa* – как альтернативный подход в антимикробной терапии / М.С. Алексюк, П.Г. Алексюк, А.П. Богоявленский, В.Э. Березин // Вестник Казахского Национального медицинского университета. – 2018. – № 3. – С. 22-27.
4. Алешкин, А.В. Опыт применения лечебных бактериофагов при гнойно-воспалительных заболеваниях ЛОР-органов / А.В. Алешкин // Медицинский совет. – 2015. – № 16. – С. 96-100.
5. Алешкин, А.В. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации / А.В. Алешкин, Э.А. Светоч, Н.В. Воложанцев, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, О.Н. Ершова, Л.И. Новикова // Бактериология. – 2016. – Т. 1, № 1. – С. 22-31.
6. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть II: современная история исследований фагопрофилактики и фаготерапии кишечных инфекций / А.В. Алешкин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Д.Л. Теплый, А.Х. Ахминеева, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, Е.Е. Рубальская // Астраханский медицинский журнал. – 2016. – Т. 11, № 3. – С. 8-17.
7. Асланов, Б.И. Пути рационального использования синегнойных бактериофагов в лечебной и противэпидемической практике / Б.И. Асланов, Р.Х. Яфаев, Л.П. Зуева // Журнал микробиологии. – 2003. – Т. 5, № 6. – С. 72-76.

8. Асланов, Б.И. Бактериофаги-эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б.И. Асланов // Медицинский совет. – 2015. – № 13. – С. 106-110.
9. Белопольская, Х.А. Возможности фаговой терапии гинекологической инфекции / Х.А. Белопольская, И.С. Сидорова, Л.С. Шахгиреева, А.А. Белопольский // Трудный пациент. – 2014. – Т. 12, № 8-9. – С. 6-9.
10. Богомолова, Н.С. Проблема лечения гнойно-воспалительных осложнений, обусловленных *Acinetobacter* / Н.С. Богомолова, Л.В. Большаков, С.М. Кузнецова // Анестезиология и реаниматология. – 2014. – № 1. – С. 26-32.
11. Брико, Н.И. Госпитальный штамм – непознанная реальность / Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, Л.А. Ряпис, В.Л. Стасенко, И.В. Фельдблюм, В.В. Шкарин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 68, № 1. – С. 30-35.
12. Брусина, Е.Б. Эффективность методологии оценки эпидемиологической безопасности медицинских технологий / Е.Б. Брусина, Я.В. Казачек, В.М. Сахарова, Д.Л. Шукевич // Журнал МедиАль. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 39.
13. Буданов, П.В. Метод профилактики инфекционных осложнений кесарева сечения / П.В. Буданов, Ж.Д. Новахова, М.К. Кабисашвили, Т.И. Шубина // Медицинский совет. – 2015. – С. 78-81.
14. Воронина, О.Л. Современные методы лабораторной диагностики в эпидемиологическом мониторинге возбудителей внутрибольничных инфекций / О.Л. Воронина, О.Л. Рыжова, О.Л. Кунда, А.В. Лазарева, Е.И. Аксенова, Н.И. Буркина, С.А. Сайдакова // Поликлиника. – 2016. – № 4-1. – С. 22-25.
15. Габрилович, И.М. Практическое пособие по бактериофагии / Под общ. ред. канд. мед. наук И. М. Габриловича / И.М. Габрилович, В.С. Полупанов, С.Б. Стефанов. – Минск: Вышэйшая школа. – 1968. – 179 с.
16. Габриэлян, Н.И. Чувствительность нозокомиальной микрофлоры, циркулирующей в трансплантационной клинике, к лечебным бактериофагам / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина, О.С. Дарбеева // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2004. – № 6. – С. 6-9.

17. Габриэлян, Н.И. Исследование антибиотико- и фагочувствительности нозокомиальных штаммов микробов, выделенных от пациентов трансплантологической клиники / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина, С.А. Прудникова, Л.Ю. Ромашкина // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 26-32.

18. Голошва, Е.В. Циркуляция антибиотикорезистентных неферментирующих бактерий в Ростове-на-Дону / Е.В. Голошва, А.В. Алешукина, Т.И. Твердохлебова // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2019. – Т. 9, № 2. – С. 52-55.

19. Голубкова, А.А. Клиническое значение микробиологического мониторинга в системе эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в отделении реанимации и интенсивной терапии ожогового центра / А.А. Голубкова, Ю.Ю. Трофимова, В.А. Багин // Медицинский альманах. – 2014. – Т. 34, № 4. – С. 38-41.

20. Горбич, Ю.Л. Инфекции, вызванные *Acinetobacter baumannii*: факторы риска, диагностика, лечение, подходы к профилактике / Ю.Л. Горбич, И.А. Карпов, О.И. Кречикова // Медицинские новости. – 2011. – № 5. – С. 31-39.

21. Гординская, Н.А. Особенности нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в травматологической клинике / Н.А. Гординская, Е.В. Сабирова, Н.В. Абрамова, Е.В. Дударева, Ю.А. Савочкина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – Т. 15, № 2. – С. 143-146.

22. Жуков-Вережников, Н.Н. Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний / Н.Н. Жуков-Вережников, Л.Д. Перемитина, Э.А. Берило, В.П. Комиссаров, В.М. Бардымов, А.Г. Хволес, Л.Б. Угрюмов // Советская медицина. – 1978. – Т. 12. – С. 64-66.

23. Заривчацкий, М.Ф. Роль поливалентного пиобактериофага в комплексном лечении панкреонекроза / М.Ф. Заривчацкий, В.В. Грищук, С.А. Блинов // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2010. – № 2 (38). – С. 25-27.

24. Захаренко, С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее / С.М. Захаренко // Медицинский совет. – 2013. – № 10. – С. 72-74.
25. Захарова, Ю.А. Использование препаратов бактериофагов у беременных при инфекциях мочевыводящих путей / Ю.А. Захарова, А.М. Николаева, М.М. Падруль // Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2010. – Т. 38, № 2. – С. 14-17.
26. Захарова, Ю.А. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов в терапии беременных с пиелонефритом: опыт практического использования, отдаленные результаты / Ю.А. Захарова, А.М. Николаева, М.М. Падруль // Медицинский совет. – 2013. – № 8. – С. 56-60.
27. Зуева, Л.П. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике ИСМП / Л.П. Зуева, И. Асланов, В.Г. Акимкин // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2014. – Т. 74, № 1. – С. 43-49.
28. Иконникова, Н.В. Бактериофаги–вирусы бактерий: учеб. пособие / Н.В. Иконникова. – Минск: ИВЦ Минфина. – 2017. – 41 с.
29. Казьянин, А.В. Бактериофаги: опыт производства и применения / А.В. Казьянин, Е.В. Орлова, М.Г. Ефимова, Е.В. Функнер, О.И. Шитова // Фармация. – 2010. – № 3. – С. 36-37.
30. Карпунина, Т.И. Сравнительный анализ фенотипов *Pseudomonas aeruginosa*, изолированных в многопрофильном хирургическом стационаре / Т.И. Карпунина, Н.В. Николаева, М.В. Кузнецова, В.А. Демаков // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2009. – № 4. – С. 476-478.
31. Козлов, Р.С. Антибиотикорезистентность грамотрицательных возбудителей осложненных интраабдоминальных инфекций в России / Р.С. Козлов, А.В. Голуб, А.В. Дехнич, М.В. Сухорукова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 3. – С. 227-234.
32. Козлова, Н.С. Антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-

септических инфекций в многопрофильном стационаре / Н.С. Козлова, Н.Е. Баранцевич, Е.П. Баранцевич // Проблемы медицинской микологии. – 2018. – Т. 20, № 1. – С. 40-48.

33. Кокин, Г.А. Применение фагов в хирургии / Г.А. Кокин // Советская медицина. – 1941. – Т. 9. – С. 15-18.

34. Комисарова, Е.В. Бактериофаги, фаговые полисахарид-деполимеразы и возможности их использования для лечения бактериальных инфекций / Е.В. Комисарова, В.М. Красильникова, Н.В. Воложанцев // Бактериология. – 2019. – Т. 4, № 4. – С. 7-14.

35. Крыжановская, О.А. Чувствительность к антибиотикам и механизмы устойчивости к карбапенемам *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей в отделениях реанимации и интенсивной терапии: автореф. дисс. канд. мед. наук: 03.02.03 / Крыжановская Ольга Андреевна. – М., 2016. – 25 с.

36. Кузнецова, М.В. Молекулярно-генетические исследования в лабораторной диагностике и мониторинге возбудителей госпитальных инфекций / М.В. Кузнецова, Е.Г. Плотникова, Т.И. Карпунина, Э.С. Горовиц, В.А. Демаков // Пермский медицинский журнал. – 2010. – Т. 27, № 6. – С. 128-138.

37. Кузнецова, М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* / М.В. Кузнецова, Н.В. Николаева, С.М. Розанова, Т.И. Карпунина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 4. – С. 8-14.

38. Куракин, Э.С. Перспективные подходы к диагностике внутрибольничных инфекций на основе современных представлений о молекулярно-генетических механизмах формирования госпитальных штаммов / Э.С. Куракин // Вестник новых медицинских технологий. – 2011. – Т. 18, № 4. – С. 265-268.

39. Летаров, А.В. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий / А.В. Летаров, Е.Е. Куликов // Успехи биологической химии. – 2017. – Т. 57. – С. 153-208.

40. Лукичев, М.М. Использование бактериофагов и пробиотиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / М.М. Лукичев, Л.А. Ермолаева // Институт стоматологии. – 2018. – № 1. – С. 84-87.

41. Маслов, Ю.Н. Показатель чувствительности бактериальных культур к анилиновым красителям как эпидемиологический маркер / Ю.Н. Маслов, И.В. Фельдблюм, О.Г. Пегушина, Л.А. Прохорова, А.Р. Ахмадзянова, Э.Х. Алиева // Медицинский алфавит. – 2015. – Т. 1, № 6. – С. 23-26.

42. Методические рекомендации Российской некоммерческой общественной организации «Ассоциация анестезиологов-реаниматологов», Межрегиональной общественной организации «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов», Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), общественной организации «Российский Сепсис Форум». Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами / Б.В. Белобородов, В.Г. Гусаров, А.В. Дехнич, М.Н. Замятин, Н.А. Зубарева, С.К. Зырянов, Д.А. Камышова, Н.Н. Клишко, Р.С. Козлов, В.В. Кулабухов, Ю.С. Полушин, В.А. Руднов, С.В. Сидоренко, И.В. Шлык, М.В. Эдельштейн, С.В. Яковлев // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2020. – Т. 17, № 1. – С. 52-83.

43. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2004. – 91 с.

44. Методические указания МУ 3.5.1.3439-17 Оценка чувствительности к дезинфицирующим средствам микроорганизмов, циркулирующих в медицинских организациях: утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 13.03.2017. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2017. – 10 с.

45. Мохов, Е.М. Перспективы применения бактериофагов в хирургии острого аппендицита / Е.М. Мохов, В.А. Кадыков, А.М. Морозов // Современные

проблемы науки и образования. – 2017. – № 2. – С. 129.

46. Новицкая, Н.В. Эпидемический процесс раневых инфекций, вызванных *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* в ожоговом стационаре многопрофильной больницы / Н.В. Новицкая // Политравма. – 2010. – № 4. – С. 72-75.

47. Патент 1058283 СССР, МПК С12N 7/00. Способ культивирования бактериофагов энтеробактерий / Н.Н. Ворошилова, И.А. Баснакьян, Т.Б. Казакова, А.И. Михайлов, Р.М. Каримов; заявитель и патентообладатель : Уфимский НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Московский НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова. – №3380099/13; заявл. 05.01.1982; опубл. 10.11.1995. – 4 с.

48. Патент 2036232 Российская Федерация, МПК С12N 3/00. Способ получения пхиобактериофага / Н.Н. Ворошилова, Т.Б. Казакова, Г.А. Горбаткова, Г.Г. Боговазова, Э.В. Афанасьева, В.М. Бондаренко; заявитель и патентообладатель : Уфимский НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Московский НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова. – №5030309/13; заявл. 02.03.1992; опубл. 27.05.1995. – 7 с.

49. Патент 2245920 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, А61К 35/74. Питательная среда для производства бактериофагов и способ ее получения / М.А. Каменева, А.В. Казьянин, Н.П. Ефимова, А.М. Николаева; заявитель и патентообладатель : ФГУП "НПО по медицинским иммунобиологическим препаратам "Микроген" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – №2002122069/13; заявл. 12.08.2002; опубл. 27.05.2004. Бюл. № 4. – 5 с.

50. Патент 2366437 Российская Федерация, МПК А61К 35/74, А61Р 31/04. Композиция на основе бактериофага (варианты) / В.А. Алёшкин, О.В. Рубальский, С.С. Афанасьев, А.В. Алёшкин, А.Г. Гаврин, А.М. Амерханова, О.В. Логунов, И.А. Киселёва, Т.Г. Пугачёва, Д.С. Афанасьев, Е.О. Рубальский, В.М. Голикова, В.Ю. Давыдкин, И.Ю. Давыдкин; заявитель и патентообладатель : ООО «Амфита». – №2007139680/15; заявл. 29.10.2007; опубл. 10.09.2009. Бюл. № 25. – 10 с.

51. Патент 2455355 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, А61К 35/76.

Штамм бактериофага *Pseudomonas aeruginosa*, используемый в качестве основы для приготовления асептического средства против синегнойной палочки / Ю.Н. Козлова, В.Е. Репин, В.В. Анищенко, В.В. Власов, Д.А. Ганичев, С.А. Семёнов, В.Г. Пугачев, О.С. Таранов; заявитель и патентообладатель: Репин Владимир Евгеньевич. – №2011115507/10; заявл. 19.04.2011; опубл. 10.07.2012. Бюл. № 19. – 5 с.

52. Плетенева, Е.А. Новый подход к составлению смесей бактериофагов для антибактериальной терапии / Е.А. Плетенева, О.В. Шабурова, М.В. Буркальцева, С.В. Крылов, А.М. Каплан, Е.Н. Чеснокова, О.А. Польша, Н.Н. Ворошилова, Н.А. Михайлова, В.В. Зверев, В.Н. Крылов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 5. – С. 3-11.

53. Плоткин, Л.Л. Инфекция, вызванная *Acinetobacter baumannii*, в отделениях реанимации и интенсивной терапии многопрофильного госпиталя / Л.Л. Плоткин, И.В. Молчанова, П.Г. Чумаков, М.Ю. Рахманов, А.Ю. Тюрин, Ю.М. Марченко // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2017. – Т. 14, № 6. – С. 22-27.

54. Покровский, В.И. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, А.С. Благонравова, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, А.В. Тутельян, И.В. Фельдблюм // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 1. – С. 4-7.

55. Покровский, В.И. Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В.И. Покровский, В.Г. Акимкин, Н.И. Брико, Е.Б. Брусина, Ю.А. Захарова, Л.П. Зуева, О.В. Ковалишена, В.Л. Стасенко, А.В. Тутельян, И.В. Фельдблюм // Медицинский альманах. – 2012. – № 2. – С. 12-16.

56. Польша, О.А. Современные подходы к способам создания фаговой основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa* / О.А. Польша, Н.Н. Ворошилова, Н.В. Тикунова, В.В. Морозова, А.Ю. Тикунов, В.Н. Крылов, А.А. Юнусова, А.Н. Дабижева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2018. – Т. 17, № 2 (99). – С. 37-45.

57. Попов, Д.В. Разработка фагового препарата для лечения хронического гнойного среднего отита: автореф. дисс. канд. мед. наук: 03.00.07 / Попов Денис Викторович. – М., 2003. – 28 с.

58. Попова, А.В. Молекулярно-генетическая характеристика антибиотикоустойчивых штаммов *Acinetobacter baumannii* и оценка их чувствительности к бактериофагу ap22 / А.В. Попова, В.П. Мякинина, М.Е. Платонов, Н.В. Воложанцев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – № 4. – С. 18-22.

59. Распоряжение Правительства РФ от 30.03.2019 № 604-р «Об утверждении Плана мероприятий на 2019 – 2024 годы по реализации Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года, утв. распоряжением Правительства РФ от 25.09.2017 № 2045-р». – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_321959.

60. Романова, М.А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / М.А. Романова, А.Ш. Додонова // Молодой ученый. – 2016. – № 18. – С. 110-114.

61. Руднов, В.А. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования / В.А. Руднов, Д.В. Бельский, А.В. Дехнич, А.С. Матвеев, О.Л. Гиевская, А.В. Дрозд, А.А. Фесенко, О.Г. Малкова, Г.В. Черкасов, В.А. Багин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13, № 4. – С. 294-303.

62. Самарцев, Т.И. Особенности инфицирования ожоговых ран / Т.И. Самарцев, Т.И. Карпунина, Ю.А. Еньчева, М.В. Кузнецова // Новости хирургии. – 2014. – Т. 22, № 2. – С. 199-207.

63. Сергевнин, В.И. Проявления эпидемического процесса гнойносептических инфекций среди пациентов реанимационного отделения многопрофильной больницы и антибиотикочувствительность возбудителей / В.И. Сергевнин, Н.М. Ключарева // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – Т. 68, № 1. – С. 23-30.

64. Скурихина, Ю.Е. Микробиологические и молекулярно-генетические аспекты антибиотикорезистентности *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* / Ю.Е. Скурихина, В.Б. Туркутюков // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2019. – Т. 18, № 6. – С. 34-38.

65. Соломенный, А.П. Генотипический анализ нозокомиальных штаммов *Acinetobacter baumannii* / А.П. Соломенный, Н.А. Зубарева, А.Е. Гончаров // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17, № 4. – С. 287-290.

66. Сухорукова, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг / М.В. Сухорукова, М.В. Эйдельштейн, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Тимохова, Е.А. Шек, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов, Д.А. Попов, М.А. Астанина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 42-48.

67. Тапальский, Д.В. Эффективность комбинаций антибиотиков в отношении карбапенемрезистентных госпитальных изолятов *Acinetobacter baumannii* / Д.В. Тапальский, А.В. Мозгова, А.И. Козлова // Клиническая инфектология и паразитология. Спецвыпуск в Беларуси. – 2014. – С. 95-103.

68. Тапальский, Д.В. *Acinetobacter baumannii*: распространенность, спектр и динамика антибиотикорезистентности, чувствительность к комбинациям антибиотиков / Д.В. Тапальский, Н.А. Бонда // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 16, № 3. – С. 286-291.

69. Тапальский, Д.В. Экстремально-антибиотикорезистентные грамотрицательные бактерии: распространение и стратегии антимикробного воздействия: автореф. дисс. доктора мед. наук: 03.02.03 / Тапальский Дмитрий Викторович. – Минск, 2019. – 44 с.

70. Тарасевич, В.Н. Антибиотики для медицинского применения на фармацевтическом рынке Российской Федерации / В.Н. Тарасевич, Е.И. Молохова, Н.В. Новикова // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». – 2019. – Т. 21, № 11. – С. 101-109.

71. Тихоненко, А.С. Ультраструктура вирусов бактерий / А.С. Тихоненко. – Москва: Наука. – 1968. – 90 с.
72. Федеральные клинические рекомендации. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. – 2014. – 82 с. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://nasci.ru/?id=3375>.
73. Фельдблюм, И.В. Организационные и методические основы микробиологического мониторинга, направленных на выявление внутрибольничных штаммов в учреждениях здравоохранения / И.В. Фельдблюм, Ю.А. Захарова // Дезинфекция. Антисептика. – 2011. – Т. 2, №8 – С. 21-29.
74. Функнер, Е.В. Микробиологические и технологические аспекты разработки комплексного препарата бактериофагов: автореф. дисс. канд. биол. наук: 03.00.07 / Функнер Елена Викторовна. – Пермь, 2007. – 154 с.
75. Хайруллин, И.Н. Эффективность применения специфических бактериофагов в лечении и профилактике хирургических послеоперационных инфекций / И.Н. Хайруллин, О.К. Поздеев, Р.Ш. Шаймарданов // Казанский медицинский журнал. – 2002. – Т. 83, № 4. – С. 258-261.
76. Хоулт, Д. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах. Т.2: Пер. с англ. / Д. Хоулт, Н. Криг. – М.: Мир. – 1997. – 368 с.
77. Чеботарь, И.В. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства / И.В. Чеботарь, А.В. Лазарева, Я.К. Масалов, В.М. Михайлович, Н.А. Маянский // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – Т. 69, № 9-10. – С. 39-50.
78. Черненькая, Т.В. Возбудители гнойно-септических внутрибольничных инфекций в реанимационных отделениях стационара скорой медицинской помощи / Т.В. Черненькая, Л.А. Борисова, И.В. Александрова, Д.А. Косолапов // Медицинский алфавит. – 2013. – Т. 2, № 12. – С. 30-33.
79. Шагинян, И.А. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические особенности / И.А. Шагинян, М.Ю. Чернуха // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2005. – Т. 7, № 3. – С. 271-285.

80. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5, № 2. – С. 12-24.

81. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования "МАРАФОН" 2013-2014 / М.В. Эйдельштейн, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, А.В. Микотина, Е.А. Шек, А.В. Дехнич, И.С. Азизов, Р.С. Козлов, Д.А. Попов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 37-41.

82. Эйдельштейн, М.В. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016» / М.В. Эйдельштейн, Е.А. Шек, М.В. Сухорукова, Е.Ю. Склеенова, Н.В. Иванчик, Э.Р. Шайдуллина, А.В. Микотина, А.Ю. Кузьменков, А.В. Дехнич, Р.С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21, № 2. – С. 160-170.

83. Эльхедми, А.Э. Электронно-микроскопический и рестрикционный анализ бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Pseudomonas* / А.Э. Эльхедми, В.П. Курченко, Т.В. Буткевич, С.В. Ризевский, В.Н. Леонтьев // Труды БГУ. Микробиология. – 2016. – Т. 11, № 2. – С. 211-219.

84. Abbott, I. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies / I. Abbott, G.M. Cerqueira, S. Bhuiyan, A.Y. Peleg // Expert review of anti-infective therapy. – 2013. – Vol. 11 (4). – P. 395-409.

85. Ackermann, H.-W. Tailed Bacteriophages: The Order *Caudovirales* / H.-W. Ackermann // Advances in virus research. – Elsevier. – 1998. – Vol. 51. – P. 135-201.

86. Ackermann, H.-W. Prokaryote viruses studied by electron microscopy / H.-W. Ackermann, D. Prangishvili // Archives of virology. – 2012. – Vol. 157 (10). – P. 1843-1849.

87. Alemayehu, D. Bacteriophages ϕ MR299-2 and ϕ NH-4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells / D. Alemayehu, P.G. Casey, O. McAuliffe, C.M. Guinane, J.G. Martin, F. Shanahan, A. Coffey, R.P. Ross, C. Hill // *MBio*. – 2012. – Vol. 3 (2). – P. e00029-12.
88. Altschul, S.F. Basic local alignment search tool / S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman // *Journal of molecular biology*. – 1990. – Vol. 215 (3). – P. 403-410.
89. Arhin, A. The outer membrane protein OprQ and adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human fibronectin / A. Arhin, C. Boucher // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156 (5). – P. 1415-1423.
90. Athanasiou, C.I. Systematic review of the use of time series data in the study of antimicrobial consumption and *Pseudomonas aeruginosa* resistance / C.I. Athanasiou, A. Kopsini // *Journal of global antimicrobial resistance*. – 2018. – Vol. 15. – P. 69-73.
91. Azeredo, J. *Pseudomonas bacteriophage* isolation and production / J. Azeredo, S. Sillankorva, D.P. Pires // *Pseudomonas Methods and Protocols*. Springer. – 2014. – P. 23-32.
92. Azghani, A.O. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture / A.O. Azghani, S. Idell, M. Bains, R.E.W. Hancock // *Microbial pathogenesis*. – 2002. – Vol. 33 (3). – P. 109-114.
93. Bankevich, A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing / A. Bankevich, S. Nurk, D. Antipov, A.A. Gurevich, M. Dvorkin, A.S. Kulikov, V.M. Lesin, S.I. Nikolenko, S. Pham, A.D. Prjibelski // *Journal of computational biology*. – 2012. – Vol. 19 (5). – P. 455-477.
94. Barrow, P.A. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential / P.A. Barrow, J.S. Soothill // *Trends in microbiology*. – 1997. – Vol. 5 (7). – P. 268-271.
95. Bayuga, S. Prevalence and antimicrobial patterns of *Acinetobacter baumannii* on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again /

S. Bayuga, C. Zeana, J. Sahni, P. Della-Latta, W. El-Sadr, E. Larson // Heart & lung. – 2002. – Vol. 31 (5). – P. 382-390.

96. Bergen, P.J. “Old” antibiotics for emerging multidrug-resistant bacteria. / P.J. Bergen, C.B. Landersdorfer, H.J. Lee, J. Li, R.L. Nation // Current opinion in infectious diseases. – 2012. – Vol. 25 (6). – P. 626-633.

97. Bergh, O. High abundance of viruses found in aquatic environments / O. Bergh, K.K.Y. Børsheim, G. Bratbak, M. Heldal, Ø. Bergh, K.K.Y. Børsheim, G. Bratbak, M. Heldal // Nature. – 1989. – Vol. 340. № 6233. – P. 467-468.

98. Bertozzi Silva, J. Host receptors for bacteriophage adsorption / J. Bertozzi Silva, Z. Storms, D. Sauvageau // FEMS microbiology letters. – 2016. – Vol. 363 (4). – P. 1-11.

99. Boucher, H.W. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America / H.W. Boucher, G.H. Talbot, J.S. Bradley, J.E. Edwards, D. Gilbert, L.B. Rice, M. Scheld, B. Spellberg, J. Bartlett // Clinical infectious diseases. – 2009. – Vol. 48 (1). – P. 1-12.

100. Brade, H. Biological activities of the lipopolysaccharide and lipid A from *Acinetobacter calcoaceticus* / H. Brade, C. Galanos // Journal of medical microbiology. – 1983. – Vol. 16 (2). – P. 211-214.

101. Breidenstein, E.B.M. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance / E.B.M. Breidenstein, C. de la Fuente-Núñez, R.E.W. Hancock // Trends in microbiology. – 2011. – Vol. 19 (8). – P. 419-426.

102. Brenner, S. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses / S. Brenner, R.W. Horne // Biochimica et biophysica acta. – 1959. – Vol. 34. – P. 103-110.

103. Caflisch, K.M. Biological challenges of phage therapy and proposed solutions: a literature review / K.M. Caflisch, G.A. Suh, R. Patel // Expert Review of Anti-infective Therapy. – 2019. – Vol. 17 (12). – P. 1011-1041.

104. Cai, Y. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies / Y. Cai, D. Chai, R. Wang, B. Liang, N. Bai // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2012. – Vol. 67 (7). – P. 1607-1615.

105. Caixeta, D.S. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas species* on stainless steel surface / D.S. Caixeta, T.H. Scarpa, D.F. Brugnera, D.O. Freire, E. Alves, L.R. De Abreu, R.H. Piccoli // Food Science and Technology. – 2012. – Vol. 32 (1). – P. 142-150.
106. Catalano, C.E. Viral genome packaging machines / C.E. Catalano // Viral genome packaging machines: Genetics, structure, and mechanism. – 2005. – P. 1-4.
107. Cerceo, E. Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options / E. Cerceo, S.B. Deitelzweig, B.M. Sherman, A.N. Amin // Microbial Drug Resistance. – 2016. – Vol. 22 (5). – P. 412-431.
108. Ceysens, P.-J. Bacteriophages of *Pseudomonas* / P.-J. Ceysens, R. Lavigne // Future microbiology. – 2010. – Vol. 5 (7). – P. 1041-1055.
109. Chatterjee, M. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options / M. Chatterjee, C.P. Anju, L. Biswas, V.A. Kumar, C.G. Mohan, R. Biswas // International Journal of Medical Microbiology. – 2016. – Vol. 306 (1). – P. 48-58.
110. Chen, L.-K. Potential of bacteriophage Φ AB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. / L.-K. Chen, Y.-L. Liu, A. Hu, K.-C. Chang, N.-T. Lin, M.-J. Lai, C.-C. Tseng // BMC microbiology. – 2013. – Vol. 13, № 1. – P. 154.
111. Choi, C.H. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells / C.H. Choi, J.S. Lee, Y.C. Lee, T.I. Park, J.C. Lee // BMC microbiology. – 2008. – Vol. 8, № 1. – P. 1-11.
112. Christensen, G.D. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. / G.D. Christensen, W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M. Baddour, F.F. Barrett, D.M. Melton, E.H. Beachey // Journal of clinical microbiology. – 1985. – Vol. 22, № 6. – P. 996-1006.
113. D'Herelle, F. George Hathorn Smith The Bacteriophage, Its Role in Immunity / F. D'Herelle, G.H. Smith // Baltimore: The Indian Medical Gazette. – 1923.

– Vol. 58, №9. – P. 443-444.

114. Dijkshoorn, L. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / L. Dijkshoorn, A. Nemec, H. Seifert // Nature reviews microbiology. – 2007. – Vol. 5 (12). – P. 939-951.

115. Doughari, H.J.J. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter spp.*: An Overview / H.J.J. Doughari, P.A.A. Ndakidemi, I.S.S. Human, S. Benade // Microbes and Environments. – 2009. – Vol. 26 (2). – P. 1103150282.

116. Falagas, M.E. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology / M.E. Falagas, D.E. Karageorgopoulos // Clinical infectious diseases. – 2008. – Vol. 46 (7). – P. 1121-1122.

117. Forti, F. Design of a broad-range bacteriophage cocktail that reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and treats acute infections in two animal models / F. Forti, D.R. Roach, M. Cafora, M.E. Pasini, D.S. Horner, E. V Fiscarelli, M. Rossitto, L. Cariani, F. Briani, L. Debarbieux // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2018. – Vol. 62 (6). – P. 1-13.

118. Freire, A.T. Comparison of tigecycline with imipenem/cilastatin for the treatment of hospital-acquired pneumonia / A.T. Freire, V. Melnyk, M.J. Kim, O. Datsenko, O. Dzyublik, F. Glumcher, Y.-C. Chuang, R.T. Maroko, G. Dukart, C.A. Cooper // Diagnostic microbiology and infectious disease. – 2010. – Vol. 68 (2). – P. 140-151.

119. Fukuda, K. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration / K. Fukuda, W. Ishida, J. Uchiyama, M. Rashel, S. Kato, T. Morita, A. Muraoka, T. Sumi, S. Matsuzaki, M. Daibata // PloS one. – 2012. – Vol. 7 (10). – P. e47742.

120. Gabler, F. Protein sequence analysis using the MPI bioinformatics toolkit / F. Gabler, S. Nam, S. Till, M. Mirdita, M. Steinegger, J. Söding, A.N. Lupas, V. Alva // Current Protocols in Bioinformatics. – 2020. – Vol. 72 (1). – P. e108.

121. Garnacho-Montero, J. Multiresistant *Acinetobacter baumannii* infections: epidemiology and management / J. Garnacho-Montero, R. Amaya-Villar // Current

opinion in infectious diseases. – 2010. – Vol. 23 (4). – P. 332-339.

122. Garnacho-Montero, J. Managing *Acinetobacter baumannii* infections / J. Garnacho-Montero, J.-F. Timsit // Current opinion in infectious diseases. – 2019. – Vol. 32 (1). – P. 69-76.

123. German, G.J. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage / G.J. German, R. Misra // Journal of molecular biology. – 2001. – Vol. 308 (4). – P. 579-585.

124. Giltner, C.L. The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces / C.L. Giltner, E.J. Van Schaik, G.F. Audette, D. Kao, R.S. Hodges, D.J. Hassett, R.T. Irvin // Molecular microbiology. – 2006. – Vol. 59 (4). – P. 1083-1096.

125. Giske, C.G. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance / C.G. Giske, L. Martinez, R. Canton, S. Stefani, R. Skov, Y. Glupczynski, P. Nordmann, M. Wootton, V. Miriagou, G.S. Simonsen, H. Zemlickova, J. Cohen-Stuart, M. Gniadkowski. – The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. – 2017. – 43 p.

126. Goncharov, A. International epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* in Russia / A. Goncharov, A. Solomennyi, T. Suborova // International Journal of Infectious Diseases. – 2012. – Vol. 16. – P. e371.

127. Gorski, A. Phage therapy: combating infections with potential for evolving from merely a treatment for complications to targeting diseases / A. Gorski, R. Międzybrodzki, B. Weber-Dąbrowska, W. Fortuna, S. Letkiewicz, P. Rogóż, E. Jończyk-Matysiak, K. Dąbrowska, J. Majewska, J. Borysowski // Frontiers in microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1515.

128. Gusten, W.M. *Acinetobacter baumannii* pseud meningitis / W.M. Gusten, E.A. Hansen, B.A. Cunha // Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care. – 2002. – Vol. 31 (1). – P. 76-78.

129. Hammer, PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis / Hammer, D. Harper, D.R. Paul // Palaeontologia electronica. – 2001.

– Vol. 4 (1) (art. 4). – P. 1-9.

130. Hendrix, R.W. Bacteriophages: evolution of the majority / R.W. Hendrix // Theoretical population biology. – 2002. – Vol. 61 (4). – P. 471-480.

131. Higgins, P.G. gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter genomic* species 3 / P.G. Higgins, M. Lehmann, H. Wisplinghoff, H. Seifert // Journal of clinical microbiology. – 2010. – Vol. 48 (12). – P. 4592-4594.

132. Hua, Y. Phage therapy as a promising new treatment for lung infection caused by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in mice / Y. Hua, T. Luo, Y. Yang, D. Dong, R. Wang, Y. Wang, M. Xu, X. Guo, F. Hu, P. He // Frontiers in microbiology. – 2018. – Vol. 8. – P. 2659.

133. Ibrahim, M.E. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia: risk factors, antimicrobial resistance patterns and mechanisms of carbapenem resistance / M.E. Ibrahim // Annals of clinical microbiology and antimicrobials. – 2019. – Vol. 18 (1). – P. 1.

134. Jácome, P.R.L. de A. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* and *Klebsiella spp.* from cancer patients with healthcare-associated infections. / P.R.L. de A. Jácome, L.R. Alves, A.T. Jácome-Júnior, M.J.B. da Silva, J.L. da C. Lima, P.S.R. Araújo, A.C.S. Lopes, M.A.V. Maciel // Journal of medical microbiology. – 2016. – Vol. 65 (7). – P. 658-665.

135. Jeon, J. Efficacy of bacteriophage treatment against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in *Galleria mellonella* larvae and a mouse model of acute pneumonia / J. Jeon, J.-H. Park, D. Yong // BMC microbiology. – 2019. – Vol. 19 (1). – P. 70.

136. Jolley, K.A. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. / K.A. Jolley, J.E. Bray, M.C.J. Maiden // Wellcome open research. – 2018. – Vol. 3. – P. 124.

137. Jung, J. *Acinetobacter* species as model microorganisms in environmental microbiology: current state and perspectives / J. Jung, W. Park // Applied microbiology

and biotechnology. – 2015. – Vol. 99 (6). – P. 2533-2548.

138. Kaczkowski, H. Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases / H. Kaczkowski, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski, Z. Zdrojewicz, F. Cwiroro // *Wiadomosci lekarskie* (Warsaw, Poland: 1960). – 1990. – Vol. 43 (3-4). – P. 136-141.

139. Kanamaru, S. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4 / S. Kanamaru, P.G. Leiman, V.A. Kostyuchenko, P.R. Chipman, V. V Mesyanzhinov, F. Arisaka, M.G. Rossmann // *Nature*. – 2002. – Vol. 415 (6871). – P. 553-557.

140. Karaiskos, I. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches / I. Karaiskos, H. Giamarellou // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2014. – Vol. 15 (10). – P. 1351-1370.

141. Kelley, L.A. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis / L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J.E. Sternberg // *Nature protocols*. – 2015. – Vol. 10 (6). – P. 845-858.

142. Kempf, M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options / M. Kempf, J.-M. Rolain // *International journal of antimicrobial agents*. – 2012. – Vol. 39 (2). – P. 105-114.

143. Kenyon, J.J. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes / J.J. Kenyon, R.M. Hall // *PloS one*. – 2013. – Vol. 8 (4). – P. e62160.

144. Kim, M. Spontaneous and transient defence against bacteriophage by phase-variable glucosylation of O-antigen in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* / M. Kim, S. Ryu // *Molecular microbiology*. – 2012. – Vol. 86, № 2. – P. 411-425.

145. Ko, K.S. High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea / K.S. Ko, J.Y. Suh, K.T. Kwon, S.-I. Jung, K.-H. Park, C.I. Kang, D.R. Chung, K.R. Peck, J.-H. Song // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2007. – Vol. 60 (5). – P. 1163-1167.

146. Krylov, V.N. Bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*: long-term prospects for use in phage therapy / V.N. Krylov // *Advances in virus research*.

Elsevier. – 2014. – Vol. 88. – P. 227-278.

147. Kutter, E. Bacteriophages: biology and applications / E. Kutter, A. Sulakvelidze. – Crc press. – 2004. – P. 254.

148. Labarca, J.A. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America / J.A. Labarca, M.J.C. Salles, C. Seas, M. Guzmán-Blanco // Critical reviews in microbiology. – 2016. – Vol. 42 (2). – P. 276-292.

149. Labrie, S.J. Bacteriophage resistance mechanisms / S.J. Labrie, J.E. Samson, S. Moineau // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – Vol. 8 (5). – P. 317-327.

150. Lenski, R.E. Dynamics of interactions between bacteria and virulent bacteriophage / R.E. Lenski // Advances in microbial ecology. Springer. – 1988. – P. 1-44.

151. Lim, C.L.L. Importance of control groups when delineating antibiotic use as a risk factor for carbapenem resistance, extreme-drug resistance, and pan-drug resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review and meta-analysis / C.L.L. Lim, A.Q. Chua, J.Q.M. Teo, Y. Cai, W. Lee, A.L.-H. Kwa // International Journal of Infectious Diseases. – 2018. – Vol. 76. – P. 48-57.

152. Lin, N.-T. Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* / N.-T. Lin, P.-Y. Chiou, K.-C. Chang, L.-K. Chen, M.-J. Lai // Research in microbiology. – 2010. – Vol. 161 (4). – P. 308-314.

153. Liu, Q. Risk and prognostic factors for multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia: a retrospective study in a tertiary hospital of West China / Q. Liu, W. Li, X. Du, W. Li, T. Zhong, Y. Tang, Y. Feng, C. Tao, Y. Xie // PLoS One. – 2015. – Vol. 10 (6). – P. e0130701.

154. Lorente, C. Prevention of infection in the intensive care unit: Current advances and opportunities for the future / C. Lorente, Y. Del Castillo, J. Rello // Current Opinion in Critical Care. – 2002. – Vol. 8 (5). – P. 461-464.

155. MacVane, S.H. Antimicrobial resistance in the intensive care unit: a focus on gram-negative bacterial infections / S.H. MacVane // Journal of intensive care medicine. – 2017. – Vol. 32 (1). – P. 25-37.

156. Madesclaire, M. Reduction of sulfoxides to thioethers / M. Madesclaire // *Tetrahedron*. – 1988. – Vol. 44 (21). – P. 6537-6580.

157. McCracken, M. Characterization of *Acinetobacter baumannii* and meropenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Canada: results of the CANWARD 2007–2009 study / M. McCracken, L.F. Mataseje, V. Loo, A. Walkty, H.J. Adam, D.J. Hoban, G.G. Zhanel, M.R. Mulvey // *Diagnostic microbiology and infectious disease*. – 2011. – Vol. 69 (3). – P. 335-341.

158. Merabishvili, M. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials / M. Merabishvili, J.-P. Pirnay, G. Verbeken, N. Chanishvili, M. Tediashvili, N. Lashkhi, T. Glonti, V. Krylov, J. Mast, L. Van Parys // *PloS one*. – 2009. – Vol. 4 (3). – P. e4944.

159. Międzybrodzki, R. Clinical aspects of phage therapy / R. Międzybrodzki, J. Borysowski, B. Weber-Dąbrowska, W. Fortuna, S. Letkiewicz, K. Szufnarowski, Z. Pawełczyk, P. Rogóż, M. Kłak, E. Wojtasik // *Advances in virus research*. Elsevier. – 2012. – Vol. 83. – P. 73-121.

160. Morello, E. Pulmonary bacteriophage therapy on *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strains: first steps towards treatment and prevention / E. Morello, E. Saussereau, D. Maura, M. Huerre, L. Touqui, L. Debarbieux // *PloS one*. – 2011. – Vol. 6 (2). – P. e16963.

161. Motbainor, H. Multi-drug resistance of blood stream, urinary tract and surgical site nosocomial infections of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* among patients hospitalized at Felegehiwot referral hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study / H. Motbainor, F. Bereded, W. Mulu // *BMC Infectious Diseases*. – 2020. – Vol. 20 (1). – P. 92.

162. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited / H. Nikaido // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2003. – Vol. 67 (4). – P. 593-656.

163. Nowak, P. *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance—role of carbapenemases / P. Nowak, P. Paluchowska // *Folia histochemica et cytobiologica*. – 2016. – Vol. 54, № 2. – P. 61-74.

164. O'Toole, G. Biofilm formation as microbial development / G. O'Toole, H.B.

Kaplan, R. Kolter // Annual Reviews in Microbiology. – 2000. – Vol. 54, № 1. – P. 49-79.

165. Parmar, K.M. Control of multidrug-resistant gene flow in the environment through bacteriophage intervention / K.M. Parmar, Z.J. Hathi, N.A. Dafale // Applied biochemistry and biotechnology. – 2017. – Vol. 181, № 3. – P. 1007-1029.

166. Parte, A.C. LPSN–List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on / A.C. Parte // International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2018. – Vol. 68, № 6. – P. 1825-1829.

167. Peleg, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen / A.Y. Peleg, H. Seifert, D.L. Paterson // Clinical microbiology reviews. – 2008. – Vol. 21, № 3. – P. 538-582.

168. Peng, F. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates / F. Peng, Z. Mi, Y. Huang, X. Yuan, W. Niu, Y. Wang, Y. Hua, H. Fan, C. Bai, Y. Tong // BMC microbiology. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 181.

169. Pereira, S.G. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydrophobic facility and respiratory infections / S.G. Pereira, A.C. Rosa, A.S. Ferreira, L.M. Moreira, D.N. Proença, P. V Morais, O. Cardoso // Journal of applied microbiology. – 2014. – Vol. 116 (5). – P. 1359-1368.

170. Perez, F. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / F. Perez, A.M. Hujer, K.M. Hujer, B.K. Decker, P.N. Rather, R.A. Bonomo // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – Vol. 51 (10). – P. 3471-3484.

171. Popova, A. V Novel Fri1-like Viruses Infecting *Acinetobacter baumannii*—vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12—Characterization, Comparative Genomic Analysis, and Host-Recognition Strategy. / A. V Popova, D.G. Lavysh, E.I. Klimuk, M. V Edelstein, A.G. Bogun, M.M. Shneider, A.E. Goncharov, S. V Leonov, K. V Severinov // Viruses. – 2017. – Vol. 9 (7). – P. 188.

172. Potron, A. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology / A. Potron, L. Poirel, P.

Nordmann // International journal of antimicrobial agents. – 2015. – Vol. 45 (6). – P. 568-585.

173. Qiu, H. Role of macrophages in early host resistance to respiratory *Acinetobacter baumannii* infection / H. Qiu, R. KuoLee, G. Harris, N. Van Rooijen, G.B. Patel, W. Chen // PloS one. – 2012. – Vol. 7 (6). – P. e40019.

174. Queenan, A.M. Carbapenemases: the versatile β -lactamases / A.M. Queenan, K. Bush // Clinical microbiology reviews. – 2007. – Vol. 20 (3). – P. 440-458.

175. Rakhuba, D. V Bacteriophage receptors, mechanisms of phage adsorption and penetration into host cell / D. V Rakhuba, E.I. Kolomiets, E.S. Dey, G.I. Novik // Pol J Microbiol. – 2010. – Vol. 59 (3). – P. 145-155.

176. Regeimbal, J.M. Personalized therapeutic cocktail of wild environmental phages rescues mice from *Acinetobacter baumannii* wound infections / J.M. Regeimbal, A.C. Jacobs, B.W. Corey, M.S. Henry, M.G. Thompson, R.L. Pavlicek, J. Quinones, R.M. Hannah, M. Ghebremedhin, N.J. Crane // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2016. – Vol. 60 (10). – P. 5806-5816.

177. Rice, L.B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE / L.B. Rice // The Journal of Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 197 (8). – P. 1079-1081.

178. Rieber, H. Emergence of metallo- β -lactamases GIM-1 and VIM in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in North Rhine–Westphalia, Germany / H. Rieber, A. Frontzek, H. von Baum, Y. Pfeifer // Journal of antimicrobial chemotherapy. – 2012. – Vol. 67 (4). – P. 1043-1045.

179. Rosenthal, V.D. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary of 50 countries for 2010-2015: Device-associated module / V.D. Rosenthal, H.M. Al-Abdely, A.A. El-Kholy, S.A.A. AlKhawaja, H. Leblebicioglu, Y. Mehta, V. Rai, N.V. Hung, S.S. Kanj, M.F. Salama // American journal of infection control. – 2016. – Vol. 44 (12). – P. 1495-1504.

180. Rossau, R. Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms / R. Rossau, A. Van Landschoot, M. Gillis, J. De Ley // International Journal

of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1991. – Vol. 41 (2). – P. 310-319.

181. Schooley, R.T. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection / R.T. Schooley, B. Biswas, J.J. Gill, A. Hernandez-Morales, J. Lancaster, L. Lessor, J.J. Barr, S.L. Reed, F. Rohwer, S. Benler, A.M. Segall, R. Taplitz, D.M. Smith, K. Kerr, M. Kumaraswamy, V. Nizet, L. Lin, M.D. McCauley, S.A. Strathdee, C.A. Benson, R.K. Pope, B.M. Leroux, A.C. Picel, A.J. Mateczun, K.E. Cilwa, J.M. Regeimbal, L.A. Estrella, D.M. Wolfe, M.S. Henry, J. Quinones, S. Salka, K.A. Bishop-Lilly, R. Young, T. Hamilton // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. – Vol. 61 (10). – P. e00954-17.

182. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30 (14). – P. 2068-2069.

183. Shanthi, M. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections among hospitalized patients: risk factors and outcomes. / M. Shanthi, U. Sekar // The Journal of the Association of Physicians of India. – 2009. – Vol. 57. – P. 636-638.

184. Shi, J. Multidrug resistant and extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii* hospital infection associated with high mortality: a retrospective study in the pediatric intensive care unit. / J. Shi, T. Sun, Y. Cui, C. Wang, F. Wang, Y. Zhou, H. Miao, Y. Shan, Y. Zhang // BMC infectious diseases. – 2020. – Vol. 20 (1). – P. 597.

185. Shivaswamy, V.C. Ability of bacteriophage in resolving wound infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in uncontrolled diabetic rats / V.C. Shivaswamy, S.B. Kalasuramath, C.K. Sadanand, A.K. Basavaraju, V. Ginnavaram, S. Bille, S.S. Ukken, U.N. Pushparaj // Microbial drug resistance. – 2015. – Vol. 21 (2). – P. 171-177.

186. Sievert, D.M. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010 / D.M. Sievert, P. Ricks, J.R. Edwards, A. Schneider, J. Patel, A. Srinivasan, A. Kallen, B. Limbago, S. Fridkin // Infection control and hospital epidemiology. – 2013. – Vol. 34 (1). – P. 1-14.

187. Smith, R.S. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence / R.S. Smith, B.H. Iglewski // *Current opinion in microbiology*. – 2003. – Vol. 6 (1). – P. 56-60.
188. Soothill, J. Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections / J. Soothill // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2013. – Vol. 11 (9). – P. 909-915.
189. Spellberg, B. The value of single-pathogen antibacterial agents / B. Spellberg, J.H. Rex // *Nature reviews Drug discovery*. – 2013. – Vol. 12. – P. 963.
190. Strateva, T. *Pseudomonas aeruginosa*—a phenomenon of bacterial resistance / T. Strateva, D. Yordanov // *Journal of medical microbiology*. – 2009. – Vol. 58 (9). – P. 1133-1148.
191. Summers, W.C. Felix d’Herelle and the origins of molecular biology / W.C. Summers. – 1999. – 248 p.
192. Tan, T.T. Future” threat of Gram-negative resistance in Singapore / T.T. Tan // *Ann Acad Med Singapore*. – 2008. – Vol. 37 (10). – P. 884-890.
193. Telling, K. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals / K. Telling, M. Laht, A. Brauer, M. Remm, V. Kisand, M. Maimets, T. Tenson, I. Lutsar // *BMC infectious diseases*. – 2018. – Vol. 18 (1). – P. 513.
194. Towner, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy / K.J. Towner // *Journal of Hospital Infection*. – 2009. – Vol. 73 (4). – P. 355-363.
195. Turner, D. Characterisation and genome sequence of the lytic *Acinetobacter baumannii* bacteriophage vB_AbaS_Loki / D. Turner, M.E. Wand, Y. Briers, R. Lavigne, J.M. Sutton, D.M. Reynolds // *PloS one*. – 2017. – Vol. 12 (2). – P. e0172303.
196. Turner, D. Create one new family (*Autographiviridae*) including nine subfamilies and one hundred and thirty-two genera in the order *Caudovirales* [Электронный ресурс] / A.M. Kropinski, P. Alfernas-Zerbini, C. Buttimer, R. Lavigne, J.R. Bister, I. Tolstoy, V.V. Morozova, I.V. Babkin, Y.N. Kozlova, A.Y. Tikunov, N.V. Tikunova, E.M. Adriaenssens // *International Committee on Taxonomy of Viruses (Approved Proposals)*. – 2019. – 10 p.
197. Ulu-Kilic, A. An outbreak of bloodstream infection due to extensively

resistant *Acinetobacter baumannii* among neonates / A. Ulu-Kilic, A. Gundogdu, F. Cevahir, H. Kilic, T. Gunes, E. Alp // American journal of infection control. – 2018. – Vol. 46 (2). – P. 154-158.

198. Vanegas, J.M. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia / J.M. Vanegas, A. V Cienfuegos, A.M. Ocampo, L. López, H. del Corral, G. Roncancio, P. Sierra, L. Echeverri-Toro, S. Ospina, N. Maldonado // Journal of clinical microbiology. – 2014. – Vol. 52 (11). – P. 3978-3986.

199. Vasoo, S. Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician / S. Vasoo, J.N. Barreto, P.K. Tosh // Mayo Clinic Proceedings. Elsevier. – 2015. – Vol. 90. – P. 395-403.

200. Viertel, T.M. Viruses versus bacteria – novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens / T.M. Viertel, K. Ritter, H.-P. Horz // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2014. – Vol. 69 (9). – P. 2326-2336.

201. Vila, J. Therapeutic options for *Acinetobacter baumannii* infections: an update / J. Vila, J. Pachón // Expert opinion on pharmacotherapy. – 2012. – Vol. 13 (16). – P. 2319-2336.

202. Vincent, J.-L. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units / J.-L. Vincent, J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, R. Moreno, J. Lipman, C. Gomersall, Y. Sakr // Jama. – 2009. – Vol. 302 (21). – P. 2323-2329.

203. Vinodkumar, C.S. Bacteriophage therapy: A potential use of phages in medical field / C.S. Vinodkumar, H.K. Makari, H. Srinivasa, K.G. Basavarajappa, S. Kalsurmth // Res. Rev. BioSciences. – 2009. – Vol. 12. – P. 22-28.

204. Wagner, V.E. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and pathogenesis issues / V.E. Wagner, M.J. Filiatrault, K.F. Picardo, B.H. Iglewski // Pseudomonas genomics and molecular biology. – 2008. – P. 129-158.

205. Walker, P.J. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2021). / P.J. Walker, S.G. Siddell, E.J. Lefkowitz, A.R.

Mushegian, E.M. Adriaenssens, P. Alfenas-Zerbini, A.J. Davison, D.M. Dempsey, B.E. Dutilh, M.L. García, B. Harrach, R.L. Harrison, R.C. Hendrickson, S. Junglen, N.J. Knowles, M. Krupovic, J.H. Kuhn, A.J. Lambert, M. Łobocka, M.L. Nibert, H.M. Oksanen, R.J. Orton, D.L. Robertson, L. Rubino, S. Sabanadzovic, P. Simmonds, D.B. Smith, N. Suzuki, K. Van Doerslaer, A.-M. Vandamme, A. Varsani, F.M. Zerbini // *Archives of virology*. – 2021. – Vol. 166 (9). – P. 2633-2648.

206. Wand, M.E. Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance / M.E. Wand, L.J. Bock, L.C. Bonney, J.M. Sutton // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70 (8). – P. 2209-2216.

207. Weinbauer, M.G. Ecology of prokaryotic viruses / M.G. Weinbauer // *FEMS microbiology reviews*. – 2004. – Vol. 28 (2). – P. 127-181.

208. Weinstein, R.A. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli / R.A. Weinstein, R. Gaynes, J.R. Edwards, N.N.I.S. System // *Clinical infectious diseases*. – 2005. – Vol. 4 (6). – P. 848-854.

209. Wen, H. Population dynamics of an *Acinetobacter baumannii* clonal complex during colonization of patients / H. Wen, K. Wang, Y. Liu, M. Tay, F.M. Lauro, H. Huang, H. Wu, H. Liang, Y. Ding, M. Givskov // *Journal of clinical microbiology*. – 2014. – Vol. 52 (9). – P. 3200-3208.

210. Willyard, C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats / C. Willyard // *Nature News*. – 2017. – Vol. 543, № 7643. – P. 15.

211. Wisplinghoff, H. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study / H. Wisplinghoff, T. Bischoff, S.M. Tallent, H. Seifert, R.P. Wenzel, M.B. Edmond // *Clinical infectious diseases*. – 2004. – Vol. 39 (3). – P. 309-317.

212. Wittebole, X. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens / X. Wittebole, S. De Roock, S.M. Opal // *Virulence*. – 2014. – Vol. 5 (1). – P. 226-235.

213. Wong, D. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter infections*: a century of challenges / D. Wong, T.B. Nielsen, R.A. Bonomo, P.

Pantapalangkoor, B. Luna, B. Spellberg // *Clinical microbiology reviews*. – 2017. – Vol. 30 (1). – P. 409-447.

214. Wright, A. Lipopolysaccharide as a bacteriophage receptor / A. Wright, M. McConnell, S. Kanegasaki // *Virus Receptors*. Springer. – 1980. – P. 27-57.

215. Wright, A. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy / A. Wright, C.H. Hawkins, E.E. Änggård, D.R. Harper // *Clinical otolaryngology*. – 2009. – Vol. 34 (4). – P. 349-357.

216. Wright, L.L. Dominance of international “high-risk clones” among metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK / L.L. Wright, J.F. Turton, D.M. Livermore, K.L. Hopkins, N. Woodford // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 70 (1). – P. 103-110.

217. Yan, X. Stratified Wilson and Newcombe Confidence Intervals for Multiple Binomial Proportions / X. Yan, X.G. Su // *Statistics in Biopharmaceutical Research*. – 2010. – Vol. 2 (3). – P. 329-335.

218. Yang, H. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* / H. Yang, L. Liang, S. Lin, S. Jia // *BMC microbiology*. – 2010. – Vol. 10 (1). – P. 131.

219. Yang, Z. Global transcriptomic analysis of the interactions between phage ϕ Abp1 and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* / Z. Yang, S. Yin, G. Li, J. Wang, G. Huang, B. Jiang, B. You, Y. Gong, C. Zhang, X. Luo // *MSystems*. – 2019. – Vol. 4 (2). – P. e00068-19.

220. Zavascki, A.P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy / A.P. Zavascki, C.G. Carvalhaes, R.C. Picao, A.C. Gales // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2010. – Vol. 8 (1). – P. 71-93.

221. Zhou, W. Two new lytic bacteriophages of the *Myoviridae* family against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* / W. Zhou, Y. Feng, Z. Zong // *Frontiers in microbiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 850.

222. Zilberberg, M.D. Multidrug resistance, inappropriate empiric therapy, and

hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis / M.D. Zilberberg, B.H. Nathanson, K. Sulham, W. Fan, A.F. Shorr // *Critical Care*. – 2016. – Vol. 20 (1). – P. 221.

223. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. – World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. – 2012. – 36 p.