

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной
патологии»

Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека

На правах рукописи

Вакарина
Арина Александровна

**ЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИОФАГОВ ОСНОВНЫХ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

1.5.11 – Микробиология
Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научные руководители:
доктор медицинских наук, профессор
Степанова Татьяна Федоровна
кандидат биологических наук
Рубальский Евгений Олегович

Тюмень – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Актуальность темы исследования.....	4
Степень разработанности темы исследования.....	6
Цель исследования.....	7
Задачи исследования.....	8
Научная новизна.....	8
Теоретическая и практическая значимость.....	10
Методология и методы исследования.....	12
Образцы биоматериала и объем исследованных штаммов бактерий.....	12
Бактериофаги.....	14
Антимикробные препараты.....	15
Сыворотки.....	16
Аналитические данные	16
Бактериологические методы исследования.....	16
Серологические методы исследования.....	20
Методы исследования бактериофагов.....	21
Молекулярно-генетические методы исследования.....	23
Статистические методы исследования.....	25
Личное участие автора в получении результатов.....	26
Основные положения диссертации, выносимые на защиту.....	27
Степень достоверности и апробации результатов исследования.....	27
ГЛАВА 1. Обзор литературы	30
1.1. Бактериофаг: строение и свойства.....	30
1.2. Роль бактериофагов в эволюции бактерий.....	33
1.3. Использование бактериофагов в лечебно-профилактической деятельности и в сферах народного хозяйства.....	38
1.4. Литическая активность коммерческих бактериофагов.....	45
1.5. Лабораторная диагностика, определение литической активности и количества бактериофагов.....	46

1.5.1. Определение литической активности бактериофагов	46
1.5.2. Определение концентрации фагов в фаголизате	48
1.5.3. Инновационные методы детекции литической активности бактериофагов.....	50
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	52
ГЛАВА 2. Предвестники активации процесса формирования антибиотикорезистентности штаммов - возбудителей бактериальных инфекций.....	52
ГЛАВА 3. Поиск и исследование штаммов бактериофагов, активных в отношении <i>P. mirabilis</i> , изолированных в акушерском стационаре	65
ГЛАВА 4. Взаимодействие специфических бактериофагов и клинических штаммов бактерий.....	78
4.1. Скрининговое исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам	78
4.2. Влияние вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам	82
4.3. Литическая активность бактериофагов, используемых для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии	90
4.4. Сравнительная характеристика литической активности бактериофагов при исследовании на плотной и в жидкой питательных средах.....	94
ГЛАВА 5. Разработка способа количественной оценки литической активности бактериофагов.....	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	113
ВЫВОДЫ.....	123
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	125
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	129
Приложение 1.....	165

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нарастающие темпы роста резистентности бактерий к антимикробным препаратам открывают большие перспективы для научных разработок фагосодержащих лекарственных препаратов. Использование их в качестве антибактериальной терапии характеризуется, как правило, строго видовым воздействием на бактериальные изоляты, быстрым наступлением клинического эффекта, способностью к самовоспроизводству, отсутствием влияния на нормобиоценоз человека [60]. Известно, что при применении лекарственных препаратов на основе бактериофагов практически не отмечаются побочные действия [1, 61].

Анализ результатов изучения литических свойств бактериофагов как лекарственных средств показал, что от 33 до 74 % клинических изолятов *Staphylococcus aureus* чувствительны к коммерческим бактериофагам [6, 55, 69, 159]. Высокая резистентность к бактериофагам выявлена у непатогенных *Staphylococcus spp.* - около 80 % [6, 159]. Представители рода *Klebsiella* характеризовались чувствительностью штаммов в 28 - 55 % случаев [6, 69, 145], бактерии рода *Proteus* в 37 - 47 % [6, 69]. Литическая активность бактериофагов в отношении изолятов *Escherichia coli* с патогенными свойствами составила от 62 до 87 % [52, 69], для *Pseudomonas aeruginosa* эти значения варьировались в диапазоне от 15,4 до 84 % случаев [6, 24, 144]. Большая часть авторов указывает, что литическая активность моновидовых фагосодержащих лекарственных средств равна или выше поливалентных бактериофагов [69, 86, 217]. Эти данные свидетельствуют о необходимости мониторингирования спектра литической активности коммерческих препаратов бактериофагов в отношении циркулирующих штаммов патогенных и условно-патогенных бактерий, а также регулярного поиска новых штаммов бактериофагов, лизирующих клинически значимые изоляты [42, 145].

Явление лизогенной конверсии обеспечивает эволюционные изменения бактериальных клеток. Фаги принимают участие в модификации не только

морфологических свойств бактерий, но и оказывают влияние на их вирулентные и патогенные характеристики [20, 153]. В различных исследованиях показана способность фагов к горизонтальному переносу генов резистентности к антимикробным препаратам [72, 224], что обеспечивает формирование штаммов - возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. По данным мировых научных исследований они поражают в среднем от 5 до 15 % госпитализированных пациентов, а в отделениях высокого риска - до 40 % [131]. В структуре заболеваемости лидирующие места занимают внутрибольничные пневмонии, послеоперационные инфекции, гнойно-септические болезни новорожденных и родильниц, а также острые кишечные инфекции [54]. Причиной большинства инфекционных заболеваний с тяжелым течением являются ESCAPE – патогены [14, 48]. Инфекционная безопасность лечебно-диагностического процесса опирается на изучение свойств бактерий на клеточном и молекулярном уровне, а также регистрацию накопления патогенного потенциала в процессе пассажа через восприимчивый организм пациента. Описана связь возникновения вспышек инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, с массивной колонизацией кишечника новорожденных возбудителями с множественной лекарственной резистентностью [25]. Благодаря наличию в пищеварительном тракте огромного количества бактерий создаются условия для трансмиссивной передачи плазмид резистентности [64]. Основой борьбы с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи, является переориентировка работы по ликвидации возникших эпидемических очагов на организацию предупреждения их возникновения. Своевременное установление предвестников активизации взаимодействия биоэкологической системы позволит обеспечить эпидемиологическую безопасность пациентов медицинских стационаров [128, 160].

Острые кишечные инфекции, связанные с бактериальными патогенами, остаются актуальными на современном этапе. Продолжается регистрация локальных случаев и очаговых групповых заболеваний населения. Существует необходимость проводить комплексное изучение литической активности

лекарственных бактериофагов в отношении основных этиологических агентов острых кишечных инфекций семейства *Enterobacteriaceae*.

В связи со сложностью разработки и длительностью внедрения в практику новых антимикробных препаратов, а также растущей множественной резистентностью возбудителей бактериальных инфекций становится очевидной актуальность создания и применения комбинированных схем лечения бактериальных инфекций, в том числе с использованием бактериофагов [114]. В настоящее время описаны единичные примеры как синергии при воздействии антибиотиков и бактериофагов на бактерии, так и антагонистического действия [195]. Поэтому для рационального сочетанного использования этих двух антибактериальных средств очень важно изучение влияния значимых литических бактериофагов на чувствительность бактерий к антибиотикам.

Имеющиеся данные о литической активности фагосодержащих препаратов свидетельствуют о регистрации большого разброса показателей чувствительности бактерий. Это указывает на необходимость унификации методов и оптимизации способов изучения фагового потенциала для повышения эффективности лечения и профилактики различных бактериальных инфекций.

Степень разработанности темы исследования

История открытия бактериофагов связана с именем канадского бактериолога Феликса Д'Эрелля. Широкомасштабные исследования бактериофагов в нашей стране стали проводиться с начала прошлого века, отечественные ученые внесли большой вклад в разработку фагосодержащих препаратов и использование их в лечебных целях [2, 3, 11, 12, 22, 26, 33, 44, 47, 52, 60, 61, 79, 94, 100, 124, 126, 162, 174, 183]. Сегодня ведется активный процесс выделения и селекции новых видов бактериофагов [34, 35, 66, 67, 77, 84, 95, 98, 107, 134, 140, 141, 142, 148, 167, 202, 213], в том числе и для создания лекарственных средств. Благодаря молекулярно-генетическим технологиям определены маркеры, обеспечивающие дифференцировку бактериофагов на вирулентные (строго литические) и умеренные [33, 61, 76, 103, 153, 178, 184, 185,

187, 189, 212, 224]. Геном вирулентных фагов не изучен полностью. Не расшифрованные гены, кодирующие различные функции и принимающие участие в выработке вспомогательных белков, могут оказывать воздействие на физиологию бактерий [190]. Анализ современных представлений показал отсутствие научных работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных влиянию литических бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам.

Решение вопроса об использовании фагосодержащего препарата принимается после определения чувствительности бактерий к бактериофагу [33, 42, 69, 144, 145]. Данные о литической активности имеющихся коммерческих средств представлены многими авторами [6, 52, 55, 69, 145, 159, 188], но отсутствует системный анализ чувствительности бактерий к вирионам, в том числе основанный на региональных особенностях. Наиболее распространенным методом определения литических свойств бактериофагов является «spot-test» с использованием плотной питательной среды и оценкой в крестовой системе [6, 33, 106, 153]. В литературе описан метод Фюрта в модификации Фишера. В его основе лежит добавление бактериофага к расплавленному агару, а бактериальная культура наносится на поверхность питательной среды [51]. Известен способ с применением жидкого питательного бульона, степень лизиса бактерий устанавливается по мутности среды [28]. Г. Е. Афиногенов предложил применять монослой культуры клеток эмбриона человека как среду для изучения взаимодействия бактериофага и бактерий [23]. Представленные методы по изучению литических свойств бактериофагов имеют свои недостатки, а результаты изучения чувствительности возбудителей инфекционных болезней показывают широкий диапазон результатов. В связи с этим, существует необходимость усовершенствования методов определения спектра литической активности бактериофагов с представлением оценки в цифровых количествах.

Цель исследования - изучение литических свойств генетически подтвержденных вирулентных бактериофагов и их влияния на антибиотикорезистентность

бактерий - возбудителей инфекционных заболеваний.

Задачи исследования:

1. Определить структуру и локализацию потенциальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обладающих селективными преимуществами выживания в условиях больничной среды акушерских стационаров за счет резистентности к антимикробным препаратам, и выделить штаммы, генетически подтвержденных вирулентных бактериофагов, активных в отношении клинически значимых бактериальных изолятов.
2. Изучить влияние вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам.
3. Проанализировать литическую активность коммерческих бактериофагов, используемых для лечения острых кишечных инфекций, вызванных бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих на территории города Тюмени и юга Тюменской области.
4. Провести сравнительную характеристику методов определения литической активности бактериофагов на плотной и в жидкой питательных средах.
5. Разработать и апробировать способ количественной оценки литической активности бактериофагов.

Научная новизна

Впервые показано становление возбудителей, обладающих селективными преимуществами выживания в окружающей среде акушерского стационара, в период благоприятной эпидемиологической ситуации, характеризующийся низкими показателями инфекционной заболеваемости пациентов и резистентностью штаммов, изолированных из производственной среды. При этом зарегистрирован рост уровня резистентности к антимикробным препаратам микробиоты новорождённых, но не выходящий за расчетные контрольные границы.

Установлено, что формирование бактериальных штаммов, обладающих

потенциалом резистентности, происходило в кишечнике детей и на коже пупочного остатка и обусловлено бактериями семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующими грамотрицательными штаммами.

Выделены вирулентные штаммы протейных бактериофагов, активные в отношении бактериальных культур, изолированных в период, характеризующийся формированием возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в акушерском стационаре. Определена их морфологическая характеристика, таксономическое положение, молекулярно-генетическая структура с подтверждением их вирулентной (строго литической) природы. В соответствии с кладограммой и множественным полногеномным выравниванием установлено, что исследуемые штаммы протейных бактериофагов принадлежали к порядку хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*. На основании базы данных Genbank бактериофаг *Proteus phage* 2207-№35 относился к роду *Gorganvirus*, а бактериофаг *Proteus phage* P16-2532 показал отсутствие принадлежности к какому-либо таксону нижестоящего ранга.

Проведено депонирование аннотированных полногеномных последовательностей выделенных штаммов *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№35 в базе данных NCBI GenBank под номерами MN840486.1 и MN840487.1 соответственно.

Впервые представлена доказательная база отсутствия влияния вирулентных стафилококковых и протейных бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам, подтвержденная статистическим анализом зон подавления роста бактериальных изолятов (интерквартильные интервалы и критерий Вилькоксона).

Расчет отношения шансов литической активности бактериофагов при параллельном (одномоментном) исследовании чувствительности бактерий к бактериофагам показал большее количество устойчивых штаммов бактерий при использовании плотного питательного агара (метод «spot-test», Л. М. Майской), чем при постановке методом с питательным бульоном (метод М. О. Биргера). Данные разночтения результатов выявлены по пвиобактериофагу поливалентному

в отношении штаммов *S. aureus*, а также по изолятам *Klebsiella pneumoniae* при изучении бактериофагов: клебсиелл пневмонии, клебсиелл поливалентного и пиобактериофага поливалентного.

Впервые предложен способ количественной оценки литической активности бактериофагов, основанный на измерении оптической плотности жидкой питательной среды взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг», позволяющий регистрировать результат в числовых значениях. Способ предусматривает соединение суспензии суточной культуры бактерии и специфического бактериофага в мясо-пептонном бульоне, с последующим термостатированием и учетом изменений среды (патент на изобретение РФ № 2587636 от 20.06.2016 г.).

Теоретическая и практическая значимость

Установлены предвестники активации процессов формирования резистентности штаммов, циркулирующих в акушерском стационаре, определяющие предэпидемическую диагностику становления инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, изучена их структура и локализация.

Изучение влияния вирулентных стафилококковых и протейных бактериофагов, охарактеризованных молекулярно-генетическими методами, на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам необходимо в понимании патогенеза развития инфекционного процесса при использовании фагосодержащих препаратов и антибиотиков в схемах лечения. Отсутствие изменений чувствительности бактерий к антимикробным препаратам после сокультивирования с вирионами косвенно подтверждает правильность оценки литической природы фагов (определения генов, кодирующих интегразы).

Микробиологический мониторинг содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка новорожденных позволит выявить маркеры – штаммы, обладающие селективными свойствами выживания в окружающей среде учреждений родовспоможения.

Своевременно полученные данные о структуре и локализации предвестников ухудшения эпидемиологической обстановки дадут возможность оперативно принять корректирующие меры, в том числе с использованием специфичных литических бактериофагов, направленные на источники формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, на раннем этапе. Целевое назначение фагосодержащих лекарственных препаратов в соответствии с видовой характеристикой бактерий позволит избежать вспышек инфекционных заболеваний.

Определена низкая чувствительность штаммов *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Proteus spp.* и *E. coli* серотипа O26 к специфическим коммерческим бактериофагам. Исследование литической активности фагосодержащих лекарственных средств выявило необходимость актуализации спектра маточных бактериофагов и определило важность расширения или изменения их штаммового состава, а также внедрение мониторинга чувствительности бактерий к бактериофагам на различных уровнях (локальный, региональный, национальный). Комплексный подход позволит изучить чувствительность основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к фагосодержащим препаратам.

Применение предложенного способа оценки литической активности бактериофагов с интерпретацией показателей в количественных значениях повысит достоверность результатов исследований, что позволит увеличить клиническую и эпидемиологическую эффективность использования бактериофагов в целях локализации и ликвидации очагов инфекции, а также минимизировать циркуляцию в медицинских организациях фаго - и антибиотикорезистентных бактериальных штаммов.

Разработанный способ количественной оценки литической активности бактериофагов внедрен в работу бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (акт внедрения от 13.01.21 г.), на кафедре микробиологии ГБОУ ВО «Тюменский государственный медицинский

университет» Минздрава России (акт внедрения № 1 от 04.02.2021 г.) и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области» (акт внедрения от 02.02.2021 г.).

Методология и методы исследования

В основу научной работы положен принцип изучения и анализа фактического материала. Для достижения поставленной цели диссертации и решения задач исследования в работе использовали комплекс методов: бактериологический (морфологические, культуральные, микроскопические исследования), серологический (постановка реакций агглютинации с сыворотками и иммуноглобулинами), методы исследования бактериофагов, молекулярно-генетический, биоинформатический, аналитический и статистический (для обработки результатов исследований применялась компьютерная программа SPSS, версия 22.0).

Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (протокол от 21 января 2019 г.).

Образцы биоматериала и объем исследованных штаммов бактерий

В работе использованы штаммы бактерий, изолированные из биоматериала новорожденных, родильниц (6760 штаммов) и с объектов окружающей среды (621 изолят) Государственных бюджетных учреждений здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 2» и «Родильный дом № 3». В исследовании участвовали женщины с физиологической беременностью в сроке более 36 недель, без соматической патологии и новорожденные, среднее время пребывания которых в родильном доме составляло 4 дня. Изучена микробиота слизистой носа, зева, конъюнктивы глаз, кожи пупочного остатка и содержимого толстой кишки детей, молочных желез и рук родильниц. Проанализирован 1861 смыв с объектов окружающей среды акушерских стационаров.

Биоматериал получен при участии сотрудников организаций родовспоможения под руководством М. К. Грибоедовой, главного врача

Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 2» и Е. В. Косоруковой, зам. главного врача по лечебной работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 3».

В исследование включен биоматериал от амбулаторных пациентов с острыми кишечными инфекциями г. Тюмени и Тюменской области, обратившихся за медицинской помощью в клиническое отделение ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (выделено 2268 штаммов).

В ходе работы из почвы и воды водоемов г. Тюмени (75 проб), изолированно два штамма вирулентных бактериофагов, активных в отношении *P. mirabilis*.

Научно-исследовательская работа проводилась: в соответствии с договором на выполнение работ по организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий с Государственным бюджетным учреждением здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 2» (тема НИР «Разработка и внедрение методов бактериологического мониторинга эпидемического процесса внутрибольничных инфекций среди пациентов и персонала акушерского стационара» - № 052, 2006 - 2010 гг., прикладная, рег. № 01200701688); в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия, и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011 - 2015 гг. (тема НИР «Совершенствование эпидемиологического анализа особенностей реализации эпидемического процесса инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи» - № 059, 2013 - 2015 гг., фундаментально-прикладная, рег. № 01201351981; тема НИР «Изучение механизмов формирования патологического процесса при паразитарных микстзаболеваниях: характеристика клинико-патогенетических особенностей, определение направлений оптимальных подходов клинической реабилитации» - № 055, 2011 – 2015 гг., фундаментально-прикладная, рег. № 01201151106).

Проведение микробиологических исследований проводилось с использованием коллекционных штаммов микроорганизмов (Таблица 1).

Таблица 1 – Референсные микроорганизмы, используемые в исследовании

Референс-штамм	Коллекция
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ¹	Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-ОБОЛЕНСК» ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ¹	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ¹	
<i>Escherichia coli</i> K-12 F+Str ^R (KS-507) ²	
Бактериофаг MS2 Ph-104 ²	

Примечание: ¹- штаммы, используемые в контроле качества определения чувствительности бактерий к антибиотикам; ²- контроль качества питательных сред при изучении бактериофагов

Бактериофаги

Штаммы бактериофагов

Изучение влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам было осуществлено с использованием чистых культурально и молекулярно-генетически охарактеризованных штаммов - монолиний, представленных в таблице 2.

Таблица 2 – Штаммы бактериофагов, использованные в работе

Наименование фагов порядка <i>Caudovirales</i>	Коллекция
Фаги <i>P. mirabilis</i> : <i>P16-2532</i> , <i>2207-№ 35</i> (семейство <i>Siphoviridae</i>)	выделенные бактериофаги (accession GenBank MN840486.1, MN840487.1), рабочая коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора и ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора
Фаг <i>P. mirabilis</i> : <i>PRO-1</i> (семейство <i>Siphoviridae</i>)	рабочая коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора
Фаги <i>S. aureus</i> : <i>H125/4037</i> , <i>П15/4037</i> , <i>H159/4040</i> (семейство <i>Herelleviridae</i> , подсемейство <i>Twortvirinae</i> , род <i>Kayvirus</i>)	выделены из коммерческого интести-бактериофага: серия Н-125, выпуск 08.2019; бактериофага стафилококкового: серия П-15, выпуск 05.2019; бактериофага стафилококкового: серия Н-159, выпуск 07.2019
Фаг <i>S. aureus</i> : <i>Sa30</i> (семейство <i>Herelleviridae</i> , подсемейство <i>Twortvirinae</i> , род <i>Kayvirus</i>)	рабочая коллекция ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора

Коммерческие бактериофаги производства АО «НПО «Микроген»

Лечебно-профилактические коктейли представлены дцДНК бактериофагами, которые относятся к вирусам порядка *Caudovirales* и принадлежат к семействам *Podoviridae*, *Myoviridae* и *Siphoviridae*. В ходе метагеномного и полногеномного анализа ДНК библиотек коммерческих фагов, проведенного в рамках научных исследований отечественных и зарубежных ученых, установлена генетическая безопасность лекарственных препаратов (отсутствие известных генов, кодирующих интегразы, связанные с лизогенией, бактериальной вирулентностью или / и токсичными белками) [130, 149, 169, 170, 206, 208].

Изучение чувствительности бактериальных штаммов осуществлялось к коммерческим лекарственным препаратам, представленным в таблице 3.

Таблица 3 - Коммерческие лекарственные препараты, использованные в исследовании

Наименование бактериофагов	Производитель
Бактериофаг стафилококковый	АО «НПО «Микроген» филиалы г. Пермь, г. Уфа, г. Нижний Новгород
Бактериофаг клебсиелл поливалентный	
Бактериофаг клебсиелл пневмонии	
Бактериофаг колипротейный	
Пиобактериофаг поливалентный	
Интести-бактериофаг	
Пиобактериофаг комплексный	
Сальмонеллезный бактериофаг групп А, В, С, D, Е	

Антимикробные препараты

Определение чувствительности бактерий к антимикробным препаратам проводилось с использованием дисков с ампициллином (АМП), амоксициллином с клавулановой кислотой, оксациллином (ОКС), карбенициллином, пенициллином, амикацином, гентамицином (ГЕН), тобрамицином, стрептомицином, ванкомицином, клиндамицином, левомицетином, норфлоксацином, офлоксацином (ОФ), ципрофлоксацином, рифампицином, тетрациклином (ТЕТ), цефалексимом (ЦФЛ), цефтриаксоном, цефтазидимом

(ЦАЗ), цефотаксимом (ЦТК), цефуроксимом (ЦОС), цефепимом, эритромицином (ЭРИ), меропенемом, имипенемом, производителя ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия.

Сыворотки

Для изучения антигенной структуры использовались сыворотки диагностические эшерихиозные ОК поливалентные (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова), иммуноглобулины и сыворотки эшерихиозные О групповые и факторные адсорбированные для реакции агглютинации (ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск), а также сыворотки диагностические сальмонеллезные адсорбированные (ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства).

Аналитические данные

Для изучения качества оказания медицинской помощи и соблюдения регламентов технологии родовспоможения, ориентированной на участие семьи, проанализировано 6463 анкетных данных. Анкеты-опросники собраны в период 2011 - 2013 гг. параллельно с микробиологическим мониторингом пациентов и окружающей среды акушерских стационаров. Анкета разработана при участии д.м.н. А. С. Корначева, главного научного сотрудника Федерального бюджетного учреждения науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (Приложение 1).

Бактериологические методы исследования

Выделение и идентификация микроорганизмов

Для выделения культуры микроорганизмов производился посев биоматериала на дифференциально-диагностические среды в соответствии с регламентирующими нормативно-методическими документами (приказ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов

исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» [122], МУ № 04-723 / 3 «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями» [108] и ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [127]).

Забор материала от пациентов производили стерильными тупферами с транспортной средой (Жеджианг Гонгдонг Медикал Технолоджи Ко. Лтд, Китай), для сбора содержимого толстой кишки использовали стерильные одноразовые контейнеры. Отбор смывов с объектов окружающей среды акушерских стационаров осуществляли тампонами, увлажненными 0,1 % пептонной водой (Medical Wire&Equipment Co, Великобритания).

Обнаружение штаммов бактерий *S. aureus* осуществляли на желточно-солевом агаре по Чистовичу на основе ГМФ-агара (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Выделение микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующих грамотрицательных бактерий проводили на питательной среде Эндо и Левина (ООО НИЦФ, Санкт-Петербург). Для выявления бактерий рода *Salmonella* посев выполняли на магниевую среду (ООО Биотехновации, г. Электрогорск), с последующим высевом на висмут-сульфит агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). *Streptococcus spp.* культивировали на 5 % кровяном агаре (основа ГРМ-агар: ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и шоколадном агаре (основа колумбийский агар: BioMerieux, Франция), штаммы *Enterococcus spp.* на энтерококкагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Посевы термостатировали 24-48 ч при температуре + 37 °С.

Далее проводился отбор типичных колоний с проведением биохимических тестов, в соответствии с приказом № 535 [122] и рекомендациями «Определитель бактерий Берджи» [123]. Морфологические характеристики бактериальных штаммов определяли при окрашивании по Граму (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург). Изучение биохимических свойств бактерий осуществляли с использованием следующих реагентов: глюкоза, маннит, инозит, сахароза, ксилоза, лактоза (НИЦФ, Санкт-Петербург), плазма кроличья (BioMerieux, Франция), применяли наборы Рапид-Энтеро 50 М

(ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург), определение декарбоксилазной активности и постановка реакции Фогес-Проскауэра - микро-АРГИНИН-НИЦФ и микро-ФОГЕС-ПРОСКАУЭРА-НИЦФ (НИЦФ, Санкт-Петербург). Исследовали разложение цитрата Симмонса (Биотехновации, Электрогорск), изучали подвижность бактериальных культур (HiMedia, Индия), каталазную активность штаммов (тест на каталазу «Микро-КАТАЛАЗА-НИЦФ»: НИЦФ, Санкт-Петербург), определяли цитохромоксидазу (Lachema, Чехия). Приготовление питательных сред проводили в соответствии с нормативными документами, а также рекомендациями производителя. Все питательные среды проходили внутренний контроль качества (стерильность, изучение количественных и качественных свойств роста микроорганизмов на среде) с использованием коллекционных штаммов бактерий.

Дифференциация патогенных *E. coli* была построена на основе антигенной структуры этих бактерий (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Красногорск; ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск). При выделении культур *Salmonella spp.*, изучали их антигенную структуру с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными для реакции агглютинации (ФГУП СПбНИИВС ФМБА, Санкт-Петербург).

Кроме классического бактериологического метода, все бактериальные культуры идентифицировали с помощью настольного времяпролетного масс-спектрометра с матричной лазерной десорбцией MALDI-TOF Biotyper MicroFlex (Bruker, Германия) по белковым спектрам, для проведения дальнейших исследований отбирали культуры с высоким показателем достоверности (коэффициент score более 2). Данный прибор зарегистрирован в государственном реестре РФ.

Метод определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Определение и результаты интерпретации чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам осуществляли по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к

антибактериальным препаратам» и рекомендациям Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), версия 10,0 [118, 135]. Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам выполняли диско - диффузионным методом. Для этого использовались диски индикаторные картонные с противомикробными средствами. Контроль качества дисков проверялся коллекционными штаммами *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

С помощью денситометра (DEN-1, Латвия) готовили бактериальную суспензию из суточной культуры бактерий, соответствующую $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (0,5 ЕД McFarland Standart). Стерильным ватным тампоном инокулюм равномерно наносили на поверхность питательной среды Мюллер-Хинтон (Conda «Pronadisa», Испания) для определения антибиотикочувствительности. Затем накладывали не более 6 дисков с антибиотиком на одну чашку и инкубировали при $+ 37^\circ\text{C}$ в течении 24 ч. Учет диаметров зон задержки роста бактерий под действием антимикробного препарата проводили в «отраженном свете» стандартизованными линейками.

Индекс полирезистентности бактерий

Оценка значения резистентности штаммов, циркулирующих в лечебном учреждении, осуществлялась по формуле (А.С. Корначев, 1992 г.) [91]:

$$ИПР = \frac{a_b}{b \times n} \times 100$$

b – количество клинических бактериальных изолятов;
 a_b – количество дисков с антимикробным препаратом, к которым клинические бактериальные изоляты были резистентные или умеренно-резистентные;
 n – количество дисков с антимикробным препаратом, используемых для изучения резистентности

Результаты подсчета индекса полирезистентности (ИПР) измеряли в процентах. Увеличение значения индекса коррелировало с увеличением количества резистентных штаммов к антибиотикам. Предлагаемая формула расчета индекса характеризовала эпидемическую ситуацию, вне зависимости от вида индикаторных антибиотиков. Требованием для применения данной формулы было использование не менее шести антимикробных препаратов для одного вида

бактерий, при этом учитывалась их природная резистентность, которая не должна превышать 10-15 %.

Серологические методы исследования

Дифференцировку *E. coli* с патогенными свойствами проводили по соматическому О-антигену и поверхностному К-антигену. У детей до 2-х лет агглютинировали как лактозонегативные, так и лактозопозитивные колонии *E. coli* с сыворотками диагностическими эшерихиозными ОК поливалентными. У взрослых в реакцию агглютинации отбирали только лактозонегативные колонии.

Постановку реакции агглютинации осуществляли на стекле в соответствии с инструкциями производителя (ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова, Красногорск; производства ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск). Для этого культура накапливали на скошенном питательном агаре (ГМФ-агар: ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Далее с нижней части агара, вблизи конденсата, петлей снимали исследуемый изолят и наносили на предметное стекло рядом с каплей сыворотки и постепенно, начиная с края капли, растирали в ней. При наличии агглютининов к изучаемому штамму в капле сыворотки появлялся хлопьевидный агглютинат. В контрольной капле (взвесь культуры в 0,9 % растворе натрия хлорида) не должно быть агглютинации.

При положительной реакции агглютинации с одной из поливалентных сывороток живую культуру далее проверяли в реакции агглютинации на стекле с иммуноглобулинами ОК групп и подтверждали с соответствующими адсорбированными О групповыми и факторными эшерихиозными сыворотками в реакции агглютинации на стекле с культурой, прогретой при температуре 100°С в течение 30 минут, и отцентрифугированной в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту. Наличие реакции агглютинации с интенсивностью не менее чем на три креста с живой культурой с ОК иммуноглобулином и с адсорбированной сывороткой позволяло сделать заключение о принадлежности выделенной культуры *E. coli* к соответствующей ОК группе.

При выделении культур, имеющих ферментативные свойства, характерные для рода *Salmonella*, изучали их антигенную структуру с сыворотками диагностическими сальмонеллезными адсорбированными в реакции агглютинации. Для этого петлю суточной бактериальной культуры растирали в капле диагностической сыворотки. Для определения О - антигена отбирали культуру с верхней части агара, а для определения Н - антигена с нижней части. Предварительно культуру контролировали на отсутствие спонтанной агглютинации. Учет результатов реакции агглютинации производили в течение 2 - 3 минут, в работу отбирали культуры с интенсивностью агглютинации не менее чем на три креста. Серовары штаммов сальмонелл определяли по схеме Кауфмана-Уайта.

Методы исследования бактериофагов

Титрование бактериофага методом агаровых слоев (метод Грациа) [153]

Для изучения титра бактериофага готовили мягкий 0,7 % агар на основе сердечно-мозгового экстракта (Conda, Испания) разливали в пробирки по 2,5 мл, температура которого составляла + 45 °С. Агар Мюллера-Хинтона (Conda, Испания) наливали в чашки Петри так, чтобы высота слоя составляла 4 мм, чашки подсушивали. Далее проводили титрование изучаемого бактериофага с использованием физиологического раствора. Перемешивали 0,7 % мягкий агар, 1 мл лизата исследуемого фага и 0,2 мл суточной бактериальной культуры, выращенной на бульоне. Полученную смесь выливали вторым слоем на подготовленную ранее чашку Петри с агаром, сутки инкубировали при + 37 °С. Подсчет титра фага осуществляли по наибольшему разведению.

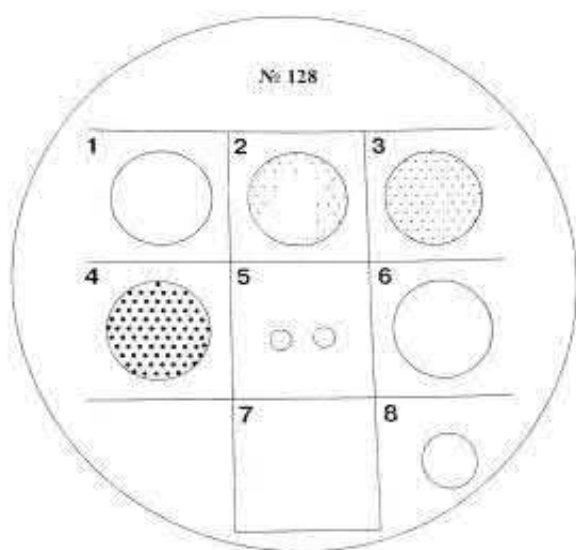
Изучение литической активности фагов в жидкой питательной среде

Метод изучения литической активности фагов в жидкой питательной среде описан М. О. Биргером [28]. В мясо-пептонном бульоне (Оболенск, Россия) проводили совместное инкубирование суточной бактериальной культуры, вносимой петлей (диаметр - 2 мм) и 5 капель бактериофага, дозированного пипеткой (объем - 5 мл). Процесс взаимодействия бактерий и вириона

осуществляли при температуре + 37 °С в течение 24 ч. Литическую способность фага оценивали по мутности питательной среды. Мутный бульон свидетельствовал о размножении бактерий и низкой активности фага, опалесцирующий – о средней активности, а прозрачная среда - о высокой литической способности бактериофага.

Изучение литической активности фагов на плотной питательной среде

Данный метод оценки активности бактериофагов предложен Л. М. Майской [106]. На поверхность плотного питательного агара (Оболенск, Россия) наносилась суспензия суточной культуры клинического изолята, плотность которой составляла 5 ЕД по ОСО 42-28-86 (стандартный образец мутности бактериальных взвесей ФСО 3.1.00086: ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва); распределялась шпателем, лишняя жидкость удалялась пипеткой или дозатором. Чашка Петри подсушивалась и на впитавшуюся поверхность наносилась одна капля бактериофага (0,03 мл). После подсыхания капли фага, чашки инкубировали в термостате при + 37 °С в течение 18 - 20 ч. Реакция лизиса бактерий четыре креста («++++») и три креста («+++») свидетельствовала о высокой литической способности бактериофага, два креста («++») - умеренной, один («+») - слабой активности. Оценка результата осуществлялась по следующей схеме (Рисунок 1):



1. «++++» - полный лизис;
2. «+++» - незначительный вторичный рост;
3. «+++» - полусливной лизис («губка»);
4. «++» - свыше 50 колоний фага;
5. «++» - наличие отдельных крупных колоний;
6. «+» - свыше 10 колоний фага;
7. «±» - до 10 колоний фага;
8. контроль

Рисунок 1 - Оценка литической активности бактериофага

Выделение бактериофагов методом обогащения «с подсевом» [33]

В питательном бульоне (ГРМ-бульон, Оболенск, Россия) соединяли пробу из окружающей среды (15 мл речной воды или 10 г почвы) и суточную бульонную бактериальную культуру (0,3 мл). Посевы инкубировали в течение суток при температуре + 37°C, центрифугировали при 3000 об/мин, надосадочную жидкость фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Merck, Германия). Инокулят изучали на наличие бактериофагов методом Грация.

Метод индукции профага митомицином С [33]

Определение лизогенности культуры проверяли путем соединения в питательном бульоне (Оболенск, Россия) исследуемой суточной бактериальной культуры и митомицина С (0,5 мкг/мл), провоцирующего продуктивную фаговую инфекцию у лизогенных бактериальных клеток. Пробу инкубировали в течение 6 ч при + 28°C и профильтровывали через стерильный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Merck, Германия). Наличие профага оценивали по выявлению зон лизиса на месте нанесения полученного фильтрата на засеянный бактериальный газон и соответствия отрицательных, положительных контролей.

Метод индукции профага ультрафиолетовым излучением [33]

Проводили последовательное, трехкратное облучение бактериальной культуры УФ лучами с длиной волны 250 нм на расстоянии 1 метра лампой мощностью 30 Ватт с увеличением времени воздействия (5, 10, 15 мин). Для этого изолят равномерно наносили на поверхность питательного агара, облучали, инкубировали 24 ч при + 37°C, через сутки выросшие колонии растирали шпателем, термостатировали и еще раз повторяли процедуру. Бактериальную массу смывали, фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Merck, Германия) и изучали по методу Грация присутствие профага в бактериальной клетке.

Молекулярно-генетические методы исследования

ПЦР – исследования бактериофагов

Бактериофаги были протестированы на предмет отсутствия умеренных фагов, несущих известные гены интеграз стафилококковых умеренных фагов

Sa1int – Sa7int, а также умеренных фагов PsP3, P2, Kp6, P21, Lambda при помощи специфической ПЦР. Перед выделением ДНК фаголизат фильтровали через фильтр, размер пор которого составляет 0,22 мкм, затем обрабатывали ДНКазой I. Выделение ДНК проводили при помощи набора К-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия), с последующей детекцией специфического продукта методом горизонтального геле-электрофореза. Кроме того, посредством родоспецифической ПЦР подтверждена таксономическая принадлежность выделенных штаммов фагов *S. aureus* к порядку *Caudovirales*, семейству *Herelleviridae*, подсемейству *Twortvirinae*, роду *Kayvirus*, фагов *P. mirabilis* – к порядку *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae* как к наиболее распространенному таксону вирулентных фагов, используемых в клинических целях [166, 194, 219].

Полногеномное секвенирование выделенных протейных бактериофагов

Секвенирование осуществляли с использованием наборов реагентов Rapid Sequencing Kit и Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore, Великобритания) согласно протоколу производителя. Биоинформатический анализ результатов нанопорового секвенирования проводили при помощи следующего программного обеспечения. Распознавание оснований реализовывали с применением программного обеспечения Guppy и последующим удалением адаптерных последовательностей из полученных прочтений при помощи программного обеспечения Porechop [226]. Далее выполняли фильтрацию качества прочтений программным обеспечением NanoFilt [182], сборку геномов de-novo программным обеспечением Canu v.1.9 [204, 205] и выравнивание отфильтрованных прочтений на собранную de-novo последовательность в программном обеспечении UGENE v33 (Unipro, Россия) по алгоритму BWA-MEM. Аннотирование геномов осуществляли при помощи программного средства Prokka [221]. В качестве порогового значения при аннотировании использовали значение e-value равное 10^{-6} . Аннотированные полногеномные последовательности были депонированы в базе данных Genbank (NCBI, США). Для проведения множественного

полногеномного выравнивания и построения филогенетических деревьев проводили поиск депонированных в базе данных Genbank геномов известных бактериофагов, имеющих не менее 80 % идентичности с геномами отсекуемых нами бактериофагов, при помощи алгоритма blastn (NCBI, США). Множественное глобальное выравнивание геномов бактериофагов-гомологов для построения филогенетических деревьев осуществляли алгоритмом MAFFT в программном обеспечении UGENE v33 (Unipro, Россия). Построение филогенетических деревьев - с использованием модели Tamura-Nei и метода присоединения соседей в программном обеспечении Geneious Prime (Biomatters Ltd., Новая Зеландия). Множественное полногеномное выравнивание с указанием локальных гомологичных участков геномов выполняли с использованием алгоритма progressiveMauve [181]. Визуализацию аннотированных полногеномных последовательностей осуществляли в программном обеспечении SnapGene Viewer v.6.0 (GSL Biotech, США).

Статистические методы исследования

Оценка результатов проведена аналитической программой SPSS (версия 22.0), созданной для статистической обработки данных.

Количественные данные оценивались на предмет соответствия нормальному распределению, для этого использовались критерии Шапиро-Уилка (при числе исследуемых показателей менее 50) и Колмогорова-Смирнова (при числе исследуемых более 50).

Для количественных показателей, имеющих нормальное распределение, проводились расчеты средних арифметических величин (M), стандартных отклонений (SD) и границ 95 % доверительного интервала (95 % ДИ).

Количественные показатели, распределение которых отличалось от нормального, оценивались при помощи значений медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1-Q3).

Номинативные данные анализировались таблицами сопряженности с расчетами отношения шансов.

При сравнении средних величин в нормально распределенных совокупностях количественных данных использовался t-критерий Стьюдента. Различия показателей считались статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для проверки различий между двумя парными выборками применялся критерий Вилкоксона при данных отличных от нормального распределения. Для сравнения относительных показателей, характеризующих связанные совокупности, использовался тест МакНемара (McNemar test). Значения критерия Вилкоксона и критерия МакНемара (Q) интерпретировались путем сравнения с критическими величинами.

Благодаря компьютерной обработке данные результатов исследуемых выборок визуализировались диаграммами рассеивания и с помощью карт Шухарта.

Личное участие автора в получении результатов

Диссертант разработала дизайн научного исследования, подготовила обзор литературы, провела систематизацию и создание электронных баз полученных данных, осуществила обобщение и анализ результатов исследования. Сформулировала выводы, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы. Автор лично при участии сотрудников ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора: подготовила анкеты-опросники родильниц акушерских стационаров (совместно с г.н.с. отдела эпидемиологического анализа и моделирования, д.м.н. А. С. Корначевым); выделила и идентифицировала бактериальные штаммы, участвовала в постановке реакций агглютинации, определяла чувствительность бактерий к антимикробным препаратам (совместно с м.н.с. лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической лаборатории) О. В. Посоюзных и О. Н. Колотовой); разработала способ количественной оценки литической активности бактериофагов (совместно с в.н.с. лаборатории клиники и иммунологии биогельминтозов (группы клинической лаборатории), д.м.н. Л. В. Катаевой). Совместно со старшими

научными сотрудниками лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора: к.б.н. Е. Р. Зулькарнеевым и к.б.н. И. А. Киселевой осуществляла исследования литических свойств бактериофагов *P. mirabilis* и *S. aureus*, и определяла их титры. Биоматериал от пациентов получен при участии сотрудников организаций родовспоможения под руководством М. К. Грибоедовой, главного врача Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 2» и Е. В. Косоруковой заместителя главного врача по лечебной работе Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Тюменской области «Родильный дом № 3».

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Определена структура и локализация предвестников активации процесса формирования резистентности штаммов, обладающих селективными преимуществами выживания в условиях акушерского стационара. Выделены и изучены методами молекулярной генетики два вирулентных протейных бактериофага, активных в отношении штаммов *P. mirabilis*.

2. Охарактеризованы особенности литической активности бактериофагов, используемых для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии, вызванных штаммами семейства *Enterobacteriaceae*; вирулентные бактериофаги не оказывают влияния на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам.

3. Выявлено расхождение результатов литической активности бактериофагов при использовании методов на плотной и в жидкой питательных средах. Разработан способ количественной оценки литической активности бактериофагов, позволяющий повысить качество диагностических исследований.

Степень достоверности и апробации результатов исследования

Достоверность результатов диссертации основана на достаточном объеме

выборки изученных материалов, использовании в работе современных методов исследования (масс-спектрометрия, ПЦР-диагностика, секвенирование) и программного обеспечения для статистической обработки данных (программа SPSS). В ходе микробиологического мониторинга двух родильных домов проанализировано 6760 клинических бактериальных изолятов, выделенных из различных локусов пациентов, исследован 1821 смыв с поверхностей в лечебных учреждениях. Проведено предварительное (скрининговое) изучение влияния бактериофагов на чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам (97 изолятов бактерий рода *Klebsiella* и 108 культур *S. aureus*), подтверждение рабочей гипотезы осуществлялось с использованием 4 вирулентных стафилококковых и 3 протейных бактериофагов. Определен спектр литической активности коммерческих фагосодержащих препаратов, применяемых для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии, в отношении 2268 видов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Сравнение литических свойств бактериофагов на плотной и в жидкой питательных средах осуществлено с использованием 165 культур *S. aureus* и 62 штаммов бактерий *K. pneumoniae*. Способ количественной оценки литической активности бактериофагов отработан на 36 штаммах *S. aureus* и *E. coli*.

Диссертация выполнена в соответствии с отраслевой программой Роспотребнадзора на 2016 - 2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» и планом научных работ ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора: тема № 063 «Исследования микробиома человека при паразитарных и инфекционных заболеваниях» (рег. №АААА-А-16-116022610094-2).

Диссертация апробирована на заседании Ученого совета ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (протокол № 6 от 06.09.2021 г.).

Основные положения диссертационной работы доложены на: международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», г. Ульяновск (апрель, 2013 г.); второй научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», г. Санкт-Петербург (сентябрь, 2014 г.); Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями», г. Нижний Новгород (май, 2016 г.); четвертой научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», г. Нижний Новгород (сентябрь, 2018 г.).

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1. Бактериофаг: строение и свойства

Первые сообщения о литическом действии бактериофагов стали появляться с 1896 г. Но только в 1917 году канадский бактериолог Феликс Д'Эрелль сообщил в печати об открытии «бактериофага» и выдвинул идею использования бактериофагов для лечения болезней [162]. Широкомасштабные испытания, связанные с фаговой терапией в нашей стране, были начаты в 1930-1940-ые годы: в области дерматологии (М.А. Беридзе), офтальмологии (А.М. Родигина), урологии (А.П. Цулукидзе), стоматологии (И.Е. Ручко и К.В. Третьяк), педиатрии (Р.В. Лурье), отоларингологии (З.В. Ермолиева) и хирургии (А.П. Цулукидзе). В связи с открытием антибиотиков значение бактериофагов в лечебной практике резко снизилось, хотя с профилактической целью использование бактериофагов продолжалось [61]. Всемирная угроза распространения антибиотикорезистентных бактериальных штаммов и срочная потребность решения проблемы возродила интерес к бактериофагам [17].

Бактериофаги – вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки и клетки архей. Для фаговой терапии в основном используют только «хвостатые» фаги порядка *Caudovirales* [41]. По типу нуклеиновой кислоты и морфологии Международным комитетом по таксономии вирусов (ICTV) проведена классификация данного порядка на семейства (Таблица 4).

Таблица 4 - Классификация вирусов порядка *Caudovirales* (Международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) – 2021 г.) [200]

- Order: <i>Caudovirales</i>	Class: <i>Caudoviricetes</i>	9 families, 1 genus
	+Family: <i>Ackermannviridae</i>	2 subfamilies, 1 genus, 2 species
	+Family: <i>Autographiviridae</i>	9 subfamilies, 69 genera
	+Family: <i>Chaseviridae</i>	6 genera
	+Family: <i>Demereciviridae</i>	3 subfamilies, 4 genera
	+Family: <i>Drexelvriidae</i>	4 subfamilies, 6 genera
	+Family: <i>Herelleviridae</i>	5 subfamilies, 3 species
	+Family: <i>Myoviridae</i>	5 subfamilies, 121 genera, 3 species
	+Family: <i>Podoviridae</i>	3 subfamilies, 37 genera, 7 species
	+Family: <i>Siphoviridae</i>	13 subfamilies, 228 genera, 1 species
	+Genus: <i>Lilyvirus</i>	1 species

Бактериофаги обычно состоят из головки (нуклеокапсид), в которой находится генетический материал, и хвоста белковой трубки, которая служит для прикрепления вируса к поверхности микроорганизма и впрыскивания в бактериальную клетку ДНК или РНК (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Строение фаговой частицы (на примере Т-четного бактериофага) [80]

Бактериофаги, по сравнению с бактериальными клетками, отличаются большей устойчивостью к действию химических и физических факторов [80], в том числе к дезинфектантам [61]. По данным литературы [73], различным бактериофагам присуща разная степень термоустойчивости. Известно, что температурный режим важен для процесса необратимой адсорбции гомологичных бактериофагов на клеточной стенке бактерий, это показано в опытах Гэрена и Пака.

Наибольшим спектром противофагового действия обладают некоторые производные акридина и алкилирующие азотистые аналоги иприта. Известно, что фагостатической активностью обладают антиметаболиты, ингибиторы ферментов, а также вещества, характеризующиеся тропизмом к ДНК. Все они препятствуют формированию зрелой частицы фага или ее предшественников [51].

Установлено, что ряд аминокислот стимулирует размножение фага (Т-группы). Последние исследования показывают, что при отсутствии питательных

веществ у бактериофагов приостанавливается часть цикла развития, при этом образование новых фагов прекращается [168, 207]. Фаг чувствителен к pH среды, оптимум которой лежит в пределах 5-8 [133].

Активное взаимодействие фага с бактерией до ее разрушения называется латентным периодом. Его длительность зависит от типа фага и составляет от 15 минут до 5 ч и более. Наибольший временной промежуток необходим для бактериофагов актиномицетов [80].

Согласно современным исследованиям одним из механизмов выживания бактерий в окружающей среде является формирование структурированных сообществ – биопленок. Известно, что они состоят из клеток в различных фазах жизнедеятельности: активных, покоящихся и некультивированных, объединённых полимерным матриксом. Одним из важных свойств биопленок является ее устойчивость к ряду дезинфицирующих средств и антибактериальных препаратов. В случае восприимчивости бактерий к бактериофагу, вирион может разрушать биопленки за счет различных ферментов. Это ферменты, воздействующие на элементы матрикса, в том числе и ДНК-азу, обеспечивающие скорость и движение бактериофагов к бактериям, в соответствии с потоками биопленки. Другие ферменты фагов лизируют штаммы микроорганизмов за счет способности разрушать капсулу и клеточную стенку бактерий [62, 146]. В случае лизиса бактерий, бактериофаг называют вирулентным (или строго литическим). Возможен и другой вариант взаимодействия вируса и бактерии, когда бактериофаг встраивается в генетический аппарат клетки и реплицируется вместе с ней, при этом разрушения бактерии не происходит. Это - умеренные бактериофаги [39, 40, 153].

Бактериофаги имеют несколько типов жизненных циклов: литический, лизогенный, псевдолизогенный и хронический. При литическом цикле метаболизм вируса направлен на производство новых фагов, которые высвобождаются во время лизиса клетки. Данный тип взаимодействия фага и хозяина характерен для вирулентных фагов. При лизогенном цикле, фаг интегрируется в геном клетки хозяина и реплицируется вместе с ним, пока не

будет индуцирован литический цикл (умеренные фаги). Псевдолизогения может наблюдаться у некоторых вирулентных бактериофагов. Вирусы сосуществуют с генетически чувствительными бактериями, которые проявляют фенотипическую устойчивость к этому фагу. Таким образом, наблюдается высокая численность фага и экспоненциальный рост бактериальных клеток. Если потомство фага высвобождается из клетки-хозяина почкованием или экструзией, без лизиса последней, то речь идет о хронической инфекции. Например, встречается у одноцепочечных ДНК (оцДНК) нитчатых бактериофагов [225].

Большая часть бактериофагов, выделяемых от здоровых людей, принадлежит к разным группам умеренных фагов. Их высокое содержание - 10^{15} - это в десять раз больше, чем бактерий [146], по-видимому, способствует функционированию фагового сообщества кишечника человека в качестве резервуара бактериальных адаптационных генов. Доказано, что у пациентов с различными заболеваниями, содержание вирулентных колифагов резко увеличивается. Поэтому, бактериофаги можно рассматривать как часть микробиоты человека [103].

Важно отметить, что из объектов окружающей среды вирулентные фаги выделяются чаще, чем от человека. В связи с этим вода поверхностных водоемов, сточные воды, почва используются в качестве источников изоляции вирионов для производства профилактических фагосодержащих препаратов [61].

1.2. Роль бактериофагов в эволюции бактерий

В литературе описаны изменения морфологических характеристик бактерий за счет обмена генетическим материалом посредством фагов [153, 184]. Многие профаги или фаговые частицы, интегрированные в бактериальную ДНК, кодируют гены патогенности. Данное явление наблюдалось у ряда бактериальных культур: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* и *mirabilis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*. Установлена решающая роль вирионов в формировании токсигенности у изолятов *Clostridium botulinum*, *Corynebacterium diphtheriae* и *Vibrio cholera*. Воздействие профагов способствует адаптации

микроорганизмов в объектах окружающей среды и формированию резидентной микрофлоры.

Благодаря полногеномному секвенированию различных патогенов возможно провести фундаментальные исследования структуры и свойств профагов, в том числе у бактерий возбудителей ИСМП (инфекций, связанные с оказанием медицинской помощи). К этим инфекциям относится любое клинически выраженное инфекционное (паразитарное) заболевание, возникающее у пациента в результате оказания медицинской помощи в стационаре, амбулаторно - поликлинических условиях или на дому, а также у персонала лечебных организаций в силу осуществления профессиональной деятельности [121]. Доказано, что в становлении вирулентных свойств возбудителей ИСМП принимают участие умеренные бактериофаги, активно циркулирующие в лечебных стационарах. Интенсификация процесса может обеспечить формирование высоковирулентных клональных линий бактерий.

Бактериофаги способствуют спонтанным и точечным мутациям в бактериальных клетках за счет изменения структуры поверхностных компонентов (к ним относятся липополисахариды, белки наружных мембран, тейхоевые кислоты клеточной стенки, капсулы и другие) [153, 190, 214].

Особую настороженность вызывает возможность вирионов участвовать в формировании резистентности бактерий к антибактериальным средствам у человека и животных [178, 185, 187, 212, 224].

По данным мировых научных исследований [120, 131], ИСМП поражают в среднем от 5 до 15 % госпитализированных пациентов, а в отделениях высокого риска - до 40 %. По результатам исследований, представленных А. Ю. Поповой и рядом других авторов в РФ эта цифра составляет около 10 % пациентов (2,5 - 3 млн случаев в год). Медицинские организации родовспоможения и хирургические стационары вносят большой вклад в распространение ИСМП уже на протяжении последних десяти лет. Структура заболеваемости ИСМП в Российской Федерации представлена в таблице 5 [54].

Таблица 5 - Структура заболеваемости ИСМП в Российской Федерации за 2012-2018 гг.

Наименование заболевания	Доля инфекционного заболевания в структуре ИСМП, %
Внутрибольничные пневмонии	31,1
Послеоперационные инфекции	22,0
Гнойно-септические инфекции новорожденных	10,7
Гнойно-септические инфекции родильниц	8,7
Инфекции мочевыводящих путей	8,1
Другие инфекционные заболевания	7,6
Постинъекционные инфекции	7,1
Острые кишечные инфекции	6,9

Наиболее часто среди возбудителей ИСМП обнаруживаются бактерии, способные формировать резистентность к основным классам антибактериальных лекарственных средств. Такую группу бактерий, приводящую к высокой частоте неблагоприятных исходов, Американское общество по инфекционным болезням (Infectious Diseases Society of America, IDSA) обозначило как ESCAPE-патогены (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* и *Enterobacter spp.*). Анализ лабораторных исследований НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения РФ показал, что источниками ИСМП в отделениях реанимации и интенсивной терапии в РФ являются преимущественно грамотрицательные патогены: *P. aeruginosa* (35 %), *A. baumannii* (15 %) и представители семейства *Enterobacteriaceae* (45 %), в том числе *K. pneumoniae* (14 %), *E. coli* (13 %) [14]. По рекомендациям ВОЗ, разработан список микроорганизмов (27 февраля 2017 г. Женева), призванный стать ориентиром и стимулом для научных исследований и разработок в области создания новых лекарственных средств (критически высокий уровень

приоритетности: *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, семейства *Enterobacteriaceae*, высокий уровень приоритетности: *E. faecium*, *S. aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*) [48].

Профилактика распространения ИСМП основана на разработке своевременных и эффективных противоэпидемических мероприятиях, основанных на знаниях биологических особенностей возбудителей инфекционных заболеваний [27]. Для этого необходимо понимать принципы становления ИСМП. В.И. Покровским разработана социально-экологическая концепция формирования инфекционного процесса [129]:

1. Молекулярный уровень - высокая резистентность к действию противомикробных средств, связана с наличием у них R-плазмид. Плазмиды являются экстрахромосомными носителями наследственности бактериальной клетки, которые реплицируются независимо от функций клеток - хозяина и обладают способностью распространяться из клетки в клетку. Плазмида, контролирующая передачу резистентности к лекарственным препаратам, получила название R – фактор.

2. Клеточный уровень. Формирующаяся на молекулярном уровне резистентность к лекарственным препаратам сказывается на клеточном уровне в виде изменения ряда биологических свойств микробов. Антибиотикорезистентные штаммы могут характеризоваться пониженной вирулентностью, отсутствием чувствительности к типовым фагам, способностью длительно сохраняться в окружающей среде, что обеспечивается изменениями ряда ферментативных свойств.

3. Тканево-органный уровень. Заболевания, вызванные полирезистентными штаммами, отличаются более длительным инкубационным периодом и большей продолжительностью выделения возбудителя.

4. Организменный уровень – увеличивается тяжесть инфекционного процесса.

Следовательно, для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в лечебных организациях необходим постоянный контроль за

циркулирующими штаммами бактерий. Представления о фоновом режиме микробиологического пейзажа даст возможность установить активацию дополнительных противоэпидемических процессов не в случае регистрации заболевания, а значительно раньше. Клинически выраженное заболевание представляет собой лишь видимое проявление взаимодействия биоэкологической и социальной подсистем эпидемического процесса, которому могут предшествовать скрытое распространение и накопление возбудителя на объектах окружающей среды или в популяции населения. Поэтому для правильной оценки интенсивности эпидемического процесса, кроме показателей заболеваемости, необходимо принимать во внимание показатели, свидетельствующие о начинающихся неблагоприятных сдвигах. Коррекция санитарно-эпидемиологического режима должна базироваться на сведениях о предвестниках (явлениях, ведущих к активации механизмов передачи) и предпосылках (признаков перестройки и активации участников эпидемического процесса). Борьбу с ИСМП следует направлять не на лечение последствий, а на профилактику распространения возбудителей инфекционного процесса [128, 160].

Аналитические данные о фазовых изменениях в популяции бактериальной культуры, способны заблаговременно предсказать вспышку инфекционного заболевания. Изучение внутренних процессов активации паразитарных систем обеспечит своевременное проведение противоэпидемических мероприятий (Таблица 6).

По данным бактериологического исследования патолого-анатомического материала и микробиологического мониторинга микрофлоры детей акушерских стационаров г. Москвы, представленных в диссертационной работе Белокрысенко С.С., установлена связь возникновения внутрибольничных вспышек с массивной колонизацией кишечника новорожденных грамотрицательными штаммами – возбудителями, обладающими множественной лекарственной резистентностью [25]. Благодаря наличию в пищеварительном тракте огромного количества бактерий создаются условия для трансмиссивной передачи плазмид резистентности [64].

Таблица 6 - Характеристика фазовых изменений популяций паразита (на примере эпидемического процесса) [27]

Фаза	Среда обитания	Степень гетерогенности	Характер гетерогенности по признаку вирулентности	Численность популяции	Проявление эпидемического процесса
Резервации	Иммунные организмы хозяина и (или) среда	Относительная гомогенность	Мало (не) вирулентный вариант	Низкая, стабильная	Конец эпидемического спада заболеваемости и основная часть межсезонного периода
Эпидемического преобразования	Начинается пассаж через восприимчивые организмы	Генерация гетерогенности	Маловирулентный и вирулентный вариант	Увеличивающаяся - дифференциальное выживание	Предэпидемический период
Эпидемического распространения	Восприимчивые организмы	Относительная гомогенность	Высоковирулентный вариант	Высокая, увеличивающаяся	Эпидемический подъем заболеваемости
Резервационного преобразования	Начинается пассаж через иммунные особи	Генерация гетерогенности	Вирулентный и маловирулентный вариант	Достижение вершины, уменьшающаяся дифференциальная гибель	Вершина эпидемического подъема и период спада заболеваемости

Основная задача предотвращения эпидемического процесса заключается не в регистрации инфекционного заболевания, а в определении предвестников и предпосылок ухудшения ситуации в лечебной организации задолго до развития манифестации процесса.

1.3. Использование бактериофагов в лечебно-профилактической деятельности и в сферах народного хозяйства

Основные свойства бактериофагов при использовании в лечебно-профилактических целях:

- бактериофаги высокоспецифичны [153];

- не уступают по эффективности антибактериальным препаратам и могут лизировать антибиотикорезистентные патогенные микроорганизмы [77, 210, 227];

- не оказывают неблагоприятного действия на нормофлору человека, доказано стимулирующее действие стафилококкового бактериофага на бактерии рода *Bifidobacterium*, которые являются важными составляющими в микробном сообществе кишечника [151];

- не обладают токсическим, аллергическим действием;

- не имеют противопоказаний к применению [95];

- вызывают быстрый литический эффект в отношении видоспецифичных бактерий в организме человека. Так, после однократного перорального приема 30 мл пиобактериофага частицы фага обнаруживают в бронхолегочном отделяемом, влагалище, моче и ране в течение 1 - 1,5 ч. Максимальное количество бактериофагов достигается к 6 - 8 ч наблюдения. Длительность циркуляции фага обеспечена его морфофункциональными особенностями и условиями для размножения, при этом нет большой зависимости от численности поступившего вируса. В среднем бактериофаги в биоматериале обнаруживаются в течение 6 - 7 суток. При отсутствии гомологичного возбудителя в крови частицы ДНК фага определяются на протяжении суток, полная элиминация бактериофага из организма происходит через 48 ч [26, 31, 100];

- бактериофаги возможно использовать как монопрепараты, а также совместно с АМП (антимикробными препаратами), иммуномодуляторами и пробиотиками [2, 4, 20, 75, 96, 156, 177, 209, 222, 228]. Анализ современных представлений о комбинированном применении фагосодержащих препаратов с различными вариантами АМП указывает на хорошие результаты терапии [104, 114, 175, 223]. Но при изучении механизмов литического действия бактериофагов приходится говорить о том, что использование антибиотиков мешает репликации вирионов в бактериальной клетке [124]. Следовательно, вопрос целесообразности назначения данного сочетания препаратов на сегодняшний день остается открытым;

- фагосодержащие препараты назначают внутрь, а также местно для орошения ран, для введения в дренированные полости и в виде аэрозолей [9, 95];
- бактериофаги оказывают влияние на иммунную систему человека, способствуют стимуляции продукции цитокинов, пролиферации Т-клеток, синтезу антител и фагоцитоз. Активация гуморального и клеточного звена способствует лечению хронических воспалительных заболеваний при иммунодепрессивных состояниях [8, 93, 95, 151, 180];
- не демонстрируют отрицательного действия на эукариотические клетки [77];
- сохраняют свои свойства достаточно длительное время [153].

В лабораторных условиях под селективным давлением бактериофагов описано формирование линии «бактерий - мутантов», устойчивых к фагу, при этом штаммы бактерий изменяли свои свойства. Доказано, «мутанты» *Salmonella enterica serovar paratyphi B* полностью потеряли вирулентность и имели более короткую продолжительность жизни. При исследовании штаммов *A. baumannii* наблюдали потерю бактериальной капсулы, у штаммов *S. aureus* снижалась скорость роста и нарушалась продукция капсульного полисахарида [171, 172, 199, 220].

Показана высокая результативность использования бактериофагов для лечения урологических инфекций и инфекций половых путей [26, 60, 94, 124, 126]. При применении бактериофагов у онкологических больных после оперативного вмешательства наблюдался положительный результат в 81,5 % случаев. Фаготерапия зарекомендовала себя при борьбе с инфекциями легких и ЛОР-заболеваниями [44, 100, 183], в купировании гнойно-септических состояний у ожоговых больных [100], при лечении послеоперационных инфекционных осложнений в клинике травматологии и ортопедии [109]. Проведены исследования, показывающие эффективность применения фагов для терапии осложнений, вызванных пленкообразующими штаммами [22, 47, 79, 174]. Бактериофаги зарекомендовали себя как хорошие антибактериальные средства для ликвидации очагов инфекционного процесса в условиях стационара [21, 96,

153], в том числе и при нозокомиальном сальмонеллезе [3]. Результативность бактериофагов доказана при использовании в хирургических, травматологических, акушерских, терапевтических стационарах, ОРИТ (отделениях реанимации и интенсивной терапии), в условиях чрезвычайных ситуаций при массовых травмах [61]. Кроме того, разработаны фагосодержащие препараты для профилактики пищевых инфекций [2, 11, 12].

Анализ современных представлений о бактериофагах, в качестве лекарственных средств, свидетельствует о необходимости их применения в лечении и профилактике бактериальных инфекций [13, 59, 191].

В настоящее время в мире выпуск фагосодержащих препаратов осуществляют около 10 производственных компаний [8]. Изготавливаются лекарственные средства к конкретным возбудителям инфекционного процесса, а также комбинированные варианты, эффективные против различных видов бактерий, их перечень представлен в таблице 7 [95, 105, 153].

Разработаны различные варианты форм для выпуска бактериофагов. Капсулирование способствует сохранению фармакологической активности фага после воздействия желудочного сока, четкой локализации действия и пролонгации эффекта. Кроме того, исследована результативность инновационной кишечнорастворимой лекарственной формы – микрокапсулы, которая может применяться в качестве самостоятельной антибактериальной единицы или для получения комплексных препаратов в виде медул и таблеток [87, 88]. Изготавливаются мази и кремы на основе бактериофагов для стоматологических услуг и косметического ухода за кожей [8]. Налажен выпуск суппозиторий [19]. Научные разработки проводятся с целью выпуска бактериофагов в виде линиментов и гелей [95]. Идет процесс создания новых лекарственных форм лечебно-профилактических препаратов во флаконах со спреевой насадкой для формирования мелкодисперсного аэрозоля [92]. Ведутся исследования, направленные на производство препаратов, основанных на сочетании полимеров и бактериофагов [95]. Для увеличения спектра действия фагосодержащих средств в лечебные коктейли включают комбинацию различных типов бактериофагов

[102, 176]. Одним из вариантов достижения антибактериального эффекта терапии является использование не живых фагов, а их ферментов, лизирующих бактерии [65, 110, 111, 186, 201, 203, 211, 215, 216].

Таблица 7 - Лечебно-профилактические бактериофаги, выпускаемые отечественными производителями

Наименование бактериофага	Спектр литической активности
Бактериофаг дизентерийный поливалентный	<i>Shigella flexneri</i> 1,2,3,4,6 serotypes и <i>Shigella sonnei</i>
Бактериофаг сальмонеллезный групп ABCDE	<i>Salmonella</i> spp.
Бактериофаг брюшнотифозный	<i>Salmonella typhi</i>
Бактериофаг стафилококковый	<i>Staphylococcus</i> spp.
Бактериофаг синегнойный	<i>P. aeruginosa</i>
Бактериофаг клебсиелл пневмонии очищенный	<i>K. pneumoniae</i>
Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный	<i>K. pneumoniae</i> , <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> и <i>ozaenae</i>
Бактериофаг колипротейный	Энтеропатогенные <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>
Интести-бактериофаг	<i>S. sonnei</i> и <i>S. flexneri</i> 1,2,3,4,6, энтеропатогенные <i>E. coli</i> , <i>P. vulgaris</i> и <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Пиобактериофаг поливалентный	<i>P. vulgaris</i> и <i>P. mirabilis</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , энтеропатогенные <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> spp.
Пиобактериофаг комплексный (Секстафаг)	<i>K. oxytoca</i> и <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> и <i>P. vulgaris</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., энтеропатогенные <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterococcus</i> spp.
Бактериофаг стрептококковый	<i>Streptococcus</i> spp. и <i>Enterococcus</i> spp.
Бактериофаг протейный	<i>P. vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i>

Сконструированы лечебно-профилактические фаговые препараты для профилактики и лечения заболеваний, в зависимости от локализации инфекционного процесса (Таблица 8) [15, 77].

Таблица 8 - Комплексные фаговые препараты для лечения и профилактики заболеваний

Локализация инфекционного процесса	Название препарата
Ротовая полость (гингивит и пародонтит)	«Фагодент»
Хирургические инфекции (абсцессы, фурункулы, флегмоны)	«Пиофагин»
Урогенитальные инфекции (уретрит, цистит, пиелонефрит)	«Урофаг»
Инфекции желудочно-кишечного тракта	«Кишечный бактериофаг»
Воспалительные заболевания кожи	«Фагодерм»
ЛОР-патология бактериальной этиологии	«Фаголор»
Инфекционные заболевания половых органов	«Фагогин»
Специализированный продукт питания для профилактики пищевых инфекций	«Фудфаг»

Для сочетанного эффекта антибактериального и иммуномодулирующего действия создан препарат «Интерфаг», содержащий в составе интерферон и бактериофаг [100]. Проводятся исследования по изучению вопроса иммунизации людей мукозными вакцинами, которые содержат различные варианты генетической информации вирионов.

Перспективным направлением в разработке комбинированных лекарств является сочетание эффектов литического действия бактериофагов и нормализации микробного пейзажа, свойственный пробиотикам (*Bifidobacterium spp.* и *Lactobacillus spp.*) [101]. Проведена серия экспериментальных работ (in vitro) с иммунным лактоглобуллином, установлено восстановление чувствительности бактерий рода *Salmonella* к специфическому бактериофагу в процессе пассирования бактерий [5, 18].

Разрабатываются дисплеи на основе фаговых пептидных библиотек, которые применяются в качестве пептидов, связывающихся с опухолями [30].

Учеными проводятся активные экспериментальные работы по выделению новых видов бактериофагов для производства лечебно-профилактических и диагностических препаратов (для обнаружения, идентификации и фаготипирования бактерий). Ведутся работы по поиску и селекции фагов,

активных в отношении бактерий родов *Serratia*, *Acinetobacter*, *Yersinia*, *Citrobacter*, *Listeria*, *Aeromonas* и *H. pylori* [34, 35, 66, 67, 77, 84, 95, 98, 107, 134, 141, 142, 148], *S. aureus* [202], коагулазонегативного *Staphylococcus spp.*, возбудителя ИСМП [213], *Bordetella bronchiseptica* [37], *Klebsiella spp.* [138], в том числе гипервирулентные и капсулированные типы [90], *Mycobacterium spp.* [29, 143, 192], *Bacillus spp.* [154, 155, 193, 197], *Vibrio spp.* [49], *E. coli патогенных серотипов* [65], *Clostridium perfringens* [43], *Hafnia alvei* [74], *Desulfovibrio desulfuricans* [81], *Enterococcus faecalis* [85], *Stenotrophomonas maltophilia* [147], *Enterobacter spp.* [140], *S. enterica* [167].

Показана высокая эффективность бактериофагов как средств биологической дезинфекции в лечебных организациях [10, 61], в том числе для купирования вспышек бактериальных инфекций [99]. Сегодня ведутся разработки новых профилактических средств для обработки инструментария и оборудования больниц [11].

В зависимости от количества и концентрации бактериофага выделяют пассивный и активный вариант дезинфекции. Первый способ подразумевает наличие достаточной заражающей дозы для наступления эффекта за единичный цикл развития вирионов. В отличие от пассивного, активный метод рассчитан на пополнение бактериофагов в биопленке, за счет репликации в клеточных структурах, при этом потребуется значительно меньшее количество фаговых частиц. При этом скорость наступления дезинфицирующего результата зависит от литических свойств бактериофагов, способности выхода потомства вирионов [62]. Необходимо учитывать, что по результатам последних исследований, несмотря на чувствительность или резистентность тестируемой бактериальной культуры к фаговым препаратам, применение фага в низких концентрациях может значительно стимулировать биопленкообразование [150].

Кроме того, возможно применение бактериофагов для борьбы с бактериальными инфекциями при обработке овощей, фруктов, мяса, рыбы и других продуктов на различных этапах технологического процесса подготовки пищевых изделий для употребления [8, 16, 38, 112, 137, 139, 171, 196, 198, 218].

На производствах с использованием заквасочных бактерий создаются коллекции бактериофагов для селекции штаммов бактерий, устойчивых к вирусным инфекциям, для предотвращения неудачных технологических процессов. Это особенно актуально при производстве молочных продуктов [82].

Бактериофаги используют как индикаторы бактериальной контаминации воды. Обнаружение коли-фагов является показателем свежего фекального загрязнения, источником которого являются животные и люди [61, 117].

1.4. Литическая активность коммерческих бактериофагов

Анализ данных литературы по изучению спектра литической активности коммерческих бактериофагов показал, что от 33 до 74 % штаммов *S. aureus* чувствительны к бактериофагам [6, 55, 69, 159, 188]. При этом у непатогенных изолятов *Staphylococcus spp.* этот показатель составил лишь 20 % [6, 159]. У представителей рода бактерий *Klebsiella* количество чувствительных штаммов обнаружено в 28 - 55 % [6, 69, 145], у бактерий рода *Proteus* от 37 - 47 % случаев [6, 69]. Спектр литической активности бактериофагов в отношении бактерий *E. coli* с патогенными свойствами составил от 62 до 87 % штаммов [52, 69]. Диапазон чувствительности *P. aeruginosa* к бактериофагам выявлен у 15,4 до 84 % штаммов [6, 24, 144].

Сложность использования бактериофага обусловлена тем, что «фаг-бактерия» является живой биологической системой, в которой непрерывно протекают процессы приспособления и адаптации [61].

Отмечено изменение свойств некоторых бактерий под влиянием бактериофагов, так наблюдалась смена S-формы на шероховатую R-форму колоний при выращивании на питательных средах и как вариант обратная реверсия при последующих пассажах бактериальных клеток. При этом в зависимости от формы колоний чувствительность к бактериофагам была разной [45]. В отдельных экспериментах штаммы *Bacillus anthracis* формировали капсулу, делая бактерии нечувствительными к литическому действию бактериофагов [50].

Вышеуказанные данные свидетельствуют о том, что решение вопроса о применении бактериофага должно приниматься только после изучения чувствительности микроорганизмов к бактериофагу [42, 69, 144, 145]. Допускается применение бактериофагов с умеренной литической активностью к бактериальной клетке («++» креста) [106], но в соответствии с федеральными клиническими рекомендациями «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике» назначение бактериофагов допустимо в случае полного отсутствия вторичного роста бактериальных культур [153]. Изучение активности литических свойств коммерческих фагосодержащих препаратов позволит провести своевременную актуализацию выпускаемых вирусных изолятов, что особенно важно в условиях нарастающей антибиотикорезистентности бактерий [36, 70, 71, 96, 158, 159].

Оптимальным вариантом применения бактериофагов в лечебных стационарах был бы подбор бактериофагов, адаптированных к возбудителям ИСМП, обнаруженных в данном, конкретном стационаре [53, 83] и персональный подход к каждому пациенту [97, 132].

1.5. Лабораторная диагностика, определение литической активности и количества бактериофагов

1.5.1. Определение литической активности бактериофагов

Описан метод под названием «spot-test». Литические свойства бактериофагов оцениваются по лизису бактериальной культуры под каплей изучаемого фага [33]. Результаты регистрируются в системе крестов. Оценка чувствительности проводится следующим образом: высокая (на 3 – 4 креста) чувствительность - полный лизис или незначительный вторичный рост; низкая (на 1 – 2 креста) чувствительность - на полусливной рост, до 50-10 негативных колоний фага; отрицательный - отсутствие лизиса [6].

В 2014 г. национальная ассоциация специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, разработала клинические рекомендации «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и

противоэпидемической практике», где пересмотрена оценка чувствительности бактерий к бактериофаговым препаратам. Метод постановки реакции допускает использование различных питательных сред, специфичных для изучаемого вида бактерий, обеспечивающих рост микроорганизмов в максимально короткие сроки. Для этого агары готовят, автоклавируют, разливают в стерильные чашки Петри по 4 мм высотой и подсушивают. С помощью денситометра готовят бактериальную суспензию с концентрацией $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Культуру наносят секторально или на всю поверхность чашки, после подсыхания взвеси бактерий стерильно капают каплю диагностируемого фагового препарата. В случае необходимости одновременного изучения чувствительности бактерий к антибиотикам и бактериофагам допускается совместная постановка тестов на среде Мюллер-Хинтон, при этом количество дисков с АМП сокращается до 5 штук. После подсыхания лизата чашки с питательной средой переворачивают и термостатируют при $+ 37^\circ \text{C}$. Окончательная оценка результатов осуществляется через 24 ч, в случае необходимости с использованием лупы.

Оценка литической активности фага осуществляется по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»). Не допускаются к использованию фагосодержащие препараты в зоне «литического пятна» которых обнаружены единичные бактериальные колонии вторичного роста. К применению разрешаются коммерческие бактериофаги с литической способностью «++++» креста. При этом в результате исследования необходимо указать исходные данные о фагосодержащем препарате, включая серию и срок годности [153].

Существует аналог способа, описанного в федеральных клинических рекомендациях Л. М. Майской [106]. Предлагается проводить исследования на питательном агаре с экстракцией мясного отвара или агаре Хоттингера. Бактериальную суспензию суточной агаровой культуры разводят по стандартному образцу мутности - 5 ЕД по ОСО 42-28-85-01п (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва) и распределяют небольшое количество по поверхности питательного агара, подсушивают. После подсыхания суспензии наносят каплю исследуемого бактериофага в размере 30 мкг и также дают высохнуть. Чашки

инкубируют при $+ 37^{\circ}\text{C}$ сутки, для бактерий рода *Proteus* время можно сократить. Степени лизиса бактерий оцениваются по четырех крестовой схеме. В лечебных целях используются фагосодержащие препараты, литическая активность которых «++++» и «+++» креста. Допустимо применение бактериофага и при умеренной чувствительности штамма бактерий - «++» креста.

Описан метод определения чувствительности бактерий к бактериофагам, основанный на специфичности литического действия бактериофагов в жидкой питательной среде. Для постановки метода в питательный бульон засевают петлю суточной бактериальной культуры, с помощью пипетки добавляют от 1 до 10 капель исследуемого бактериофага и инкубируют 18 – 20 ч. Оценка литических свойств бактериофага осуществляется по мутности бульона при сравнении с контрольной пробиркой, свободной от бактериальной культуры [28].

В литературе представлен метод Фюрта в модификации Фишера: «2 мл бактериофага смешивают с расплавленным и остуженным до $+45^{\circ}\text{C}$ агаром и выливают в чашки Петри. Чашку подсушивают в термостате, а затем делят на 30 квадратов. В каждый квадрат вносят каплю испытуемой бульонной культуры. Инкубируют при $+ 37^{\circ}\text{C}$ в течение 18 - 20 ч, после чего учитывают степень лизофильности культур» [51].

Афиногеновым Г. Е. описан способ оценки литической активности, основанный на изучении взаимодействия бактериофагов и бактерий в монослое клеток эмбриона человека. Изучение степени адгезии исследуется уже через 2 ч совместного культивирования [23].

В литературе описан метод радиального лизиса [78]. Он основан на возможности диффундирования бактериального возбудителя в агаризованном геле с изучаемым бактериофагом. По диаметру зоны лизиса судили о литических свойствах фагов.

1.5.2. Определение концентрации фагов в фаголизате

Наиболее известными и распространёнными методами изучения активности бактериофагов в различных разведениях лизировать бактерии являются метод

Аппельмана и Грация [153].

Метод Аппельмана основан на определении мутности жидкой питательной среды. В соответствии с представленным методом необходимо соединить в питательном бульоне взвесь бактериальной культуры и раститрованный фаголизат. Максимальное разведение бактериофага, способное вызывать лизис бактерий, определяется по прозрачности питательной среды. Данный «метод имеет принципиальное ограничение: чувствительная к бактериофагу культура микроорганизма должна быть стабильна по данному признаку и не должна содержать устойчивых к фагу клеток, что на практике не поддается контролю».

Количественной характеристикой бактериофагов является титр. Титром бактериофага называют количество фаговых частиц, содержащихся в 1 мл фаголизата (БОЕ/мл), который определяется методом агаровых слоев по Грация.

Метод, предложенный И.Н. Ашешовым [113], основан на определении «времени нарастания титра». Для этого бактериальную суспензию и бактериофаг в десятикратных разведениях соединяли в питательной среде и проводили высевы с интервалом 30 мин на плотные среды для культивирования микроорганизмов. В результате устанавливалось время в течение, которого количество фаговых частиц увеличивалось вдвое.

Крюгер и Джонс [51] определяли титр бактериофага по скорости лизиса культуры, сравнивая изменения мутности в пробирках с микробной культурой и различными концентрациями фаговых частиц с контрольными образцами.

На основе методов исследования, регистрирующих изменения концентрации фаговых частиц, разработаны коммерческие диагностические наборы для определения видов возбудителей инфекционных заболеваний [115]. Частный пример постановки данной реакции описан в МУК 4.2.1122-02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» [116].

В литературе для выявления возбудителя *B. anthracis* описаны реакции адсорбции фага и фаготетразоловый метод [155].

Установлен интересный феномен, касающийся L - форм бактерий *Brucella spp.* При изучении литической активности фагов их действие можно было наблюдать только на плотных питательных средах, а видимого лизиса в жидких питательных средах не зарегистрировано [46].

1.5.3. Инновационные методы детекции литической активности бактериофагов

Идентификацию видового состава бактерий и чувствительность бактерий к бактериофагу под действием электрического поля предложил О. И. Гулий. Сущность метода основана на изменении оптической характеристики среды культивирования бактериальной суспензии и специфического бактериофага под действием электрического поля [57].

Кроме того, применяются электроакустический метод [56, 58], электроориентационная спектроскопия, флюоресцентная спектроскопия, методы с использованием биосенсоров на основе бактериофагов [58], проточная цитометрия [32], биолюминесцентный метод [163]. Вирулентную природу фага выявляют с помощью секвенирования вирусных метагеномов [136]; разрабатываются методы идентификации патогенов с помощью обнаружения эндолизинов бактериофагов [173], а также с использованием метода масс-спектрометрии [179].

Применение атомно-силовой и электронной микроскопии позволяет наблюдать взаимодействие бактериальных клеток и бактериофагов [63, 152, 161].

Таким образом, комплекс инновационных методов лабораторной диагностики необходим для решения вопроса о возможности применения бактериофага в лечебно-профилактических целях, фагодифференцировки, внутривидового типирования (фаготипирование) бактериальной культуры, а также определения титра бактериофага [7, 45, 119, 153, 157].

Резюме. Одной из важных проблем здравоохранения является нарастающий темп развития резистентности бактерий к АМП и как следствие распространение ИСМП. На протяжении нескольких лет организации родовспоможения и

хирургические стационары вносят весомый вклад в число регистрируемых случаев по данной инфекции. Неотъемлемым требованием эпидемиологической безопасности оказания медицинской помощи служит рациональная антибактериальная терапия, которая не возможна без современных знаний этиологической структуры возбудителей и особенностей распространения инфекционных заболеваний.

Согласно современным представлениям бактериофаги зарекомендовали себя в профилактике и лечении различных бактериальных болезней. Изучение этого вопроса показало большой разброс данных о чувствительности клинических изолятов к фагосодержащим лекарственным средствам. При этом для своевременной актуализации состава маточных фаголизатов в коммерческих препаратах отсутствуют данные мониторинга чувствительности возбудителей бактериальных инфекций к бактериофагам на региональных уровнях.

Вместе с тем, изучение взаимодействия бактериофагов с бактериальными клетками позволило выявить их участие в модификации морфологических свойств бактерий, формировании патогенных и токсигенных характеристик штаммов, а также обеспечении передачи генов резистентности к АМП. Остается открытым вопрос, касающийся совместного использования бактериофагов и антибактериальных средств в лечебных целях. Обзор литературы показал отсутствие доказательной базы о влиянии вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП.

Существующие в настоящее время методы определения литической активности бактериофагов не унифицированы, при этом результаты исследований противоречивы. С целью повышения достоверности оценки литических свойств бактериофагов и совершенствования методов необходима разработка технологий, позволяющих получить результат в цифровых значениях.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. Предвестники активации процесса формирования антибиотикорезистентности штаммов - возбудителей бактериальных инфекций

Масштабное расширение диагностических и лечебных методов, создание крупных больничных комплексов с высокой концентрацией людей со сниженным иммунным статусом на ограниченной территории создают благоприятные условия для формирования возбудителей ИСМП. Источниками которых являются циркулирующие в стационарах штаммы патогенов, наиболее адаптированные к местным особенностям лечебного учреждения (антибиотики, антисептики, дезинфектанты).

Изучение угрозы колонизации пациентов возбудителями ИСМП осуществлялось в одном из уязвимых звеньев системы здравоохранения – в учреждениях родовспоможения. По статистическим данным в РФ на долю рожениц и новорожденных приходится около 19 % всех внутрибольничных инфекций [54].

В исследовании участвовали два родильных дома № 2 и № 3 г. Тюмени, деятельность которых ориентирована на технологию РОУС (родовспоможение, ориентированное на участие семьи). В наблюдение и статистический анализ включались женщины с нормально протекающим периодом беременности и родов без сопутствующих заболеваний. Среднее время пребывания в стационаре пациентов составляло четыре дня.

Сравнение качества биологической безопасности оказания медицинской помощи в организациях родовспоможения проводилось по данным независимого анкетирования. Анкета разработана сотрудниками ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора (Приложение 1). Анализ результатов опроса родильниц установил особенности ведения пациентов акушерских стационаров, связанные с регламентом технологии РОУС.

Статистическая обработка некоторых отличительных характеристик родильных домов, представлена в таблице 9.

Таблица 9 - Данные анкетирования пациентов, характеризующие качество оказания медицинской помощи в акушерских стационарах

	Роддом № 3	Роддом № 2	95 % ДИ
Роды путем Кесарева сечения			
Количество опрошенных родильниц	3324	3139	1,34 [1,17 - 1,53]
Ответ «Да» в %	13,36	17,11	
Рассечение промежности			
Количество опрошенных родильниц	2893	2700	2,17 [1,79 - 2,63]
Ответ «Да» в %	5,88	11,93	
Стимуляция родов			
Количество опрошенных родильниц	3006	2824	0,99 [0,89 -1,1]
Ответ «Да» в %	65,97	66,25	
Факт первого контакта новорожденного с матерью в родовом зале			
Количество опрошенных родильниц	3305	3092	0,72 [0,59 - 0,88]
Ответ «Да» в %	94,31	92,3	
Факт прикладывания новорожденного к груди в родовом зале			
Количество опрошенных родильниц	3289	3068	0,42 [0,37 - 0,47]
Ответ «Да» в %	84,31	69,3	
Факт докорма новорожденного в роддоме молочными смесями (роды первые)			
Количество опрошенных родильниц	1586	1552	18,72 [15,23 -22,99]
Ответ «Да» в %	8,3	63,0	
Факт докорма ребенка в роддоме молочными смесями (роды повторные)			
Количество опрошенных родильниц	1607	1452	17,06 [13,39 - 21,75]
Ответ «Да» в %	5,2	48,5	

Примечание: *- жирным шрифтом обозначены достоверные отличия

Установлено, что шансы более агрессивного ведения родов (кесарево сечение, рассечение промежности) в роддоме № 2, были достоверно выше, а

соблюдение первого контакта между матерью и ребенком в родовых залах, включая прикладывания к груди, напротив ниже, по сравнению с роддомом № 3. Доверительные интервалы отношения шансов встретить положительный вариант ответа пациентов акушерских стационаров представлены на рисунке 3.



Рисунок 3 – Статистические результаты обработки данных анкетирования родильниц

Кроме того, зарегистрировано, что в роддоме № 2 частота использования докорма искусственными смесями при кормлении новорожденных на порядок выше, чем в акушерском стационаре № 3 (Рисунок 4).



Рисунок 4 - Частота встречаемости некоторых отличительных характеристик оказания акушерской помощи

В качестве критерия перестройки популяции бактерий и становления предвестников активации эпидемического процесса использовался показатель резистентности к индикаторным антибиотикам (ИПР).

Биологическая безопасность родильниц и новорожденных оценивалась по динамике зависимости зарегистрированных случаев инфекционных заболеваний и уровню резистентности микробиоты пациентов акушерского стационара. Диаграмма среднегодовых значений инфекционной заболеваемости новорожденных (без ОРЗ) в первые 28 дней, родильниц в первые 42 дня после родов (вместе с послеродовыми лихорадками) на 1000 пациентов и уровня резистентности микробиоты обследуемых в роддоме № 2 показана на рисунке 5.

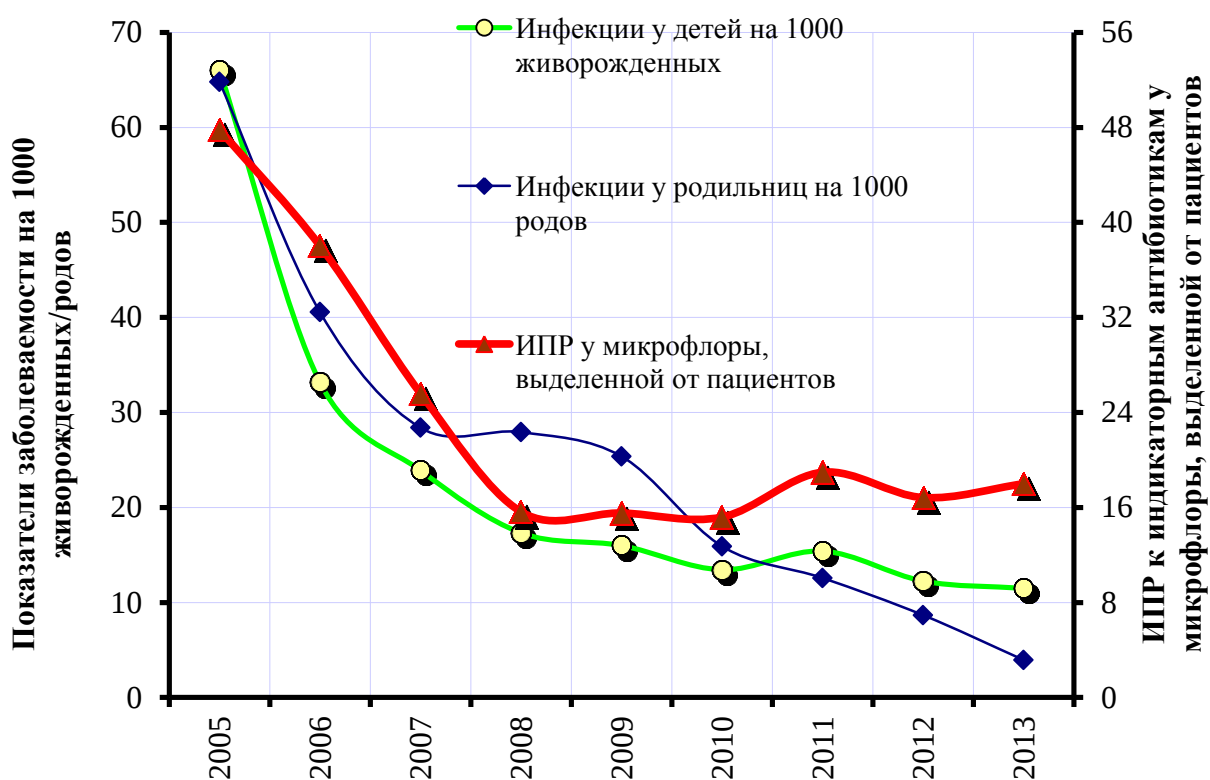


Рисунок 5 - Среднегодовые значения инфекционной заболеваемости пациентов и уровень резистентности их микробиоты (роддом № 2)

Актуальность детерминированной зависимости между дисперсией уровня среднеквартальных значений резистентности микробиоты к контрольным АМП

пациентов роддома № 2 и установленными случаями инфекционного заболевания подтверждает диаграмма рассеивания, представленная на рисунке 6.

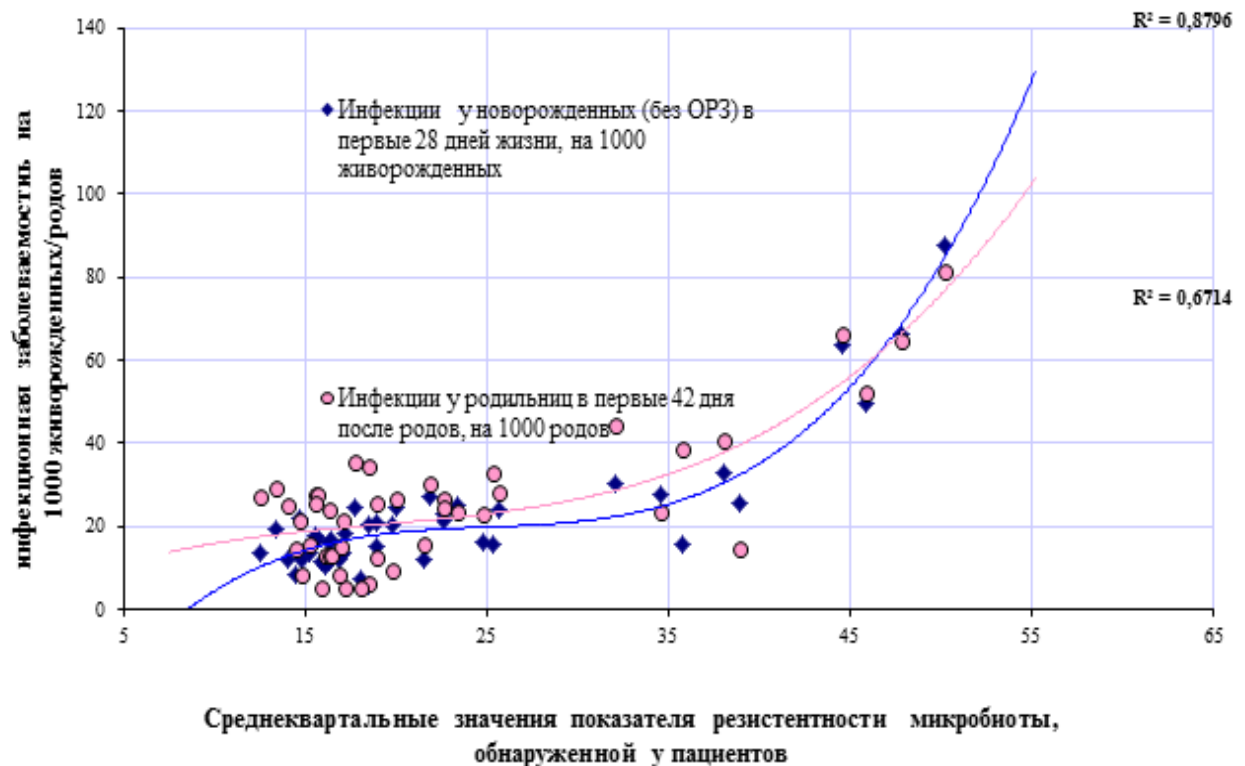


Рисунок 6 - Степень детерминированной зависимости резистентности микробиоты пациентов и показателей инфекционной заболеваемости

Сравнение взаимосвязи изучаемых параметров с помощью критерия Хи-квадрата Пирсона показало линейную зависимость показателей резистентности микробиоты к индикаторным АМП и заболеваемости родильниц (67 % случаев), а также зарегистрированных фактов инфекционных болезней у новорожденных (87 % случаев).

Таким образом, основываясь на аналитике ретроспективных данных можно утверждать, что показатель резистентности микробиоты пациентов характеризует активность механизмов формирования патогенного потенциала у циркулирующих штаммов.

Результаты наблюдений взаимоотношения микробных популяций пациентов и штаммов, изолированных с объектов производственной среды роддома № 2, представлены на контрольных картах Шухарта (Рисунок 7, 8).



Рисунок 7 - Среднегодовые значения показателей резистентности бактерий, выделенных с объектов производственной среды

Сравнение показателей резистентности бактериальных культур, выделенных от родильниц и новорожденных (Рисунок 8) с уровнем резистентности штаммов бактерий, изолированных из смывов с различных поверхностей стационара (Рисунок 7), указывало на биологическую безопасность процессов оказания медицинской помощи.

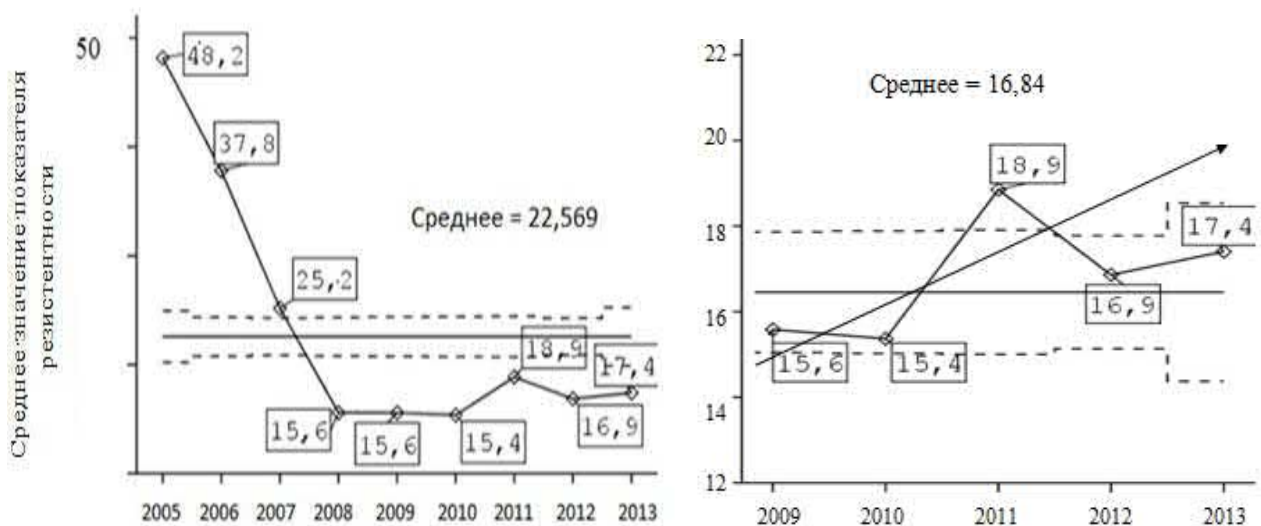


Рисунок 8 - Среднегодовые значения показателя резистентности бактериальных культур, выделенных от пациентов

Качество оказания медицинской помощи в акушерском стационаре № 2 до 2008 г. характеризовалось высоким уровнем резистентности к индикаторным

антибиотикам как микробиоты пациентов, так и изолятов из объектов внешней среды. Исследуемые показатели находились выше верхней контрольной границы и говорили о нестабильности системы биологической безопасности лечебного процесса, а также о возможности нежелательных исходов медицинской помощи. Благодаря активному проведению противоэпидемических мероприятий в последующие три года процессы активации механизмов формирования и распространения штаммов с высоким уровнем резистентности были стабилизированы, а расчетный показатель резистентности к индикаторным АМП устойчиво расположился ниже верхней контрольной границы карт Шухарта.

За весь период наблюдения среднегодовые значения показателя резистентности бактерий, изолированных из производственной среды, снизились почти в 2 раза. Уменьшение этих данных с 61,0 до 27,5 % демонстрировало высокую эффективность профилактических мер, направленных на снижение процессов обмена генетической информацией штаммов, циркулирующих в стационаре. Проведение санитарно-противоэпидемических мероприятий на объектах внутрибольничной среды роддома № 2 препятствовало распространению штаммов с патогенным потенциалом. При сравнении значений резистентности к индикаторным антибиотикам микробиоты пациентов и штаммов, выделенных с объектов окружающей среды, наблюдалось параллельное снижение изучаемого показателя. Изменение параметров оценки биологической безопасности роддома № 2 в неблагоприятную сторону, за счет нарастания показателя резистентности микробиоты пациентов, отмечено с 2011 года, при этом увеличение уровня инфекционной заболеваемости не установлено (Рисунок 5). Сделано заключение, что нежелательные признаки в стабильности системы биологической безопасности пациентов поддерживались факторами, не связанными с объектами производственной среды стационара.

Таким образом, противоэпидемические мероприятия, осуществляемые медицинским персоналом, направленные на улучшение санитарно-гигиенического состояния производственной среды роддома, создали условия для минимизации активности процессов формирования резистентности штаммов к

АМП и обеспечили снижение инфекционной заболеваемости пациентов. Но, начиная с 2011 г., установлено появление нежелательных отклонений генерирования патогенного потенциала изолятов, выделенных из биотопов новорожденных и родильниц, обусловленного нарастающими значениями показателя резистентности, но не выходящими за рамки верхнего контрольного предела в соответствии с контрольной картой Шухарта (Рисунок 8). Минимизация действия такого мощного фактора, как распространение инфекционных заболеваний через объекты окружающей среды, позволила визуализировать проявление детерминанты с низким влиянием на формирование штаммов с селективными преимуществами.

Вторым этапом нашего исследования было изучение резистентности к индикаторным антибиотикам микробиоты различных биотопов пациентов учреждений родовспоможения, выделенных при еженедельном бактериологическом мониторинговании (Таблица 10).

Таблица 10 - Средние значения показателей резистентности микробиоты, изолированной в отдельных биотопах пациентов роддомов № 2 и № 3

	Средние значения уровня резистентности		t	p	95 % ДИ
	Роддом № 3	Роддом № 2			
Число культур	2379	2034			
Все локусы, из них:	16,7	18,0	2,85	0,004	1,3 [0,4 - 2,1]
кожа пупочного остатка	17,5	22,0	4,38	0,001	4,5 [2,5 - 6,5]
содержимое толстой кишки детей	20,1	24,9	4,96	0,001	4,9 [2,9 - 6,8]
слизистые носа детей	12,8	12,2	-0,45	0,652	-0,6 [-3,3 - 2,1]
слизистые зева детей	15,6	12,5	-3,79	0,001	-3,0 [-4,6 - -1,5]
конъюнктивы детей	16,2	14,9	-0,64	0,521	-1,3 [-5,3 - 2,7]
руки родильниц	15,1	17,1	1,16	0,247	2,0 [-1,4 - 5,3]
молочные железы родильниц	15,7	15,1	-0,56	0,573	-0,6 [-2,7 - 1,5]

Примечание: - жирным шрифтом обозначены достоверные отличия

Зарегистрированы различия показателей резистентности к АМП бактериальных штаммов, идентифицированных от пациентов акушерских стационаров, анализ представленных данных указывал на достоверные расхождения. Так, в роддоме № 2 преобладала бактериальная микрофлора, характеризующаяся большей резистентностью в АМП, чем у пациентов роддома

№ 3. Разность средних значений 95 % доверительного интервала составила 0,4 – 2,1 %, средний показатель уровня равен 1,27 %.

Детальное рассмотрение показателей резистентности бактерий в соответствии с локусом получения биологического материала показало, что статическая разница обусловлена микробиотой, изолированной из содержимого толстой кишки новорожденных и с кожи пупочного остатка пациентов роддома № 2. Уровень резистентности микробиоты слизистой зева новорожденных, изолированной от детей роддома № 2, был ниже, чем у младенцев роддома № 3, что свидетельствует об отсутствии прямого влияния микробиоты зева на резистентность бактерий содержимого толстой кишки и культи пупочного остатка.

Показатели резистентности бактериальных изолятов, выделенных из различных локусов пациентов акушерских стационаров, с учетом распределения значений 95 % доверительных интервалов, представлены на рисунке 9.

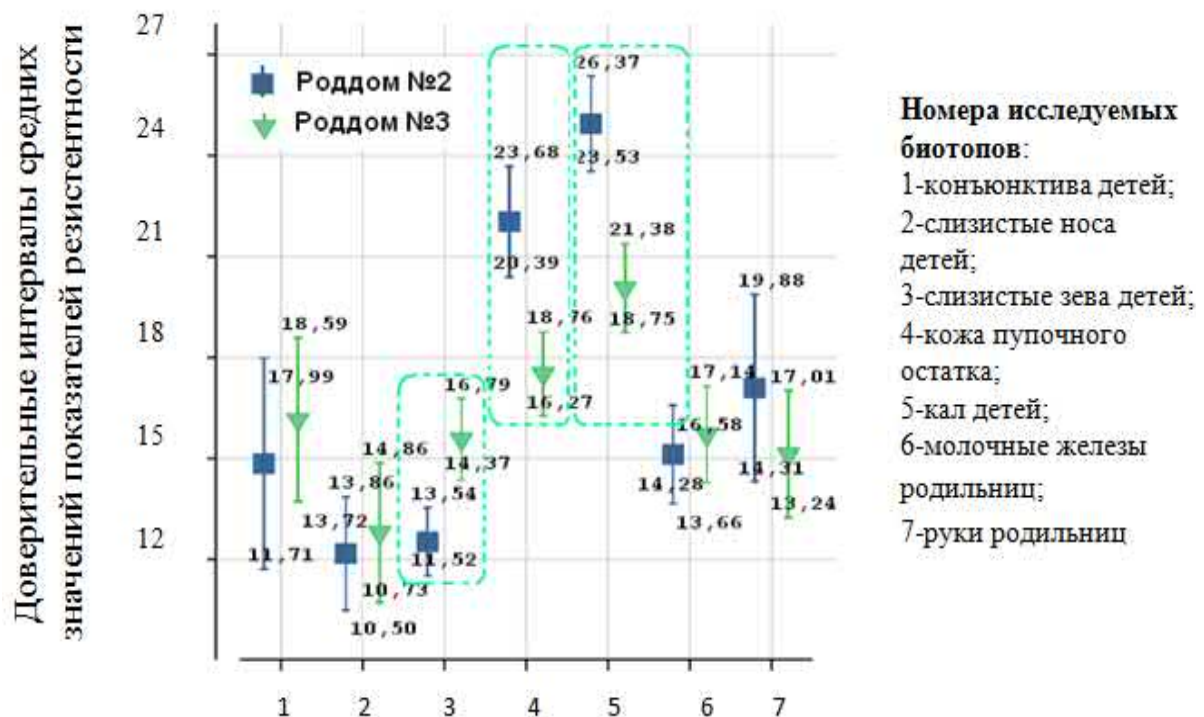


Рисунок 9 - Средние значения показателей резистентности микробиоты, выделенной из отдельных биотопов пациентов

В ходе комплексного анализа данных исследования видового состава бактериальной флоры содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка

определены различия между новорожденными роддомов № 2 и № 3 (Таблица 11).

Таблица 11 - Структура микробиоценоза содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка новорожденных и уровень ее резистентности

Субпопуляции бактерий	Род дом	Число культур	Среднее значение показателя резистентности штаммов	t- критерий равенства средних		95 % ДИ
				t	2-х сторонняя значимость	
<i>Streptococcus spp.</i>	№ 3	162	14,98	2,03	0,04	3,87 [0,13 - 7,61]
	№ 2	158	18,85			
<i>E. coli</i>	№ 3	320	20,65	2,68	0,01	4,10 [1,09 - 7,10]
	№ 2	288	24,74			
<i>Enterococcus spp.</i>	№ 3	438	21,05	1,91	0,06	1,41 [-0,04 - 2,85]
	№ 2	766	22,46			
Неферментирующие грамотрицательные бактерии	№ 3	3	26,67	1,28	0,32	28,36 [-62,2-118,9]
	№ 2	19	55,03			
Семейство <i>Enterobacteriaceae</i> , кроме <i>E. coli</i>	№ 3	70	29,52	1,18	0,24	2,32 [-1,56-6,2]
	№ 2	110	31,84			
<i>S. aureus</i>	№ 3	287	10,49	-0,39	0,70	-0,24 [-1,49 - 1,00]
	№ 2	221	10,24			
Грамотрицательные бактерии , кроме <i>E. coli</i>	№ 3	73	30,10	2,60	0,01	5,31 [1,28 – 9,35]
	№ 2	129	35,41			
Всего	№ 3	1280	18,29	6,28	0,01	3,55 [2,44 – 4,66]
	№ 2	1562	21,84			

Примечание: - жирным шрифтом обозначены достоверные отличия

Наиболее резистентные субпопуляции штаммов были изолированы в акушерском стационаре № 2 и идентифицированы как бактерии рода *Streptococcus spp.* и грамотрицательные бактерии. Ключевым отличием микробиоты новорожденных явилась частота выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (кроме *E. coli*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий, шансы определения которых были в 2 раза (95% ДИ [1,4 - 2,9]) выше, чем в роддоме № 3 (Таблица 12).

Таблица 12 – Частота встречаемости и показатель резистентности бактериальных изолятов, выделенных из содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка новорожденных

Классы бактерий	% от суммы по уровням переменной		Показатель резистентности к АМП	
	Роддом № 2	Роддом № 3	Роддом № 2	Роддом № 3
<i>Enterococcus spp.</i>	48,8	34,4	23,6	22,5
<i>E. coli</i>	19,5	24,4	25,2	21,7
<i>S. aureus</i>	13,9	24,2	10,4	11,0
<i>Streptococcus spp.</i>	9,6	12,8	19,4	14,4
Грамотрицательные бактерии, кроме <i>E. coli</i>	8,3	4,2	35,9	30,2
Всего	100	100	22,7	18,8

Примечание: - жирным шрифтом обозначены достоверные отличия

Резистентность микробиоты, выделенной из содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка, была проанализирована в зависимости от продолжительности пребывания новорожденных в организациях родовспоможения, полученные результаты представлены в таблице 13.

Таблица 13 - Резистентность к АМП бактерий, изолированных из содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка новорожденных

Продолжительность пребывания в роддоме	Место родов	Число культур	Среднее значение показателя резистентности	t-критерий равенства средних		95 % ДИ
				t	Значимость (2-сторонняя)	
0-1 день	Роддом №2	338	20,5	2,85	0,01	3,28 [1,02 - 5,55]
	Роддом №3	316	17,2			
2 день	Роддом №2	403	22,0	4,21	0,01	4,72 [2,52 - 6,92]
	Роддом №3	362	17,3			
3 день	Роддом №2	547	22,6	4,19	0,01	4,10 [2,18 - 6,02]
	Роддом №3	384	18,5			
4 и более день	Роддом №2	324	21,1	0,16	0,87	-0,21[-2,70 - 2,29]
	Роддом №3	269	21,3			

Примечание: - жирным шрифтом обозначены достоверные отличия

Достоверно установлены более высокие показатели резистентности бактериальных культур в роддоме № 2 только в течение первых трех суток.

Резюме. Определена структура потенциальных возбудителей ИСМП, обладающих селективными особенностями, необходимыми для выживания в

условиях производственной среды акушерского стационара, проанализированы локусы формирования резистентности к антибиотикам. Выводы основаны на данных независимого анкетирования по оценке качества биологической безопасности оказания медицинских услуг, на материалах еженедельного многолетнего микробиологического мониторинга микробиоты пациентов и объектов производственной среды, а также динамики инфекционной заболеваемости.

Доказано, что в роддоме № 2 соблюдение регламента, предписанного технологией РОУС, выполнялось на порядок ниже, чем в роддоме № 3 в части соблюдения правил ведения родов и послеродового этапа. Установлено, что удельный вес новорожденных, получавших докорм детскими молочными смесями, был значительно выше других показателей, а соблюдение первого контакта между матерью и ребенком в родовых залах, включая прикладывание к груди, напротив, достоверно ниже, чем в роддоме № 3. Зарегистрированная разница в соблюдении правил биологической безопасности при оказании медицинской деятельности позволила выявить отличия в микробиоте новорожденных.

На фоне низкого уровня зарегистрированных случаев инфекционной заболеваемости новорожденных роддома № 2 достоверно определена более высокая степень резистентности микробиоты, изолированной из содержимого толстой кишки и с кожи пупочного остатка. При этом исключена прямая взаимосвязь формирования патогенного потенциала бактериальных культур за счет микробиоты зева детей. Выявлено, что признаки (предвестники) формирования резистентности бактериальных культур к АМП обусловлены грамотрицательными субпопуляциями бактерий. Эти данные соответствуют информации об основных возбудителях ИСМП, указанных в официальных источниках. Отсутствие статистических различий уровней антибиотикорезистентности бактериальных культур, изолированных от новорожденных, на четвертый день жизни, свидетельствуют о благоприятной эпидобстановке в акушерском стационаре № 2 и вероятно связано с процессами

грудного вскармливания и снижением использования докорма новорожденных.

Определение структуры и локализации бактериальных штаммов на стадии формирования селективных преимуществ выживания в условиях производственной среды позволит обеспечить своевременное проведение противоэпидемиологических мероприятий, включающих индивидуальный подбор литических бактериофаговых препаратов, как одних из антимикробных средств, воздействующих на возбудителей бактериальных инфекций. Данные о предвестниках эпидемиологического процесса могут быть положены в основу разработки алгоритмов локального использования бактериофагов, направленных на профилактику инфекционной заболеваемости в акушерских стационарах.

ГЛАВА 3. Поиск и исследование штаммов бактериофагов, активных в отношении *P. mirabilis*, изолированных в акушерском стационаре

В ходе проведения микробиологического мониторинга в акушерском стационаре № 2 из содержимого толстой кишки новорожденных было выделено 45 культур *P. mirabilis*. Одной из задач диссертационной работы был поиск и дифференцировка перспективных штаммов бактериофагов в отношении данных бактерий, изолированных в период, характеризующийся становлением возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Для выделения бактериофагов методом обогащения «с подсевом» в 150 мл питательного бульона (Оболensk, Россия) соединяли очищенные от механических примесей пробы суспензии почвы (10 г) или воды (15 мл) из водоемов г. Тюмени и суточные бульонные бактериальные изоляты *P. mirabilis* из рабочей коллекции бактериологической лаборатории ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора. Посевы инкубировали в течение суток при температуре + 37° С, центрифугировали на 3000 об/мин, надосадочную жидкость фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Merck, Германия). Инокулят изучали на наличие бактериофагов методом «spot-test» и Грация.

В ходе работы изолированно 2 штамма протейных фагов. В мягком агаре бактериофаги образовывали круглые бляшки, прозрачные, четкие, ровные, с ореолом, диаметром 3 мм. Негативные колонии трехкратно пассировались для получения чистой культуры бактериофага. Титр фагов составлял не менее 10⁸ БОЕ/мл по методу Грация.

Бактериальные штаммы-хозяева, необходимые для наращивания бактериофагов были протестированы на наличие профагов, интегрированных в геном клетки методами индукции митомицином С и ультрафиолетовым излучением, подробно описанными во введении диссертационной работы.

Изучение литической активности выделенных бактериофагов с условно-патогенными бактериями, изолированными от пациентов акушерского стационара № 2 методом «spot-test» [153] представлено в таблице 14. Штаммы, активность

бактериофагов к которым оценивалась на «+++» и «++++» креста, считались чувствительными к данному виду вирионов.

Таблица 14 – Спектр литической активности штаммов протейных бактериофагов в отношении бактериальных культур *P. mirabilis*

№ штамма <i>P. mirabilis</i>	Активность штамма протейного фага		№ штамма <i>P. mirabilis</i>	Активность штамма протейного фага	
	2207-№35	P16-2532		2207-№35	P16-2532
2111	+++	+++	3369	-	-
2482	++++	+++	2468	-	-
2350	-	+++	630	-	-
2762	-	+++	196	-	-
2848	-	+++	1129	++++	+++
1524	++++	+	756	+++	++++
1205	++	+	596	++++	++++
2596	-	++	1123	++++	+++
2561	++++	-	298	++	++
109	-	-	4456	++++	++++
259	-	++++	56	+++	+++
169	++++	++++	1993	++++	++++
569	+++	+++	556	+++	++++
1269	++++	+	336	-	-
899	++++	+	2699	+	++++
890	++++	++++	1999	-	++++
2300	++++	++++	2339	++++	++++
1196	-	-	2235	-	++++
2236	-	-	3651	++++	+
1963	-	-	455	+++	+
2202	-	++	496	++++	++++
1569	-	++++	3368	+	+
269	++++	+++			

Для подтверждения строго литической природы выделенных бактериофагов и таксономической принадлежности было проведено молекулярно-генетическое

исследование посредством полногеномного секвенирования с последующим биоинформатическим анализом.

Все изученные штаммы протеиных бактериофагов принадлежали к порядку хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*. Было определено систематическое положение бактериофага *Proteus phage* 2207-№35, среди трех известных бактериофагов с аннотированными геномами, входящими в род *Gorganvirus*. Известные бактериофаги рода *Gorganvirus* - вирулентные и литически активные в отношении *P. mirabilis*. По данным программы blastn бактериофаг *Proteus phage* VB_PmiS-Isfahan, являющийся типовым видом этого рода, и фаг 2207-№35 имеют на протяжении 89 % длины генома 96,1 % идентичных нуклеотидных оснований. Родовая принадлежность подтверждается также кладограммой, построенной на основе выравнивания при помощи алгоритма MAFFT, отражающая генетическую дистанцию между фагами рода *Gorganvirus* (Рисунок 10).

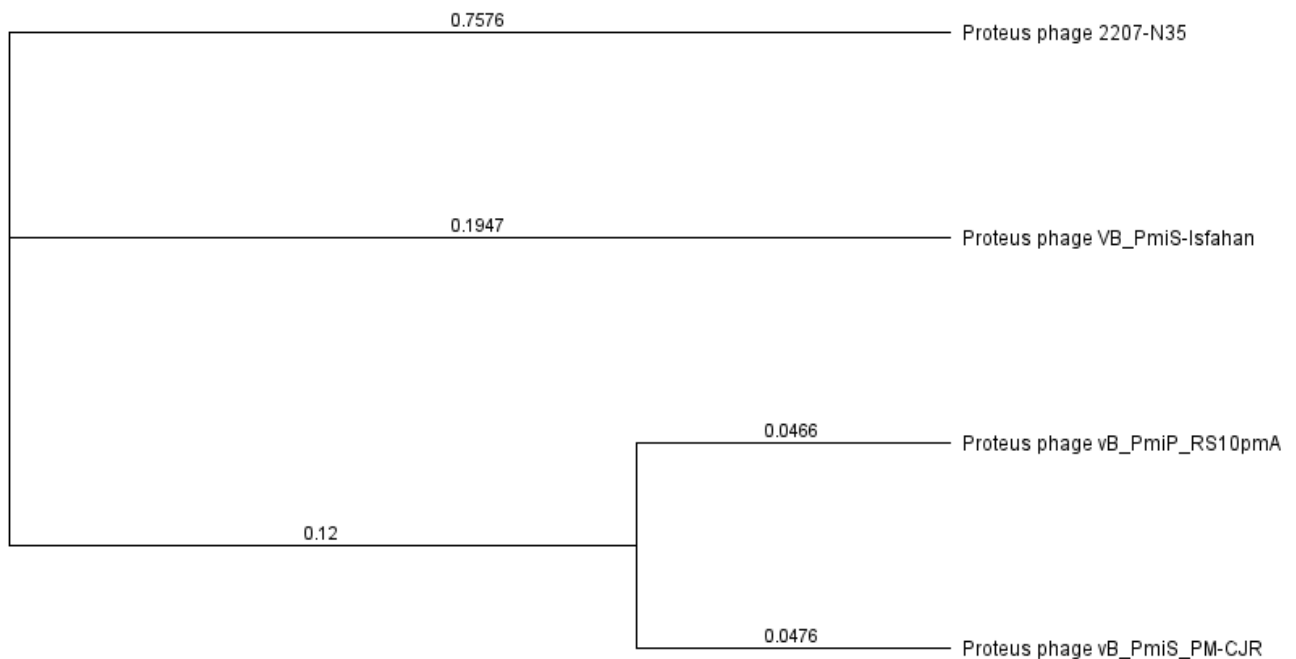


Рисунок 10 – Филогенетическое дерево геномов известных бактериофагов, имеющих не менее 80 % идентичности с геномом фага *Proteus phage* 2207-№35

Кроме того, гомология бактериофагов рода *Gorganvirus* подтверждена множественным полногеномным выравниванием, выполненным при помощи алгоритма progressiveMauve (Рисунок 11).

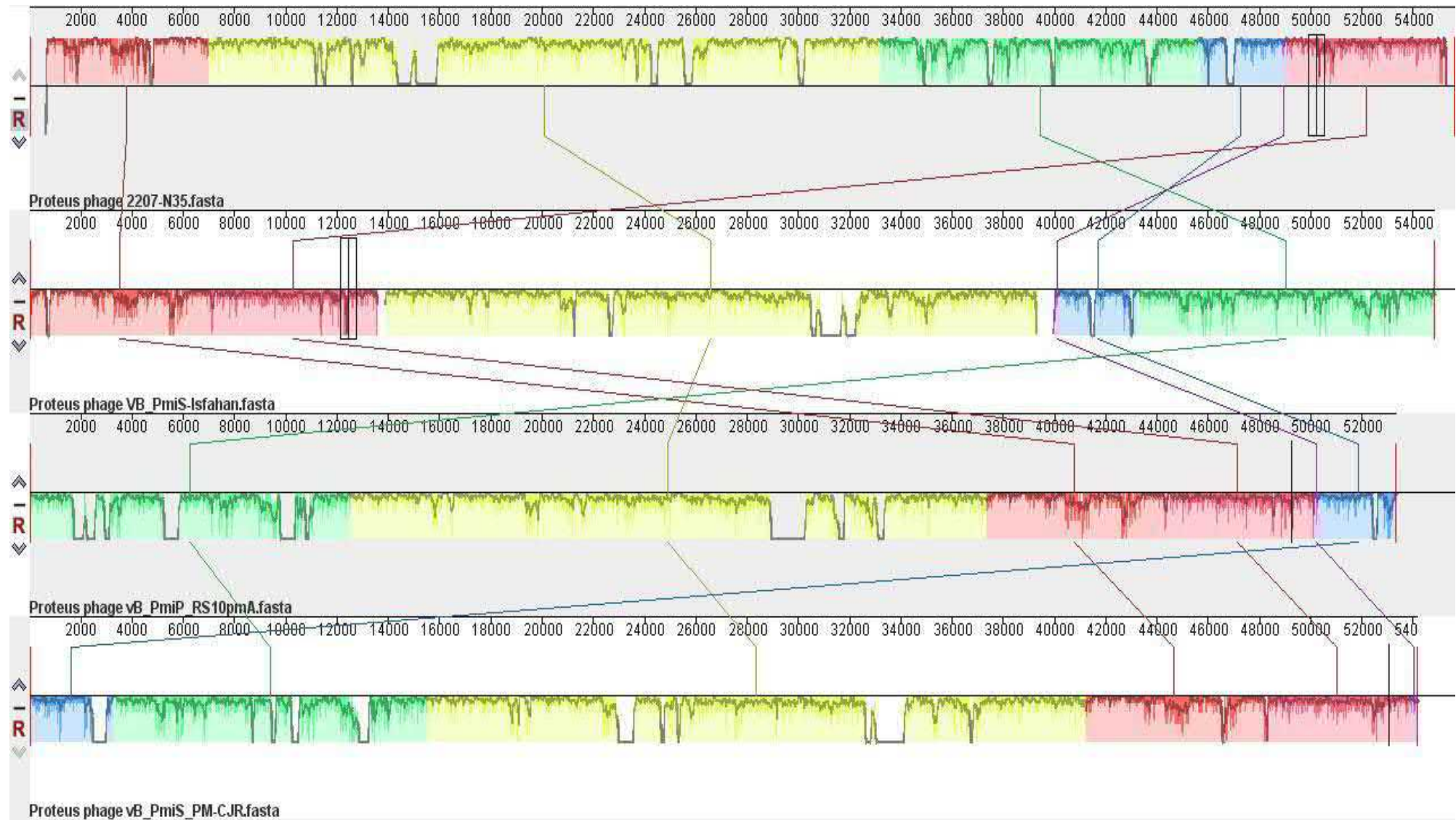


Рисунок 11 – Множественное выравнивание геномов бактериофагов рода *Gorganvirus*

Геном фага 2207-№35 содержит 96 открытых рамок считывания, в том числе 41 с предсказанными функциями, которые приведены в таблице 15 и на рисунке 12.

Таблица 15 – Предсказанные продукты открытых рамок считывания протеинового бактериофага *Proteus phage* 2207-№35

Открытая рамка считывания		Предполагаемый продукт открытой рамки считывания
Старт, п.н.	Стоп, п.н.	
331	14	P4 family primase
643	335	NinX
1344	847	nuclease
1770	1417	ribonucleotide reductase large subunit
2416	1910	exonuclease
2833	2486	helicase
4128	2944	helicase DEXDc superfamily protein
4592	5278	recombinase
5281	6360	CRISPR/Cas system associated protein
7392	9212	DNA polymerase II
10391	10726	nucleosidase
10713	11954	DNA methylase
13087	12611	endolysin
18465	15907	tail tip protein
18814	18443	N-acetyltransferase
19305	18811	tail associated/tail assembly protein
20392	19895	coil containing protein
23504	20385	tail tape measure
23900	24223	transcriptional regulator/repressor
25380	24958	tail assembly protein
25945	26442	DNA polymerase III
27872	26475	major tail protein
28701	28276	neck protein
31275	30256	major capsid protein
31670	31362	virion structural protein
32629	31670	SICAR synthase
33035	32631	protease
34531	33596	prohead assembly protein
37106	36015	nuclease
38354	38800	dCMP deaminase
38787	38969	ribosome protein/transcription elongation factor
38969	39670	deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase

Продолжение таблицы 15

41530	40163	portal protein
45736	44009	large terminase subunit
48781	48125	terminase small subunit
49922	50341	swarming motility protein
50338	50616	portal protein
51609	50776	thymidylate synthase
52281	52099	transcription suppressor
54952	52619	P4 family primase
55264	54956	NinX

Подтверждение отсутствия известных фаговых и бактериальных интеграз или их гомологов в совокупности с морфологическими свойствами и таксономическим положением позволяет сделать заключение о строго литической (вирулентной) природе фага *Proteus phage* 2207-№35.

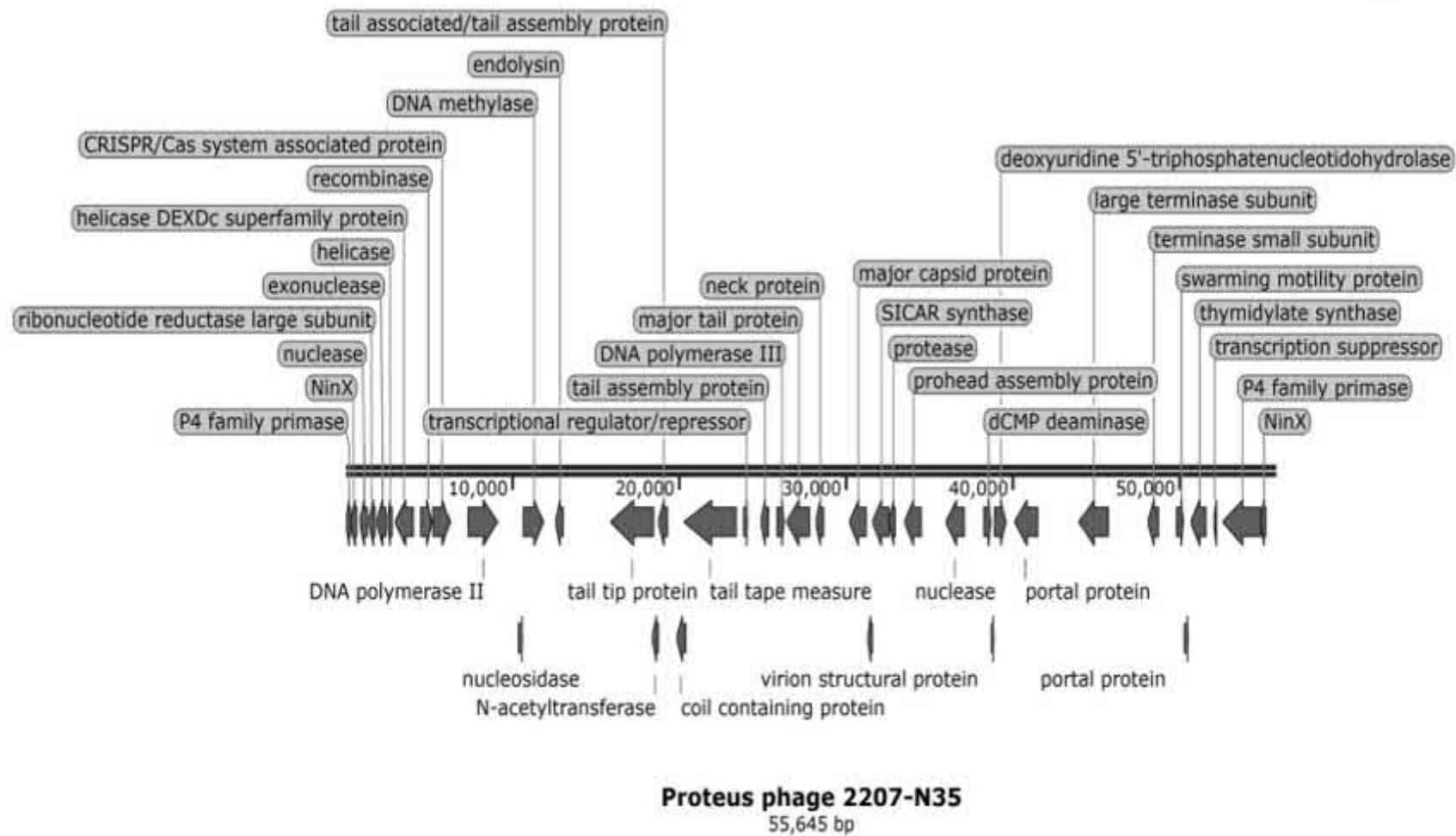


Рисунок 12 – Геномная карта бактериофага *Proteus phage* 2207-№35 с предполагаемыми продуктами предсказанных открытых рамок считывания

Выравнивание генома фага *Proteus phage* P16-2532 при помощи алгоритма blastn с использованием базы данных NCBI Genbank, продемонстрировало отсутствие принадлежности фага к какому-либо таксону нижестоящего ранга. Однако, представленный анализ показал наличие кластера из десяти бактериофагов, имеющих с фагом P16-2532 на протяжении 95% – 100 % длины генома 96,85 – 99,74 % идентичных нуклеотидных оснований. Описанные бактериофаги из указанного кластера являлись вирулентными. В настоящий момент отдельный таксон для данного кластера фагов отсутствует, и имеются предпосылки для его создания, что подтверждается кладограммой, построенной на основе выравнивания при помощи алгоритма MAFFT (Рисунок 13).

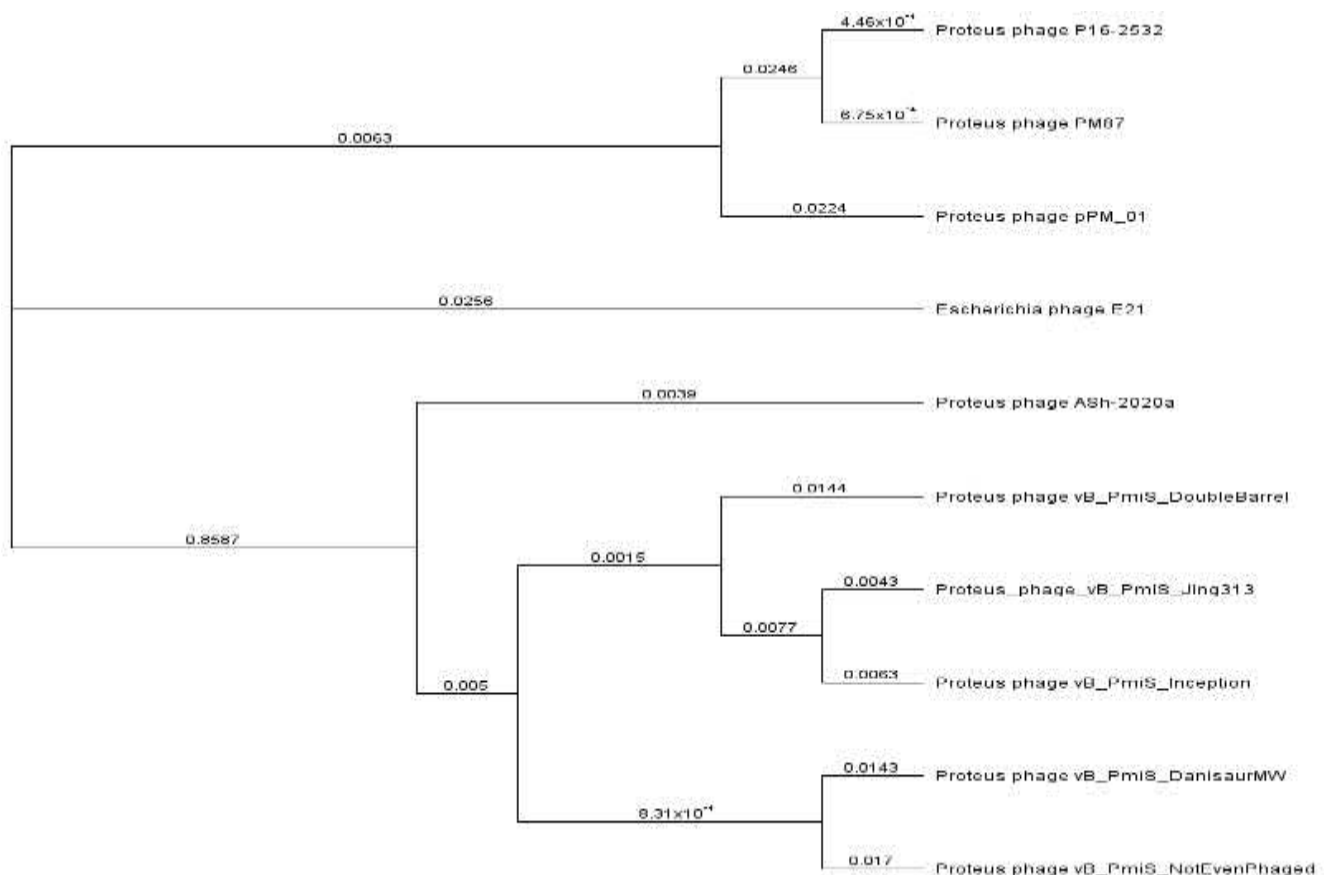


Рисунок 13 – Филогенетическое дерево геномов известных бактериофагов, имеющих не менее 80% идентичности с геномом фага *Proteus phage* P16-2532

Близкая гомология геномов бактериофагов вышеуказанного кластера подтверждается множественным выравниванием при помощи алгоритма progressiveMauve (Рисунок 14).

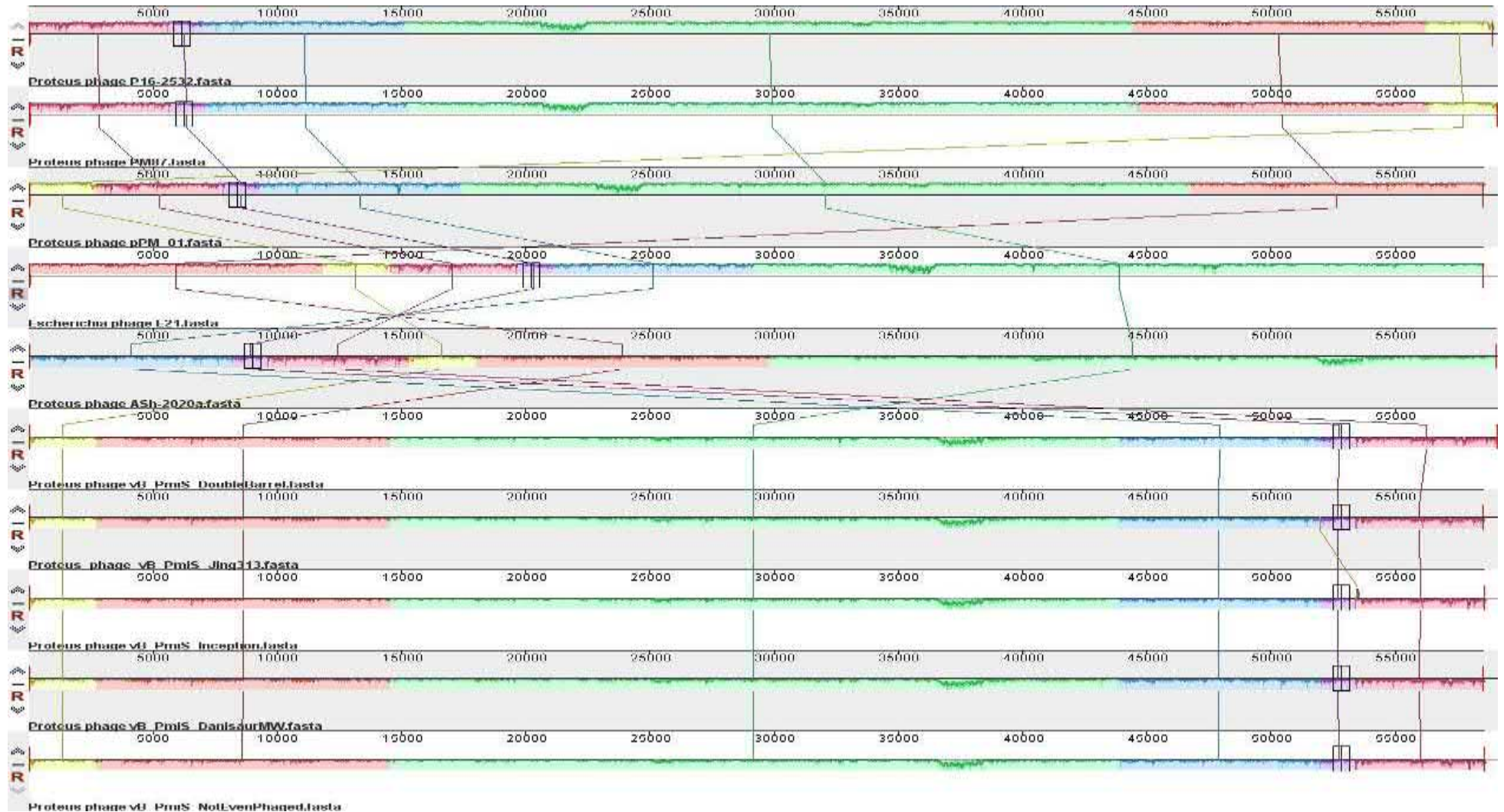


Рисунок 14 – Множественное выравнивание геномов бактериофагов, имеющих не менее 80% идентичности с геномом фага *Proteus phage* P16-2532

Аннотированный геном бактериофага *Proteus phage* P16-2532 показал наличие 86 открытых рамок считывания, в том числе 45 с предсказанным функциями, список которых приведен в таблице 16.

Таблица 16 – Предсказанные продукты открытых рамок считывания протейного бактериофага *Proteus phage* P16-2532

Открытая рамка считывания		Предполагаемый продукт открытой рамки считывания
Старт, п.н.	Стоп, п.н.	
4721	4071	DNA modification protein Mom-like protein
10130	10507	recombinase
10504	11217	recombinase
14133	14870	DNA methyltransferase
16809	17057	nucleosidase
17776	17522	i-spanin
18480	17776	lysis protein A
18805	18491	lysis protein B
23201	22434	short transient receptor potential channel 6 isoform X1
23449	23198	short transient receptor potential channel 6 isoform X1
26039	25497	tail fiber protein
28350	26113	tail assembly protein
28862	28353	tail assembly protein
29346	28897	tail assembly protein
29887	29387	tail assembly protein
30364	30128	tail assembly protein 1
30709	30377	tail assembly protein
32713	31421	tail assembly protein
33185	32904	tape measure protein
33858	33256	tape measure protein
35342	33936	tape measure protein
36565	35372	tape measure protein
36930	36718	tape measure protein
37235	36927	tape measure protein
38262	38062	structural protein
39038	38202	structural protein
39247	39044	structural protein
39763	39251	transposase
42201	41134	capsid protein E
42630	42214	decorator protein D
42865	42644	prohead protease
43920	42892	prohead protease

Продолжение таблицы 16

45454	44024	lambda family portal protein
45833	45558	head-to-tail joining protein
47772	46396	terminase large subunit
48114	47902	terminase small subunit
48485	48123	terminase small subunit
49144	48488	SNF2 domain-containing protein
50010	49147	SNF2 domain-containing protein
50257	49970	VRR-NUC domain-containing protein
50499	50257	DNA polymerase I family A
52285	51461	DNA polymerase I family A
54312	52984	Cas4-like protein
55694	56032	primase
56145	58160	primase

Визуализация предсказанных продуктов открытых рамок считывания представлена на рисунке 15. Среди открытых рамок считывания с предсказанной функцией не было выявлено известных и гомологичных им интеграз прокариот и их вирусов, что позволяет сделать заключение о строго литической (вирулентной) природе фага *Proteus phage*.

Таким образом, выделены и изучены новые штаммы бактериофагов, активные в отношении бактериальных культур *P. mirabilis*, изолированные в период, характеризующийся формированием возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. В соответствии с кладограммой и множественным полногеномным выравниванием определено системное положение бактериофагов. Установлено, что исследуемые штаммы протейных бактериофагов принадлежали к порядку хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*. На основании базы данных Genbank бактериофаг *Proteus phage* 2207-№35 относился к роду *Gorganvirus*, а бактериофаг *Proteus phage* P16-2532 показал отсутствие принадлежности к какому-либо таксону нижестоящего ранга. Исходя из морфологических свойств, таксономического положения и молекулярно-генетической структуры бактериофагов, указывающей на отсутствие известных и гомологичных интеграз прокариот и вирусов, можно утверждать о строго литической природе полученных бактериофагов.

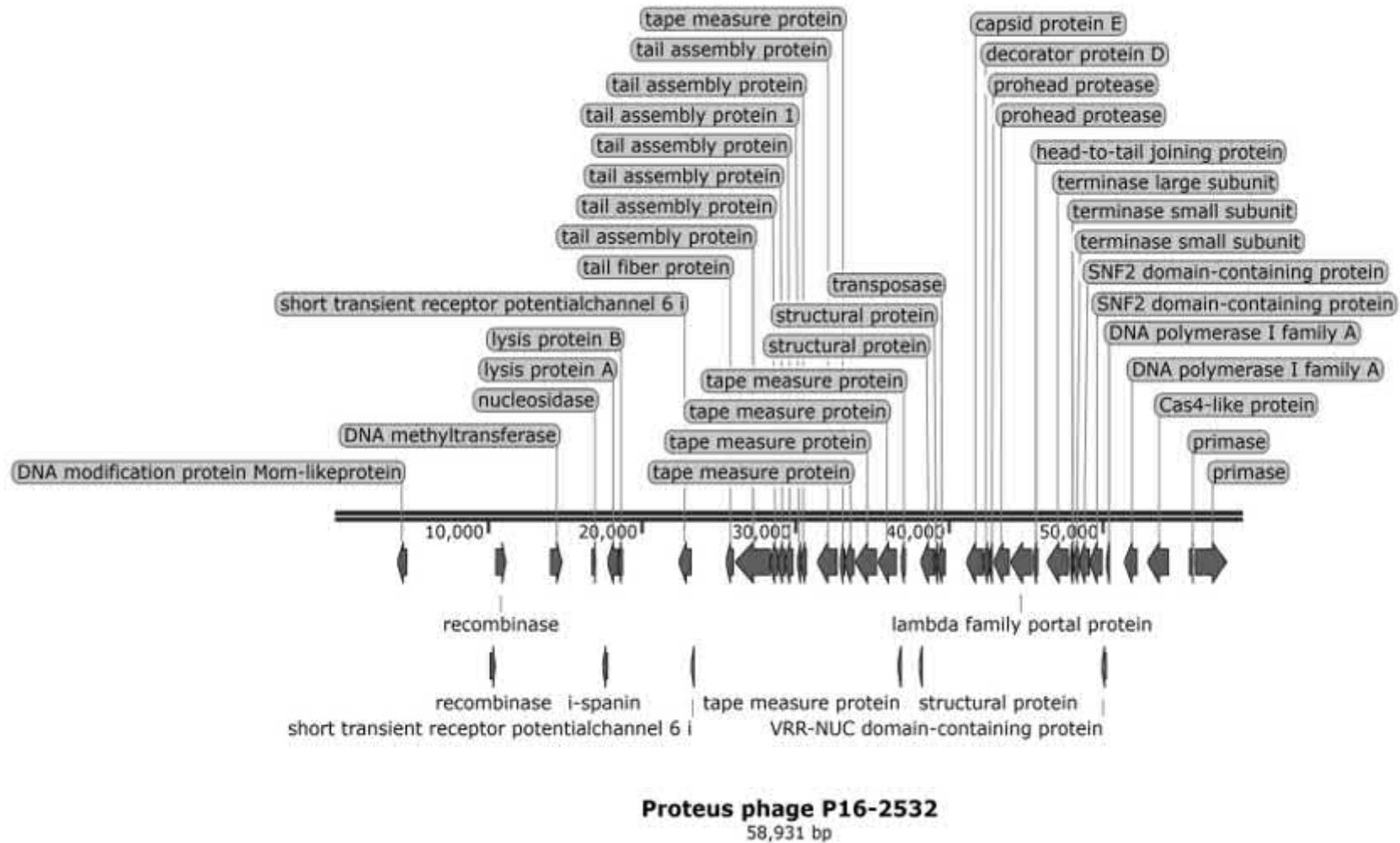


Рисунок 15 – Геномная карта бактериофага *Proteus phage P16-2532* с предполагаемыми продуктами предсказанных открытых рамок считывания

В ходе работы аннотированные полногеномные последовательности выделенных бактериофагов *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№ 35 депонированы в NCBI GenBank под номерами MN840486.1 и MN840487.1 соответственно.

Выделенные бактериофаги являются перспективными для использования в лечебной деятельности. Необходимо провести дальнейшее изучение их характеристик (стабильность титра при различных температурах, pH, устойчивость к хлороформу, урожайность) для рассмотрения в качестве производственных штаммов.

ГЛАВА 4. Взаимодействие специфических бактериофагов и клинических штаммов бактерий

4.1. Скрининговое исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам

Бактериофаги являются векторами горизонтального переноса генов между бактериальными патогенами. Это диктует необходимость глубокого анализа взаимодействия системы «бактериофаг-бактерия», связанного с применением бактериофагов в качестве лекарственных средств. Для предварительного (скринингового) тестирования влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП были отобраны бактериальные изоляты рода *Klebsiella* и культуры *S. aureus*, изолированные из акушерского стационара. Разработан следующий алгоритм исследования. Суточные бактериальные штаммы оценивались на чувствительность к АМП диско-диффузионным методом, затем в течение 24 ч штаммы с идентичными бактериофагами инкубировались в жидкой питательной среде. В 5 мл бульона соединяли петлю изучаемой культуры (диаметр петли 2 мм) и 5 капель фага, дозированного с помощью пипетки (объем 5мл). Определение жизнеспособных бактериальных клеток осуществляли высевом на плотную питательную среду по истечении 24 ч термостатирования. Из выросших колоний готовили инокулят 0,5 ЕД по McFarland Standart с последующим повторением определения чувствительности бактерий к АМП.

Для экспериментальной работы были отобраны 108 штаммов *S. aureus*. Изучение литических свойств стафилококкового бактериофага в жидкой питательной среде выполнялось по методу М. О. Биргера. Исследуемый бактериофаг обладал литической активностью в отношении 66,7 % изолятов, оценка проводилась по мутности питательного бульона (25 бактериальных штаммов были чувствительны; 47 изолятов с промежуточной чувствительностью и 36 – устойчивых к действию фага). Одновременно с определением фагочувствительности осуществлялась постановка антибиотикограмм. Высев на плотную питательную среду после взаимодействия с бактериофагом показал сохранение ростовых характеристик 70 культур *S. aureus*.

Интерпретация значений зон задержки роста культуры под влиянием лекарственного препарата до и после взаимодействия со стафилококковым бактериофагом показала, что после сокультивирования бактерий с фагом увеличилось количество штаммов, резистентных к оксациллину и цефалоспорином (цефалексину, цефуроксиму), а также к гентамицину и офлоксацину (Рисунок 16). Достоверность различий была определена с использованием критерия МакНемара, установлена статистическая значимость только по гентамицину.

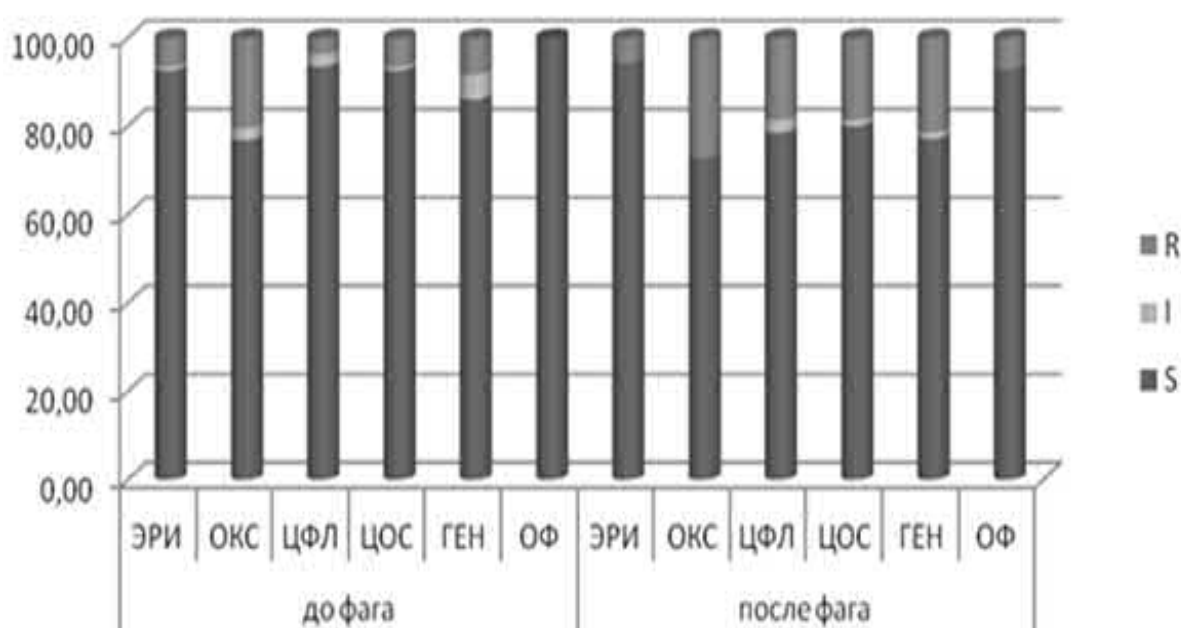


Рисунок 16 - Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий *S. aureus* до и после взаимодействия со стафилококковым бактериофагом, %

Примечание: R - резистентный, I - умеренно-резистентный, S - чувствительный штамм

Литическую активность фагосодержащего лечебного препарата клебсиелл поливалентного изучали в отношении 97 бактериальных изолятов рода *Klebsiella* в жидкой питательной среде. Получены следующие результаты: 59,8 % штаммов были лизированы вирионами, 23,7 % изолятов проявили умеренную чувствительность к фагам, отсутствие лизиса наблюдалось у 16,5 % - культур. Второй этап постановки опыта по исследованию антибиотикорезистентности микроорганизмов проведен с 47 штаммами бактерий рода *Klebsiella* (так как 50 штаммов были лизированы фагом).

Результаты чувствительности бактерий к АМП до и после взаимодействия со специфическим бактериофагом проиллюстрированы на рисунке 17. Выявлены статистически значимые отличия в отношении противомикробного препарата тетрациклина. Шансы определения чувствительных бактерий *Klebsiella spp.* к этому препарату увеличились почти вдвое после взаимодействия бактериальных изолятов с бактериофагом.

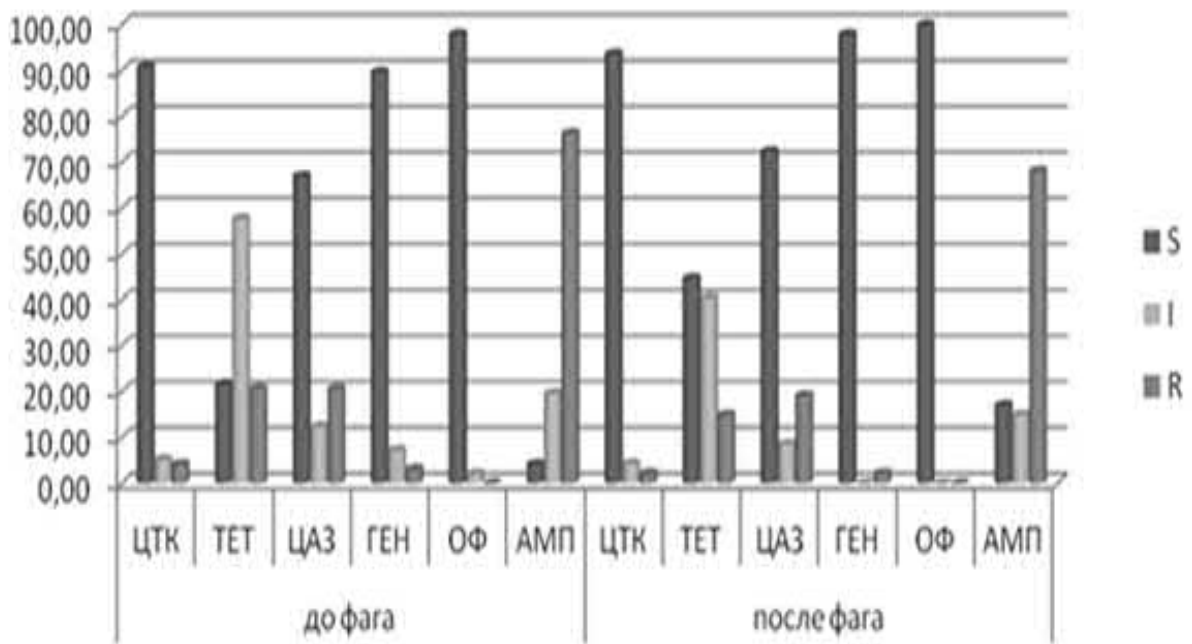


Рисунок 17 - Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий рода *Klebsiella* до и после взаимодействия с фагом клебсиелл поливалентным, %

Примечание: R - резистентный, I - умеренно-резистентный, S - чувствительный штамм

В ходе проведения научного исследования было установлено, что 77 % штаммов были резистентны к ампициллину. При повторной постановке антибиотикограммы после взаимодействия культур с фагами число резистентных штаммов сократилось до 68 %. Снижение процентного показателя в данном случае расходится с современными представлениями о природной резистентности этих бактерий к пенициллиновой группе препаратов.

Суммирование количества чувствительных штаммов (S) и умеренно-резистентных штаммов (I) к антибиотикам показано на рисунках 18 и 19.

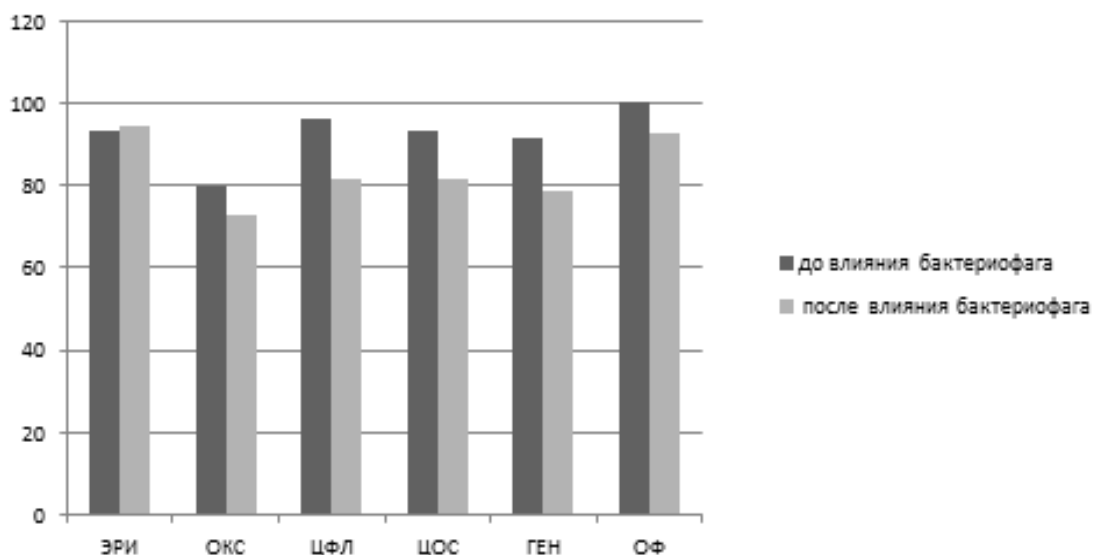


Рисунок 18 - Количество чувствительных и умеренно-резистентных штаммов бактерий *S. aureus* к антимикробным препаратам до и после взаимодействия со специфическим бактериофагом, %

Определено, что в популяции бактерий *S. aureus* после взаимодействия со специфическим бактериофагом количество штаммов S+I уменьшается, в то время как в популяции бактерий рода *Klebsiella* - увеличивается. Минимальные отличия в антибиотикорезистентности микроорганизмов, скорее всего, являются проявлениями фенотипической вариабельности экспрессии определенного механизма резистентности.

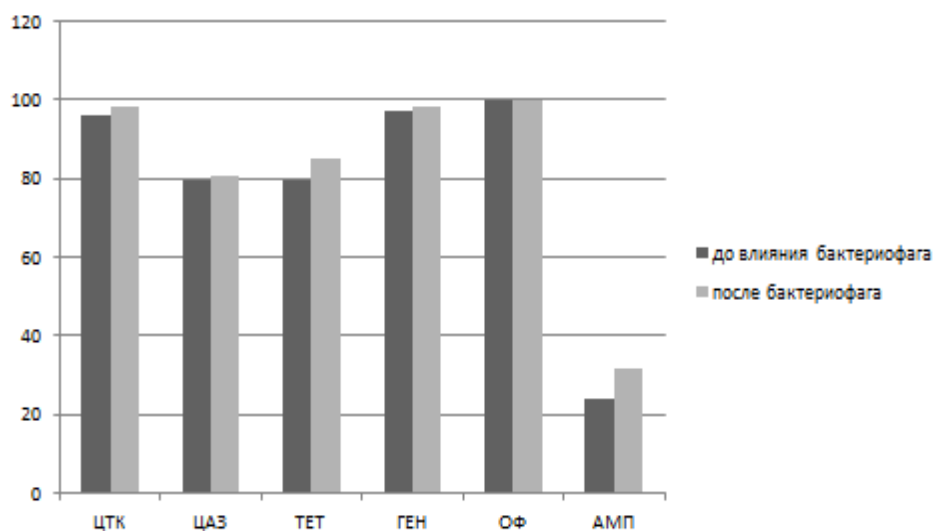


Рисунок 19 - Количество чувствительных и умеренно-резистентных штаммов рода *Klebsiella* к антимикробным препаратам до и после взаимодействия со специфическим бактериофагом, %

Предварительное (скрининговое) изучение влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП определило важность и необходимость постановки экспериментов с вирулентными монобактериофагами для подтверждения рабочей гипотезы.

4.2. Влияние вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам

Для углубленного исследования влияния вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий были подобраны монобактериофаги *S. aureus* и *P. mirabilis*. Использовались бактериофаги из музейных коллекций и изолированные из коммерческих фагосодержащих препаратов. Фаги были протестированы на предмет отсутствия известных интеграз, гомологичных интегразам умеренных фагов PsP3, P2, Kp6, P21, Lambda, а также стафилококковых фагов: Sa1int – Sa7int [194] при помощи специфической ПЦР. Высокий титр бактериофагов и их литическая способность к подобранным штаммам *S. aureus* и *P. mirabilis* указывали на активный процесс взаимодействия вирусов и бактерий, а также о хорошей чувствительности микроорганизмов к бактериофагам.

Бактериофаги *S. aureus* относятся к семейству *Herelleviridae*, подсемейству *Twortvirinae*, роду *Kayvirus*. В мягком агаре стафилококковые фаги образовывали прозрачные, четкие, ровные, круглые негативные колонии диаметром 1-2 мм (без ореола). Титр фагов составлял не менее 10^8 БОЕ/мл по методу Грациа.

Все исследуемые бактериофаги *P. mirabilis* принадлежат к семейству *Siphoviridae*. Бактериофаг PRO-1 в мягком агаре образовывал круглые бляшки, прозрачные, четкие, ровные, с ореолом, диаметром 3 мм. Титр фага составлял не менее 10^8 БОЕ/мл по методу Грациа. Морфология негативных колоний и результаты полногеномного секвенирования фагов P16-2532, 2207-№ 35 были описаны в главе 3.

Проведенное исследование методом «spot-test» определило бактериальные культуры, литическая активность фагов к которым оценивалась по пятибалльной

системе на три креста (+++) и характеризовалась как зона лизиса с единичными колониями вторичного роста бактерий (Таблица 17).

Таблица 17 - Чувствительность штаммов *S. aureus* в отношении вирулентных бактериофагов

Наименование бактериофага	Номер бактериофага	Номер штамма	Оценка литической активности бактериофага
Бактериофаги <i>S. aureus</i>	Sa30	4022	+++
	H125/4037	3059	+++
	Sa30	3059	+++
	П15/4037	3255	+++
	H159/4040	3255	+++
	П15/4037	75	+++
	H125/4037	75	+++
	H159/4040	75	+++
	H159/4040	2731	+++
Бактериофаги <i>P. mirabilis</i>	P16-2532	2111	+++
		2482	+++
		2350	+++
		2762	+++
		2848	+++
	PRO-1	3299	+++
		2133	+++
		2906	+++
		2394	+++
		2243	+++
	2207-№ 35	2111	+++

Примечание: +++ - зона лизиса с единичными колониями вторичного роста

Для определения чувствительности бактерий к АМП из суточных культур микроорганизмов с помощью денситометра готовили бактериальную суспензию 0,5 ЕД по McFarland Standart ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Инокулят наносили тампоном на агар Мюллер-Хинтон в течение 15 минут после приготовления. Не позднее этого же времени на поверхность питательной среды раскладывали диски с АМП. Определение чувствительности микроорганизмов к АМП выполняли диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям

Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам [118, 135].

Совместное культивирование микроорганизмов с бактериофагами осуществляли в жидкой питательной среде. Для этого в стерильную пробирку с 4,5 мл питательного бульона добавляли 200 мкл бактериальной суспензии 0,5 ЕД по McFarland Standart ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл), 200 мкл бактериофага с титром 10^8 БОЕ/мл, перемешивали и инкубировали в течение 18 – 24 ч при + 37 °С. После суточного взаимодействия бактерий с бактериофагом из всех пробирок петлей производили высеив на плотную питательную среду Мюллер-Хинтон и выполняли повторную идентификацию выросших единичных колоний микроорганизмов. Далее из этих бактерий вновь готовили суспензию 0,5 ЕД по McFarland Standart и повторно исследовали на чувствительность к АМП. Интерпретацию значений диаметров зон задержки роста микроорганизмов при определении чувствительности к антибиотикам проводили в соответствии с актуальными нормативными документами [118, 135] и инструкциями по применению наборов дисков, предложенными производителем.

В ходе эксперимента трижды в трехкратной повторности выполнено исследование чувствительности бактерий *S. aureus* и *P. mirabilis* к каждому АМП до и после инкубирования со специфическим вирулентным бактериофагом. Интерпретация значений диаметров зон задержки роста бактерий при определении чувствительности к АМП представлена в таблицах 18, 19.

Таблица 18 - Чувствительность бактерий *S. aureus* к АМП до и после культивирования с бактериофагами

№ штамма	Антибиотики	До взаимодействия с бактериофагом	После взаимодействия с бактериофагом:			
			П15/4037	Н125/4037	Sa30	Н159/4040
3255	оксациллин	S	S			S
75	оксациллин	S	S	S		S
4022	оксациллин	S			S	
2731	оксациллин	R				R
3059	оксациллин	S		S	S	

Продолжение таблицы 18

3255	эритромицин	S	S			S
75	эритромицин	S	S	S		S
4022	эритромицин	S			S	
2731	эритромицин	R				R
3059	эритромицин	S			S	
3255	клиндамицин	S	S			S
75	клиндамицин	S	S	S		S
4022	клиндамицин	S			S	
2731	клиндамицин	S				
3059	клиндамицин	S		S	S	
3255	гентамицин	S	S			S
75	гентамицин	S	S	S		S
4022	гентамицин	S			S	
2731	гентамицин	S				S
3059	гентамицин	S		S	S	
3255	норфлоксацин	S	S			S
75	норфлоксацин	S	S	S		S
4022	норфлоксацин	I/S			I/S	
2731	норфлоксацин	S				S
3059	норфлоксацин	I/R		I/R	I/R	
3255	цефтриаксон	S	S			S
75	цефтриаксон	S	S	S		S
4022	цефтриаксон	S			S	
2731	цефтриаксон	R/I				R/I
3059	цефтриаксон	S		S	S	
3255	цефепим	S	S			S
75	цефепим	S	S	S		S
4022	цефепим	S			S	
2731	цефепим	R				R
3059	цефепим	S		S	S	
3255	ампициллин	R	R			R
75	ампициллин	S	S	S		S
4022	ампициллин	R			R	
2731	ампициллин	R				R
3059	ампициллин	S		S	S	
3255	цефуроксим	S	S			S
75	цефуроксим	S	S	S		S
4022	цефуроксим	S			S	
2731	цефуроксим	I/S				I/S
3059	цефуроксим	S		S	S	

Примечание: R - резистентный, I - умеренно-резистентный, S - чувствительный штамм

Полученные результаты свидетельствовали о том, что до и после совместного культивирования штаммов *S. aureus* и *P. mirabilis* с бактериофагами,

значения диаметров зон задержки роста бактерий находились в пределах своей категории: «чувствительный», «умеренно-резистентный» и «резистентный».

Таблица 19 - Чувствительность бактерий *P. mirabilis* к АМП до и после культивирования с бактериофагами

Антибиотики	Чувствительность культур до и после взаимодействия с фагом:							
	№ штамма	P16-2532		2207-№ 35		№ штамма	PRO-1	
		до	после	до	после		до	после
ципрофлоксацин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
ципрофлоксацин	2482	S	S	-	-	2133	R	R
ципрофлоксацин	2350	R	R	-	-	2906	R	R
ципрофлоксацин	2762	S	S	-	-	2394	R	R
ципрофлоксацин	2848	R	R	-	-	2243	R	R
амикацин	2111	R	R	S	S	3299	S	S
амикацин	2482	S	S	-	-	2133	S	S
амикацин	2350	S	S	-	-	2906	S	S
амикацин	2762	S	S	-	-	2394	S	S
амикацин	2848	S	S	-	-	2243	R	R
имипенем	2111	S	S	S	S	3299	S	S
имипенем	2482	S	S	-	-	2133	S	S
имипенем	2350	S	S	-	-	2906	S	S
имипенем	2762	S	S	-	-	2394	S	S
имипенем	2848	S	S	-	-	2243	S	S
меропенем	2111	S	S	S	S	3299	S	S
меропенем	2482	S	S	-	-	2133	S	S
меропенем	2350	S	S	-	-	2906	S	S
меропенем	2762	S	S	-	-	2394	S	S
меропенем	2848	S	S	-	-	2243	S	S
норфлоксацин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
норфлоксацин	2482	S	S	-	-	2133	R	R
норфлоксацин	2350	R	R	-	-	2906	R	R
норфлоксацин	2762	S	S	-	-	2394	R	R
норфлоксацин	2848	R	R	-	-	2243	R	R
ампициллин	2111	R	R	R	R	3299	R	R
ампициллин	2482	S	S	-	-	2133	R	R
ампициллин	2350	R	R	-	-	2906	R	R
ампициллин	2762	S	S	-	-	2394	R	R
ампициллин	2848	R	R	-	-	2243	R	R
цефтазидим	2111	I/S	I/S	I/R	I/R	3299	S	S
цефтазидим	2482	S	S	-	-	2133	I/R	I/R
цефтазидим	2350	I/R	I/R	-	-	2906	I	I
цефтазидим	2762	S	S	-	-	2394	I/R	I/R
цефтазидим	2848	I/S	I/S	-	-	2243	I/S	I/S
цефотаксим	2111	I/R	I/R	I/R	I/R	3299	I/R	I/R
цефотаксим	2482	S	S	-	-	2133	R	R
цефотаксим	2350	R	R	-	-	2906	R	R
цефотаксим	2762	S	S	-	-	2394	R	R
цефотаксим	2848	R	R	-	-	2243	R	R

Продолжение таблицы 19

амоксциллин/ клавулановая к-та	2111	R	R	R	R	3299	R	R
амоксциллин /клавулановая к-та	2482	S	S	-	-	2133	R	R
амоксциллин /клавулановая к-та	2350	R	R	-	-	2906	R	R
амоксциллин /клавулановая к-та	2762	S	S	-	-	2394	R	R
амоксциллин /клавулановая к-та	2848	R	R	-	-	2243	S	S
тобрамицин	2 111	R	R	R	R	3299	R	R
тобрамицин	2 482	S	S	-	-	2133	R	R
тобрамицин	2 350	R/I	I/R	-	-	2906	R	R
тобрамицин	2 762	S	S	-	-	2394	R	R
тобрамицин	2 848	R	R	-	-	2243	R	R

Примечание: R - резистентный, I - умеренно-резистентный, S - чувствительный штамм

Распределение данных диаметров зон задержки роста под влиянием АМП определялось с помощью критериев Шапиро-Уилка ($n < 50$) и Колмогорова-Смирнова ($n > 50$). Если достигнутый уровень значимости меньше 0,05, то распределение отличалось от нормального.

Количественные значения зон подавления роста бактерий до и после взаимодействия с вирулентными бактериофагами в разрезе каждого антимикробного препарата представлены в виде медиан, верхнего и нижнего квартилей Q1 и Q3 (Таблица 20, 21).

Таблица 20 – Анализ влияния вирулентных бактериофагов на изменение диаметров задержки роста бактерий *S. aureus*

Антибиотик	Диаметры зон задержки роста бактерий до и после взаимодействия с фагами, Ме [Q1-Q3]		p
	до	после	
оксациллин	18,1 [8,4-21,4]	17,9 [8,7-22,1]	0,180
эритромицин	24,6 [17,2-25,1]	24,1 [17,2-24,5]	0,577
клиндамицин	26,7 [26,4-28,1]	26,2 [25,5-27,3]	0,285
гентамицин	24,1 [23,4-24,3]	23,5 [22,9-23,8]	0,083
норфлоксацин	23,7 [15,05-27,5]	25,1 [14,9-26,8]	1,00
цефтриаксон	24,8 [18,7-25,6]	24,1 [19,05-24,8]	0,285
цефепим	20,4 [16,2-21,7]	21,6 [17,1-21,9]	0,593
ампициллин	18,2 [14,6-34,7]	18,2 [15,1-34,5]	0,317
цефуроксим	26,8 [20,8-27,8]	26,5 [21,5-27,6]	0,593

Проведение статистических расчетов влияния бактериофагов на чувствительность изолятов *P. mirabilis* к антибиотикам показало отсутствие достоверной разницы.

Таблица 21 – Статистические данные о влиянии вирулентных бактериофагов на изменение диаметров задержки роста бактерий *P. mirabilis*

Антибиотик	Диаметры зон задержки роста бактерий до и после взаимодействия с фагами, Ме [Q1-Q3]		p
	до	после	
ципрофлоксацин	0,00 [0,0-33,7]	0,00 [0,0-34,4]	0,180
амикацин	20,7 [1,1-26,0]	20,8 [1,3-25,4]	0,173
имипенем	30,6 [2,6-30,8]	30,8 [20,3-33,1]	0,225
меропенем	30,9 [29,2-32,8]	30,0 [29,0-31,1]	0,225
норфлоксацин	30,1 [14,2-31,2]	30,6 [14,3-32,3]	0,273
ампициллин	0,00 [0,0-29,9]	0,00 [0,0-30,6]	0,180
цефтазидим	0,00 [9,0-25,5]	0,00 [0,0-26,4]	0,180
цефотаксим	24,2 [9,0-29,5]	23,1 [8,6-30,6]	0,715
амоксициллин/ клавулановая кислота	18,6 [6,6-26,6]	18,7 [7,2-27,1]	0,343
тобрамицин	5,6 [2,6-22,2]	10,0 [0,9-22,0]	1,00

Для оценки изменения чувствительности штаммов *S. aureus* к АМП под влиянием вирулентных бактериофагов использован непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок (Таблица 22).

Таблица 22 - Статистическая значимость зоны задержки роста бактерий *S. aureus* до и после взаимодействия с вирулентными бактериофагами (критерий Вилкоксона, p)

Штамм	3255		75			4022	2731	3059	
Бактериофаг	П15/ 4037	Н159/ 4040	П15/ 4037	Н125/ 4037	Н159/ 4040	Sa30	Н159/ 4040	Н125/ 4037	Sa30
оксациллин	1,000	0,655	0,655	1,000	0,593	0,593	1,000	0,593	0,285
эритромицин	0,102	0,414	0,285	0,564	1,000	0,109	0,109	0,655	0,655
клиндамицин	0,109	0,109	0,593	0,593	0,285	0,285	0,180	0,785	0,157
гентамицин	0,655	0,785	0,593	0,655	0,285	0,180	0,285	0,285	0,102
норфлоксацин	0,180	0,180	0,785	0,655	0,593	1,000	0,180	0,276	1,000
цефтриаксон	0,285	0,655	1,000	1,000	0,593	0,109	0,285	0,108	0,108
цефепим	0,655	0,276	0,157	0,655	0,102	0,593	0,109	0,285	0,109
ампициллин	1,000	0,593	0,180	1,000	0,285	1,000	0,180	0,180	0,109
цефуроксим	0,180	0,593	0,593	0,285	0,109	1,000	0,180	0,317	0,109

Сравнение диаметров зон задержки роста бактерий *P. mirabilis* под влиянием противомикробного препарата до и после взаимодействия штаммов с вирулентными бактериофагами показало незначительные изменения, проанализированные статистическими методами (Таблица 23).

Таблица 23 - Статистическая значимость зоны задержки роста бактерий *P. mirabilis* до и после взаимодействия с вирулентными бактериофагами (критерий Вилкоксона, р)

Бактериофаг	P16-2532					2207-№35
Штамм	2111	2482	2350	2762	2848	2111
ципрофлоксацин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
амикацин	0,317	0,785	1,000	0,109	0,285	0,102
имипенем	0,109	1,000	0,414	0,593	1,000	0,593
меропенем	0,109	0,109	0,593	0,593	1,000	1,000
норфлоксацин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
ампициллин	1,000	0,785	1,000	0,285	1,000	1,000
цефтазидим	0,593	0,180	0,180	0,593	1,000	1,000
цефотаксим	1,000	0,276	0,180	1,000	0,655	0,285
амоксациллин/ клавулановая кислота	1,000	0,655	1,000	0,109	1,000	0,285
тобрамицин	1,000	0,285	0,593	0,447	0,655	1,000
Бактериофаг	PRO-1					
Штамм	3299	2133	2906	2394	2243	-
ципрофлоксацин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
амикацин	1,000	0,785	1,000	0,785	0,655	-
имипенем	0,109	0,109	0,109	0,593	0,109	-
меропенем	0,285	0,593	1,000	0,180	0,109	-
норфлоксацин	1,000	0,655	1,000	1,000	1,000	-
ампициллин	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-
цефтазидим	0,285	0,180	0,317	0,285	0,285	-
цефотаксим	0,593	0,180	0,593	0,655	0,593	-
амоксациллин / клавулановая кислота	1,000	0,655	1,000	0,593	0,180	-
тобрамицин	1,000	1,000	0,785	0,180	1,000	-

Анализ влияния бактериофагов на бактерии *S. aureus* и *P. mirabilis* показал, что значения чувствительности штаммов к АМП до и после сокультивирования с вирулентными бактериофагами не обладали статистической значимостью.

4.3. Литическая активность бактериофагов, используемых для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии

Микрофлора кишечника является важным фактором, способствующим нормальному развитию и функционированию организма человека. На современном этапе проблема микроэкологических нарушений, связанная с колонизацией кишечника условно-патогенными и патогенными микроорганизмами, сохраняет одно из лидирующих мест в заболеваемости населения. Этиологическим лечением и профилактикой бактериальных ОКИ (острых кишечных инфекций) являются бактериофаги.

В рамках программы, направленной на обеспечение здорового образа жизни населения, проведено региональное изучение литических особенностей коммерческих фагосодержащих препаратов в отношении бактериальных культур семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих на территории города Тюмени и юга Тюменской области, способных вызывать различные инфекционные заболевания. Литические свойства лекарственных средств учитывались с помощью метода на плотной питательной среде «под каплей бактериофага», интенсивность лизиса бактерий «++++» и «+++» креста, свидетельствовала о высокой литической способности бактериофага.

Литическая активность сальмонеллезного бактериофага обеспечивала лизис почти 100 % исследованных культур бактерий рода *Salmonella*, серологические варианты представлены в таблице 24.

Пиобактериофаг поливалентный проявлял антибактериальный эффект в отношении $70,59 \pm 1,9$ % штаммов *E. coli*, при этом колипротейный бактериофаг только в $55,24 \pm 1,44$ % случаев ($p < 0,001$). Зарегистрированные отличия по чувствительности культур *E. coli*, характеризующиеся лактозонегативными и гемолитическими свойствами, обладали статистической разницей. Изучение *E.*

coli с выраженными патогенными свойствами (ОКА серогруппы), идентифицированных по соматическому О-антигену и поверхностному К-антигену, показало активность исследуемых бактериофагов в 70 % случаев.

Таблица 24 – Серологические группы бактерий рода *Salmonella*, выделенные из содержимого толстой кишки от амбулаторных пациентов с острыми кишечными инфекциями (абсолютные числа)

Серологические группы	Серологические варианты	всего
В	<i>S. san-diego</i>	1
	<i>S. essen</i>	1
	<i>S. typhimurim</i>	25
C1	<i>S. isangi</i>	4
	<i>S. mission</i>	1
	<i>S. oranienburg</i>	1
	<i>S. infantis</i>	20
	<i>S. montevideo</i>	2
	<i>S. braenderup</i>	2
C2	<i>S. muenchen</i>	4
	<i>S. manhattan</i>	2
	<i>S. hidalgo</i>	1
	<i>S. newport</i>	1
	<i>S. litchfield</i>	1
C3	<i>S. virginia</i>	1
E1	<i>S. islington</i>	1
	<i>S. amsterdam</i>	1
D1	<i>S. enteritidis</i>	114
<i>Salmonella</i> редких групп		1
Всего	18 серотипов	184

Бактерии рода *Klebsiella* (*K. pneumoniae* и *K. oxytoca*) проявили чувствительность почти в 35 % к пиобактериофагу поливалентному и клебсиелл поливалентному в 28 % случаев. Установлено, что активность пиобактериофага в отношении бактерий рода *Proteus* чуть выше по сравнению с колипротейным бактериофагом, лизис культур определен в 47 % и 32 % случаев соответственно, но статистически значимых отличий не выявлено (Таблица 25). Выявлены статистически достоверные различия при сравнительном анализе литической активности бактериофагов различных родов семейства *Enterobacteriaceae*. Так,

литические свойства вирионов были в 2 раза меньше к изолятам бактерий *Klebsiella spp.* и *Proteus spp.*, чем к *E. coli* с различными биохимическими свойствами и антигенной структурой ($p < 0,001$).

Таблица 25 - Литическая активность бактериофагов в отношении различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*

Виды бактерий	Бактериофаги							
	Сальмонеллезный ¹		Колипротейный ¹		Пиобактериофаг поливалентный ²		Клебсиелл поливалентный ²	
	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %
<i>Salmonella spp.</i>	184	100	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> ОКА групп	-	-	114	72,8±4,2	23	78,3±8,6	-	-
<i>E. coli</i> (gem+)	-	-	525	58,1±2,2*	269	74,4±2,7*	-	-
<i>E. coli</i> (lac-)	-	-	554	50,4±2,1*	286	66,8±2,8*	-	-
<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	-	35	34,3±8,0	179	30,7±3,5
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	-	-	151	35,1±3,9	635	26,8±1,8
<i>Proteus spp.</i>	-	-	77	32,4±5,3	21	47,6±10,9	-	-

Примечание: * - наличие статистически достоверных различий; производитель бактериофагов ¹ - г. Н. Новгород, ² - г. Уфа

Штаммы *E. coli* с патогенными свойствами и различной антигенной структурой распределены по серогруппам (Таблица 26). Наиболее частыми возбудителями ОКИ бактериальной этиологии явились *E. coli* ОКД и ОКЕ групп. Детальное рассмотрение показало, что в ОКД группе 38 изолятов (из 40 штаммов) представлены *E. coli* O25. Из группы ОКЕ наиболее часто были идентифицированы *E. coli* O144 - 36 штаммов. В пятерку лидеров по частоте встречаемости вошли штаммы O151 (ОКЕ серогруппа), O1, O26 (ОКВ серогруппа).

Сравнительная характеристика литических свойств коммерческих фагосодержащих препаратов в отношении *E. coli* с выраженными патогенными свойствами представлена в таблице 26.

Таблица 26 - Сравнительная характеристика чувствительности серотипов *E. coli* к бактериофагам

ОК группы <i>E. coli</i>	Колипротейный бактериофаг ¹		Пиобактериофаг поливалентный ²	
	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %	Число штаммов	Чувствительность к фагу, %
ОКВ (O20:K84; O26:K60; O55:K59; O111:K58)	10	50,0 ± 16,7	3	100,0
ОКС (O33:K; O86:K61; O119:K69; O125:K70; O126:K71; O128:K67)	10	70,0 ± 15,3	3	66,7 ± 33,3
ОКД (O18:K77; O25:K11)	40	77,5 ± 6,6	-	-
ОКЕ (O124:K72; O142:K86; O144:K-; O151:K)	41	68,3 ± 7,3	15	73,3 ± 11,9
O1	9	100,0	2	100,0
Прочие (O28, O29, O32, O152)	4	75,0 ± 25,0	-	-

Примечание: производитель бактериофагов ¹ - г. Н. Новгород, ² - г. Уфа

Исследуемые бактериофаги проявляли литические свойства от 66,7 до 100,0 % случаев. Исключение составил колипротейный бактериофаг (производство Нижний Новгород). Вирионы были активны в отношении *E. coli* ОКВ серогруппы в 50 %. Низкая чувствительность серогруппы обусловлена бактериями *E. coli* O26. Данный возбудитель ОКИ отмечен как наиболее часто встречаемый серотип, лизис бактерий под влиянием бактериофага наблюдался в 25 % случаев (Рисунок 20).

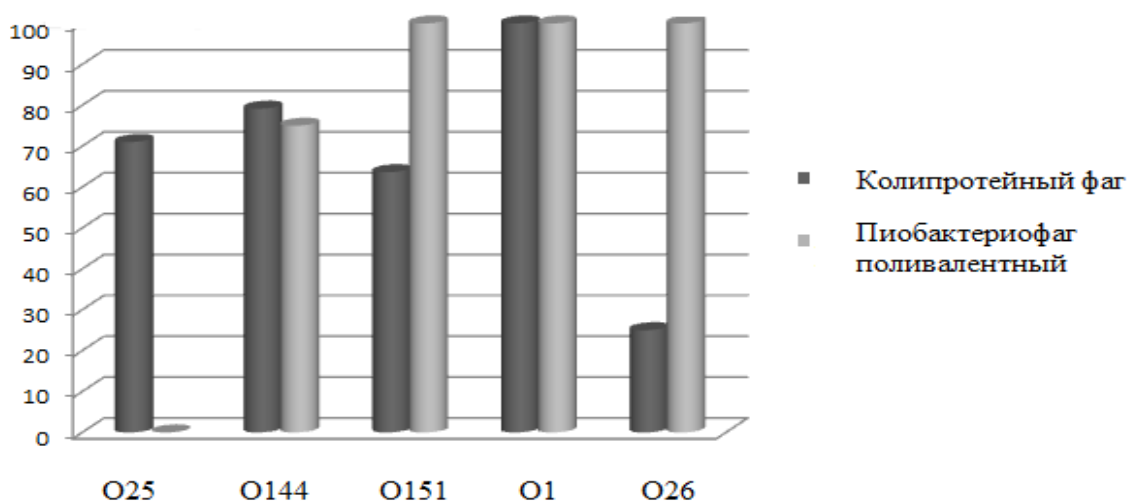


Рисунок 20 - Чувствительность штаммов *E. coli* некоторых серогрупп к бактериофагам

4.4. Сравнительная характеристика литической активности бактериофагов при исследовании на плотной и в жидкой питательных средах

Исследование литической активности различных фагосодержащих лекарственных препаратов проводилось на плотной (1,5 % мясо-пептонный агар) [106] и в жидкой (мясо-пептонный бульон) [28] питательных средах. Чувствительность бактериальной культуры к бактериофагу изучалась двумя методами одновременно.

Метод постановки «под каплей» бактериофага на плотной питательной среде определил, что интести-бактериофаг, пиобактериофаг комплексный и поливалентный, стафилококковый бактериофаг по-разному проявляли литическую активность к бактериям *S. aureus*. Достоверное отличие установлено по пиобактериофагу поливалентному. Изоляты бактерий показали к нему большую устойчивость, чем к интести-бактериофагу и стафилококковому фагам (Таблица 27).

Таблица 27 - Устойчивость бактерий *S. aureus* к бактериофагам при определении на мясо-пептонном агаре

Бактериофаги	Число культур	Устойчивость штаммов к фагам, %	95 % ДИ	Т критерий оценки значимости различий средних			
				1	2	3	4
Стафилококковый ³	159	27,7	[20,60 - 34,80]	-	3,06	0,16	1,41
Пиобактериофаг поливалентный ²	99	46,5	[36,47 - 56,53]	3,06	-	3,19	1,01
Интести-бактериофаг ¹	156	26,9	[19,80 - 34,00]	0,16	3,19	-	1,52
Пиобактериофаг комплексный ¹	55	38,2	[25,10 - 51,30]	1,41	1,01	1,52	-

Примечание: статистически значимые различия выделены жирным шрифтом; производитель бактериофагов ¹ - г. Н. Новгород, ² - г. Уфа, ³ - Пермь

Оценка литических свойств бактериофагов в жидкой питательной среде указала на более высокую устойчивость бактериальных культуры *S. aureus* к стафилококковому фагу и пиобактериофагу комплексному по сравнению с пиобактериофагом поливалентным, достоверность подтверждена статистическим анализом дискретных данных и таблицами сопряженности (Таблица 28).

Таблица 28 - Устойчивость бактерий *S. aureus* к бактериофагам при определении в мясо-пептонном бульоне

Бактериофаги	Число культур	Устойчивость штаммов к фагам, %	95 % ДИ	Т критерий оценки значимости различий средних			
				1	2	3	4
Стафилококковый ³	165	37,6	[30,66 - 45,14]	-	2,35	1,76	0,37
Пиобактериофаг поливалентный ²	103	24,3	[15,85 - 32,75]	2,35	-	0,76	2,13
Интести-бактериофаг ¹	165	28,5	[21,47 - 35,53]	1,76	0,76	-	1,65
Пиобактериофаг комплексный ¹	62	40,3	[27,84 - 52,76]	0,37	2,13	1,65	-

Примечание: статистически значимые различия выделены жирным шрифтом;
производитель бактериофагов ¹- г. Н. Новгород, ² – г. Уфа, ³ - Пермь

Количество устойчивых штаммов *S. aureus* к пиобактериофагу поливалентному с использованием питательного агара составляло 46,5 %, а в случае применения жидкой среды - 24,3 % (Таблицы 27, 28). При расчете отношения шансов зарегистрированы различия между применяемыми методами. Так, шансы литической способности бактериофагов с оценкой на плотном агаре в 2,7 раза меньше, чем в питательном бульоне, а с учетом 95 % ДИ установленные пределы колебания составили от 1,5 до 4,9 раз.

Культуры бактерий *K. pneumoniae* были исследованы с использованием различных консистенций питательных сред по методам, предложенным Л. М. Майской [106] и М. О. Биргер [28]. Постановка метода на мясо-пептонном агаре показала наиболее высокую устойчивость бактерий к пиобактериофагу поливалентному по сравнению с фагом клебсиелл пневмонии, установленная разница подтверждена с помощью t-критерия (Таблица 29).

Таблица 29 - Устойчивость бактерий *K. pneumoniae* к бактериофагам при определении на мясо-пептонном агаре

Бактериофаг	Число культур	Устойчивость штаммов к фагам, %	95 % ДИ	Т критерий оценки значимости различий средних		
				1	2	3
Клебсиелл пневмонии ³	62	67,7	[55,8 - 79,6]	-	1,06	2,01
Клебсиелл поливалентный ²	59	76,3	[65,2 - 87,4]	1,06	-	0,97
Пиобактериофаг поливалентный ²	49	83,7	[73,2 - 94,3]	2,01	0,97	-

Примечание: статистически значимые различия выделены жирным шрифтом;
производитель бактериофагов ² – г. Уфа, ³ - Пермь

Отсутствие литической способности бактериофага клебсиелл пневмонии на мясо-пептонном бульоне определено в отношении 24,2 % культур *K. pneumoniae*. Следует отметить, что в соответствии со статистическими критериями оценки, достоверно установлено, что количество бактерий, не подвергшихся лизису, отличалось при применении фага клебсиелл пневмонии и клебсиелл поливалентного (Таблица 30).

Таблица 30 - Устойчивость бактерий *K. pneumoniae* к бактериофагам при определении в мясо-пептонном бульоне

Бактериофаг	Число культур	Устойчивость штаммов к фагам, %	95 % ДИ	Т критерий оценки значимости различий средних		
				1	2	3
Клебсиелл пневмонии ³	62	24,2	[13,3 -35,1]	-	2,01	0,65
Клебсиелл поливалентный ²	59	15,3	[5,9 - 24,7]	2,01	-	0,54
Пиобактериофаг поливалентный ²	52	19,2	[8,3 - 30,1]	0,65	0,54	-

Примечание: статистически значимые различия выделены жирным шрифтом; производитель бактериофагов² – г. Уфа, ³ - Пермь

Расчет отношения шансов с учетом 95 % доверительного интервала показал, что частота определения устойчивых штаммов *K. pneumoniae* к бактериофагу клебсиелл пневмонии на плотной питательной среде от 3,0 до 14,5 раз выше, чем в жидкой питательной среде. Для бактериофага клебсиелл поливалентного и пиобактериофага поливалентного эти показатели составили от 7,0 до 45,0 и от 7,7 до 60,0 соответственно.

Полученные данные о расхождениях при оценке фагоустойчивости бактериальных штаммов указывали на разночтения применяемых методик, а также на различия в маточном составе бактериофаговых лекарственных препаратов.

Резюме. Предварительное (скрининговое) исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП установило формирование резистентности штаммов *S. aureus* к гентамицину. Бактерии рода *Klebsiella* после инкубирования с гомологичными бактериофагами продемонстрировали увеличение количества изолятов, чувствительных к тетрациклину. Серия дополнительных экспериментов с соблюдением количественного соотношения

вирулентных монобактериофагов и бактериальных культур показала отсутствие влияния бактериофагов на зоны подавления роста изолятов под действием АМП.

Изучение чувствительности бактериальных возбудителей ОКИ к коммерческим бактериофагам выявило эффективность применения сальмонеллезного бактериофага. Пиобактериофаг поливалентный и колипротейный лизировал около 70 % штаммов *E. coli*, обладающих патогенным потенциалом (ОКА групп), за исключением серовара *E. coli* O26. Установлены особенности пиобактериофага поливалентного и колипротейного фага, свидетельствующие о наличии в составе лекарственных препаратов в большей степени количества вирионов, обладающих литическими свойствами преимущественно к *E. coli*. Кроме того, в проведенном исследовании пиобактериофаг поливалентный показал высокий уровень литической активности по сравнению с колипротейным фагом по отношению к бактериям *E. coli* с различными биохимическими свойствами (лактозонегативные и гемолитические).

Сравнение количества устойчивых бактериальных культур *S. aureus* в жидких и на плотных питательных средах в отношении пиобактериофага поливалентного и изолятов *K. pneumoniae* по всем изучаемым бактериофагам показало достоверные отличия. Расчет отношения шансов показал меньший уровень литической активности указанных бактериофагов на плотном питательном агаре. Это свидетельствует о несовершенстве существующих методов определения чувствительности бактерий к фагам и выдвигает приоритетную задачу разработки способа с оценкой результата литической активности в количественных значениях.

ГЛАВА 5. Разработка способа количественной оценки литической активности бактериофагов

В настоящее время известны несколько вариантов оценки литической активности бактериофагов. Способ, предложенный Г. Е. Афиногеновым [125], предполагает использование клеток эмбриона человека для несколько часового совместного культивирования бактериофага и бактериальных культур. Интерпретация активности бактериофага основывается на сравнении степени адгезии изучаемых бактерий к клеткам монослоя в опытном и контрольном образцах. Проведение экспериментальной части метода формируется в условиях максимально приближенных к естественным. Для этого необходимы дорогостоящие материалы: клетки эмбриона человека, богатая аминокислотами питательная среда Игла, пробирки Лейтона. Кроме того, достижение результатов является трудозатратным процессом.

Существует метод определения литической активности бактериофагов основанный на изучении лизиса бактериальных культур под каплей фагового лизата («spot-test»). На плотном питательном субстрате засевадается сегмент бактериальной культуры, а затем наносится капля бактериофага. В модификациях авторов представлены некоторые особенности постановки и оценки результатов взаимодействия микроорганизмов. В статьях Н. В. Алексаниной представлена оценка степени лизиса бактерий под действием фага: высокая «++++» и «+++» креста, на чашках наблюдалось отсутствие роста бактерий или незначительное количество вторичного роста, низкая «++» и «+» - полусливной рост бактерий или регистрация от 50 до 10 негативных колоний бактериофага и отрицательная степень - в случае сливного роста изолятов бактериальных штаммов [6].

Рассмотрение алгоритма постановки метода, предложенного Л. М. Майской, показало необходимость подготовки культуры в соответствии со стандартизованным отраслевым стандартом мутности. Кроме того, в интерпретации результатов имелась градация «умеренная чувствительность бактерий с оценкой «++» креста, а в случае данного результата допускалось использование лекарственного препарата [106].

Требования МР «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике» более подробно описывают постановку выше указанных вариантов метода, при этом оценка результатов осуществляется также в системе крестов. Допускается использование лечебного препарата, обладающего литической активностью не менее «++++» креста [153].

Имеются основания полагать, что использование плотных питательных сред в полной мере не обеспечивает процессы хемотаксиса микроорганизмов, по сравнению с полужидкой или жидкой фазой среды. Кроме того, необходимо учитывать гетерогенность популяции бактерий и их способность включать генетически детерминированные механизмы выживания в неблагоприятных условиях окружающей среды с формированием некультивируемых форм, что касается использования бактериофагов только с оценкой литической активности на «++++» креста. При этом отсутствие четких цифровых значений в интерпретации «+++» креста вносит субъективизм при выдаче результата бактериологического исследования.

Метод, предложенный М. О. Биргером, основан на изучении мутности питательной среды при взаимодействии вируса и бактерии. Результат активности и специфичности вирионов оценивается путем визуального сравнения исследуемого образца с контрольным [28].

Сравнение литического действия вирионов с использованием различных методов лабораторного исследования указало на разночтения результатов (метод М. О. Биргера [28] и Л. М. Майской [106]). Отсутствие достоверной и полной информации о диагностической эффективности бактериофагов затрудняет терапию инфекционных заболеваний, хотя фагосодержащие препараты являются востребованными на сегодняшний день, и ставит перед исследователями задачи по разработке новых методов диагностики.

Количественный метод определения бактериофагов по Грациа [33] широко применяется в научных исследованиях для определения числа фагов в единице объема. Для использования его в рутинной практике требуется значительный

расход питательных сред, метод весьма трудозатратный и нуждается в наработке определенных навыков в постановке испытания.

С целью совершенствования методов определения чувствительности бактерий к бактериофагам нами предложен способ количественной оценки литической активности бактериофагов. В его основе лежит измерение оптической плотности (ОП) среды взаимодействия бактерий и бактериофагов, и регистрация нарастания бактериальной массы в цифровых значениях.

Определение ОП и чувствительности бактерий к бактериофагам проводили на приборе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Он позволяет быстро и с высокой точностью осуществить измерения: скорость регистрации результатов в 96 - луночном планшете занимает 6 секунд. Для постановки способа можно использовать модель с инкубатором, поддерживающим необходимую температуру и возможностью чтения 384-луночных планшетов. Запатентованная конструкция оптической системы Multiskan FC обеспечена функцией автоматической калибровки, которая выполняется во время каждого измерения, что гарантирует воспроизводимость результатов и стабильность работы. Встроенное программное обеспечение позволяет представлять результаты в удобном для пользователя виде. Разрешение прибора составляет - 0,001 единицы ОП. Для обеспечения надежного функционирования фотометра выполняется проверка его основных функций: положение планшета, стабильность измерений, работа лампы, фильтров, оптической системы, термостата и электроники перед началом работы.

Постановку опыта осуществляли в плоскодонных планшетах для иммуноферментного анализа, где в мясо-пептонном бульоне соединяли бактериальную взвесь и специфический бактериофаг. Разность значений многократного измерения ОП опытного образца и ОП стерильной питательной среды указывала на результат взаимодействия фагосодержащего препарата и микроорганизма. Дополнительно проводили постановку контролей: контроль стерильности бактериофага и контроль ростовых свойств бактериальной культуры.

Для реализации поставленной задачи из суточной культуры готовили гомогенизированный инокулят с ОП 0,5 ЕД по McFarland Standart ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). В ячейки для проведения испытания вносили 150 мкл мясо–пептонного бульона (г. Оболенск, Россия), 50 мкл изучаемого бактериофага, а также 20 мкл суспензии бактериальной культуры. Постановку осуществляли пятикратно (ячейки А, В, С, D, Е). Для числового значения фона ОП мутности исходных растворов 150 мкл питательной среды соединяли с 50 мкл изучаемого бактериофага (ячейка F). Одновременно эта лунка служила в качестве контроля стерильности фагового лизата. Исследование контроля роста бактерий также выполняли в 150 мкл питательной среды с добавлением 20 мкл инокулята бактериальных штаммов (ячейки G и H). Предотвращение высыхания среды обеспечивали покрытием микропланшета пленкой на клеевой основе, далее его инкубировали в течение 10-12 ч при температуре + 37° С (Таблица 31).

Таблица 31 - Алгоритм определения количественной оценки литической активности бактериофагов

А	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	Определение показателя литической активност бактериофага
В	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	
С	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	
D	150 мкл бульон, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	
Е	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	
F	150 мкл бульона 50 мкл бактериофага	контроль стерильности и ячейка для измерения фоновой ОП
G	150 мкл бульона 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	контроль роста испытуемого микроорганизма
H	150 мкл бульона 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	контроль роста испытуемого микроорганизма

По истечении данного периода защитную пленку удаляли, планшет устанавливали для считывания в фотометр Multiscan. Использовали диапазон волны 450/620 нм, подобранный экспериментальным путем. Показатель литической активности (ЛА) рассчитывали по формуле: вычисляли среднее значение пяти показателей оптической плотности (ОП среднее) - в лунках А, В, С, D, Е и вычитали оптическую плотность фона среды (ОП фона) – лунки F

$$\text{ЛА} = \text{ОП средняя} - \text{ОП фона.}$$

Таким образом, показатель ЛА представлен разницей между ОП питательной среды культивирования бактерий и бактериофагов за вычетом ОП стерильного мясо-пептонного бульона и бактериофага.

Для определения фагоактивности и интерпретации числового показателя ЛА бактериофага по ОП среды культивирования из каждой опытной ячейки микропланшета для иммуноферментного анализа произведён высев на бактериологическую чашку Петри с мясо-пептонным агаром, среду равномерно распределяли с помощью шпателя и подсчитывали количество выросших колоний. В предлагаемом способе при высеве допускается рост единичных колоний, при оценке штамма как чувствительный, так как необходимо учитывать гетерогенность популяции бактерий и способность штаммов включать генетически детерминированные механизмы выживания в неблагоприятных условиях окружающей среды с формированием некультивируемых форм. Некультивируемые формы, сохраняя жизнеспособность, не растут в условиях стресса, но при наступлении благоприятных условий возобновляют пролиферацию. А также возможен эффект псевдолизогении, состояния взаимодействия фаг-хозяин, при котором бактериофаг не может войти в литический или лизогенный цикл развития [225].

Сопоставление результатов количества выросших единичных колоний при высеве из ячеек и измерений ОП позволило определить цифровое значение показателя ЛА бактериофага для испытуемой бактериальной культуры. Исследуемый изолят оценивали, как чувствительный к бактериофагу при

значении показателя ЛА не более $0,045 \pm 0,025$. При этом значение ОП контроля роста микроорганизмов (лунки G, H) должен превышать показатель ОП (средняя) более чем в 2 раза, тогда бактериофаг интерпретировали как обладающий высокой ЛА. При значении выше указанного показателя ЛА – бактериальный штамм считали устойчивым к изучаемому бактериофагу, а его ЛА – низкой. Опыт не учитывался, если ОП фона была более 0,3.

Апробация разработанного способа проводилась на 36 штаммах *S. aureus* и 36 культурах *E. coli*, выделенных от пациентов акушерского стационара. Бактериальную культуру идентифицировали методом масс-спектрометрии, проверяли на чистоту, наращивали на мясо-пептонном агаре в течение суток. Подготавливали инокулят, соответствующий 0,5 ЕД McFarland Standart.

Чувствительность бактерий *S. aureus* определялась к стафилококковому бактериофагу. Применение способа представлено на штаммах: 2891, 2879, 2887, 2917, 2904, 2902, 2898, 2838, 2841, 2929, 2880, 2897. Во все ячейки планшета вносили по 150 мкл мясо-пептонного бульона. Проводили нумерацию исследуемых культур с занесением информации на планшет. В ячейки А, В, С, D, Е, F добавляли фагосодержащий препарат в количестве 50 мкл. Затем ячейки А, В, С, D, Е и G, H – первого столбца планшета контаминировали 20 мкл инокулята штамма *S. aureus* № 2891. В эти же ячейки, но второго столбца планшета вносили суспензию штамма *S. aureus* № 2891 и так далее. Ячейки F являются контролем фона ОП питательной среды и фаголизата, а ячейки G, H контролем ростовых свойств каждой изучаемой бактериальной культуры. Планшет с тестируемыми штаммами покрывали пленкой на клеевой основе, с последующим термостатированием 10-12 ч при $+ 37^{\circ}\text{C}$. Далее защитная пленка удалялась, планшет устанавливался для считывания в фотометр с фильтром 450/620 нм. Результаты определения литической активности фагосодержащего препарата к изолятам *S. aureus* представлены в таблице 32.

Таблица - 32 (микропланшет 1) - Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *S. aureus*

№ штамма	2897*	2891	2879	2887	2917*	2904*	2902	2898	2838	2841	2929	2880
A	0,298	0,206	0,223	0,234	0,432	0,595	0,236	0,235	0,238	0,253	0,229	0,224
B	0,327	0,231	0,222	0,230	0,234	0,372	0,228	0,220	0,299	0,249	0,256	0,226
C	0,304	0,229	0,231	0,231	0,246	0,469	0,239	0,262	0,236	0,240	0,246	0,227
D	0,314	0,242	0,228	0,231	0,243	0,433	0,216	0,227	0,252	0,235	0,236	0,230
E	0,255	0,243	0,237	0,233	0,402	0,251	0,309	0,239	0,267	0,256	0,242	0,234
F ОП фона	0,193	0,204	0,184	0,201	0,192	0,218	0,204	0,200	0,206	0,186	0,201	0,194
G	0,599	0,862	0,902	1,033	0,567	0,585	0,585	0,657	0,602	0,721	0,733	1,260
H	0,695	0,790	0,971	0,953	0,566	0,627	0,499	0,583	0,755	0,616	0,997	0,986
ОПср.	0,299	0,23	0,228	0,23	0,31	0,42	0,245	0,236	0,258	0,247	0,242	0,228
ОПср.- ОП фона	0,106	0,026	0,044	0,029	0,118	0,202	0,041	0,036	0,052	0,061	0,041	0,034
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (A,B,C,D,E) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	230	1	4	15	150	300	35	30	26	28	2	5
B	247	3	5	6	68	250	8	5	28	20	9	7
C	157	2	8	12	100	280	14	7	15	15	8	5
D	170	8	7	14	92	270	3	5	19	11	6	9
E	99	13	12	13	138	102	41	6	7	9	7	10
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (A,B,C,D,E)	180,6	5,4	7,2	10,0	109,6	240,4	20,2	10,6	19,0	16,6	6,4	7,2

Примечание: *- культуры, устойчивые к бактериофагу

Вычисление литической активности бактериофага осуществлялось из расчета среднего значения измерений ОП питательного бульона с культивированными микроорганизмами (бактериальных штаммов и бактериофагов) в пяти повторах – ячейки А, В, С, D, Е за вычетом фоновой мутности мясо-пептонного бульона с фаголизатом - ячейка F.

$$\text{ЛА} = \text{ОП средняя} - \text{ОП фона.}$$

Исследуемую бактериальную культуру оценивали, как чувствительную к бактериофагу при значении показателя ЛА не более $0,045 \pm 0,025$. При этом значение ОП контроля роста штамма (лунки G, H) должны превышать показатель ОП средняя более чем в 2 раза, тогда бактериофаг интерпретировали как обладающий высокой ЛА. При значении показателя ЛА выше указанного ($> 0,07$) - изолят считали устойчивым к изучаемому бактериофагу, а его ЛА - низкой.

Таким образом, штаммы *S. aureus*: 2891, 2879, 2887, 2902, 2898, 2838, 2841, 2929, 2880 - чувствительны к гомологичному бактериофагу, а бактерии 2917, 2904, 2897 - устойчивы к данному фагу и не могут быть рекомендованы в качестве лекарственных средств.

Для расчета пороговых значений оценки ЛА осуществляли высевы из каждой ячейки планшета на питательный агар, субстрат равномерно распределяли по поверхности питательной среды. Чашки инкубировали при $+ 37^\circ\text{C}$ в течение 10 - 12 ч. Проводилась повторная идентификация бактериальных штаммов и подсчет общего количества выросших колоний. Штаммы бактерий, интерпретированные как чувствительные к гомологичному бактериофагу, высевались в единичных количествах, напротив штаммы устойчивые к фагосодержащему препарату характеризовались массивным ростом (Таблица 32).

Аналогичным образом были изучены остальные штаммы *S. aureus*, результаты измерений ОП при исследовании ЛА стафилококкового бактериофага в отношении *S. aureus* и подсчет выросших колоний культур после воздействия бактериофага представлены в таблицах 33, 34.

Таблица - 33 (микропланшет 2) - Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *S. aureus*

№ штамма	4706	4808	2748	4831	4823	2717	2720	2734	2744	4778	4815	4725
A	0,173	0,186	0,19	0,19	0,2	0,23	0,18	0,19	0,23	0,248	0,186	0,19
B	0,19	0,181	0,184	0,19	0,19	0,186	0,181	0,184	0,214	0,192	0,19	0,228
C	0,184	0,184	0,185	0,185	0,182	0,184	0,183	0,186	0,184	0,188	0,19	0,214
D	0,185	0,197	0,185	0,185	0,182	0,184	0,182	0,183	0,185	0,184	0,19	0,190
E	0,184	0,185	0,183	0,186	0,181	0,187	0,18	0,185	0,183	0,184	0,187	0,197
F ОП фона	0,19	0,187	0,191	0,189	0,182	0,191	0,235	0,185	0,183	0,186	0,179	0,189
G	0,412	0,51	0,444	0,513	0,943	0,584	0,796	0,643	0,617	0,665	1,166	0,675
H	0,715	0,678	0,725	0,785	0,663	0,68	0,67	0,316	0,532	0,528	0,742	0,748
ОПср.	0,183	0,187	0,185	0,187	0,187	0,194	0,181	0,186	0,199	0,199	0,189	0,204
ОПср.- ОП фона	-0,007	0,000	-0,006	-0,002	0,005	0,003	0,054	0,001	0,016	0,013	0,010	0,015
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (А,В,С,Д,Е) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	2	2	0	0	5	5	0	1	2	1	0	2
B	2	1	0	0	2	8	1	0	1	3	4	0
C	5	6	1	6	3	6	0	0	0	0	0	2
D	1	10	6	0	8	6	3	5	3	8	1	0
E	5	2	5	0	2	9	2	1	0	0	4	0
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (А,В,С,Д,Е)	3	4,2	2,4	1,2	4	6,8	1,2	1,4	1,2	2,4	1,8	0,8

Примечание: *- культуры, устойчивые к бактериофагу

Таблица - 34 (микропланшет 3) - Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *S. aureus*

№ штамма	2777	2822	2845	2846	2852	4814	2747	2831	2810	2785*	2798	2778
A	0,264	0,211	0,213	0,23	0,217	0,227	0,225	0,221	0,206	0,364	0,2	0,19
B	0,205	0,206	0,202	0,207	0,204	0,204	0,203	0,204	0,203	0,241	0,202	0,251
C	0,208	0,207	0,211	0,211	0,205	0,217	0,209	0,203	0,205	0,205	0,204	0,207
D	0,203	0,205	0,203	0,203	0,204	0,259	0,208	0,208	0,201	0,216	0,202	0,203
E	0,204	0,213	0,215	0,223	0,215	0,225	0,215	0,215	0,212	0,575	0,209	0,245
F ОП фона	0,202	0,205	0,203	0,204	0,203	0,209	0,205	0,21	0,201	0,212	0,201	0,203
G	0,686	0,893	0,507	0,407	0,681	0,721	1,264	1,025	0,671	0,936	0,604	0,811
H	0,861	1,467	0,831	0,745	0,754	0,568	1,496	0,667	0,532	0,868	0,873	0,883
ОПср.	0,217	0,208	0,209	0,215	0,209	0,226	0,212	0,210	0,205	0,320	0,203	0,219
ОПср.- ОП фона	0,015	0,003	0,006	0,011	0,006	0,017	0,007	0,000	0,004	0,108	0,002	0,016
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (A,B,C,D,E) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	2	0	5	5	0	4	2	5	5	122	2	5
B	5	0	5	7	0	4	13	5	2	150	0	22
C	9	5	1	18	0	5	10	4	2	62	2	12
D	15	0	1	0	2	9	18	1	9	90	0	0
E	10	4	4	0	0	11	4	8	4	45	0	21
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (A,B,C,D,E)	8,2	1,8	3,2	6	0,4	6,6	9,4	4,6	4,4	93,8	0,8	12

Примечание: *- культуры, устойчивые к бактериофагу

Результаты ОП, характеризующие ЛА колипротейного бактериофага в отношении микроорганизмов *E. coli*, представлены в таблицах 35, 36, 37.

В соответствии с описанным способом штаммы бактерий *S. aureus* № 4706, 4808, 2748, 4831, 4823, 2717, 2720, 2734, 2744, 4778, 4815, 4725, 2777, 2822, 2845, 2846, 2852, 4814, 2747, 2831, 2810, 2798, 2778 отнесены к чувствительным к стафилококковому бактериофагу, то есть ЛА испытуемого бактериофага была высокой (показатель ЛА в интервале 0,000-0,061 и среднее значение КОЕ/мл - 0,4 до 20,2). Штаммы № 2785 определены как устойчивые к данному фагу (показатель ЛА в интервале 0,106 - 0,202 и среднее значение КОЕ/мл - 93,8 - 240,4), то есть бактериофаг обладал низкой ЛА.

Аналогично оценены бактерии *E. coli* по чувствительности к колипротейному бактериофагу. Штаммы № 2841, 2056, 2907, 2785, 2902, 2785, 2784, 2923, 2908, 2678(3), 2705(2), 2635, 2711, 1115, 2723(5), 2785, 2740(2), 2847, 2758, 1955, 2833, 2785, 2785(1), 2035, 2038, 2036 чувствительны к колипротейному бактериофагу (показатель ЛА в интервале 0,000-0,068 и среднее значение КОЕ/мл - 0,6 до 28,2), а изоляты № 2910, 2920, 2098, 2674, 2704, 2691(2), 2764, 2798, 2827, 2044 устойчивы к данному фагу (показатель ЛА в интервале 0,086-0,40 и среднее значение КОЕ/мл - 135 до 285,0).

Таким образом, разработанный способ количественной оценки литической активности бактериофагов, основанный на измерении оптической плотности среды взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг», позволяет интерпретировать результат взаимодействия в числовых значениях. Для выполнения поставленной задачи необходимо провести выделение и идентификацию бактериальной культуры, контроль ее «чистоты», наращивание биомассы, приготовление суспензии в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл и соединение инокулята со специфическим бактериофагом в мясо-пептонном бульоне с применением иммуноферментных плоскодонных планшетов для дальнейшей их инкубации. Далее для оценки литической активности бактериофага необходимо вычислить среднее значение многократных измерений оптической плотности ячеек, где происходило взаимодействие бактерии

Таблица 35 - (микропланшет 1) Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *E. coli*

№ штамма	2841	2056	2907	2910*	2785	2902	2785	2784	2923	2908	2920*	2098*
A	0,190	0,229	0,201	0,415	0,218	0,221	0,212	0,222	0,208	0,206	0,401	0,286
B	0,207	0,218	0,202	0,520	0,215	0,212	0,205	0,203	0,205	0,206	0,292	0,287
C	0,206	0,221	0,209	0,463	0,261	0,222	0,217	0,282	0,209	0,223	0,315	0,359
D	0,205	0,304	0,221	0,446	0,207	0,225	0,205	0,211	0,239	0,230	0,388	0,301
E	0,209	0,238	0,212	0,329	0,207	0,204	0,210	0,252	0,218	0,231	0,265	0,322
F ОП фона	0,189	0,179	0,177	0,174	0,184	0,180	0,184	0,195	0,201	0,177	0,178	0,182
G	0,849	0,931	0,667	0,602	0,539	0,521	0,498	0,611	0,626	0,875	0,876	1,029
H	0,966	0,866	0,542	0,541	0,934	0,588	0,483	0,585	0,717	1,160	0,910	0,967
ОПср.	0,203	0,242	0,209	0,434	0,222	0,217	0,209	0,234	0,216	0,219	0,332	0,311
ОПср.- ОП фона	0,014	0,063	0,032	0,26	0,038	0,037	0,025	0,039	0,015	0,042	0,154	0,129
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (A,B,C,D,E) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	0	23	1	240	2	2	2	7	1	0	300	155
B	0	9	3	280	0	0	9	0	0	2	180	167
C	0	7	5	300	6	3	3	15	3	0	200	208
D	2	15	7	310	9	7	0	4	11	8	270	188
E	1	18	5	295	3	1	2	13	8	10	110	180
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (A,B,C,D,E)	0,6	14,4	4,2	285,0	4,0	2,6	2,0	7,8	4,6	4,0	212,0	178,3

Примечание: *- культуры, устойчивые к бактериофагу

Таблица - 36 (микропланшет 2) Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *E. coli*

№ штамма	2678(3)	2705(2)	2635	2711	2674*	2704*	2691(2)*	1115	2723(5)	2764*	2785	2740(2)
A	0,185	0,207	0,2	0,19	0,389	0,448	0,542	0,353	0,248	0,324	0,185	0,183
B	0,191	0,209	0,258	0,2	0,458	0,252	0,394	0,217	0,228	0,251	0,186	0,184
C	0,194	0,216	0,208	0,189	0,356	0,254	0,406	0,227	0,197	0,268	0,188	0,186
D	0,197	0,247	0,204	0,189	0,294	0,23	0,422	0,237	0,197	0,252	0,185	0,199
E	0,1994	0,225	0,215	0,185	0,492	0,3	0,452	0,235	0,128	0,256	0,19	0,189
F ОП фона	0,179	0,187	0,188	0,184	0,246	0,185	0,185	0,186	0,183	0,184	0,196	0,185
G	0,781	0,591	0,826	0,53	0,733	0,788	0,674	0,745	0,694	0,894	1,118	0,471
H	0,832	0,6	0,503	1,281	0,758	0,818	0,755	0,568	0,585	1,035	0,622	1,169
ОПср.	0,193	0,221	0,217	0,191	0,398	0,297	0,443	0,254	0,200	0,270	0,187	0,188
ОПср.- ОП фона	0,014	0,034	0,029	0,007	0,152	0,112	0,258	0,068	0,017	0,086	-0,009	0,003
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (А,В,С,Д,Е) и контроль роста культуры без бактериофага (Г,Н)												
A	21	10	22	26	225	280	240	102	15	230	45	12
B	10	15	12	10	180	162	280	5	20	150	15	15
C	15	12	25	2	260	165	300	10	43	80	25	35
D	23	16	26	10	89	150	250	12	12	120	35	12
E	51	23	5	6	145	132	250	12	16	95	11	18
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (А,В,С,Д,Е)	24	15,2	18	10,8	179,8	177,8	264	28,2	21,2	135	26,2	18,4

Примечание: *- культуры, устойчивые к бактериофагу

Таблица 37 - (микропланшет 3) - Определение ОП среды взаимодействия бактериофага и штаммов *E. coli*

№ штамма	2847	2798*	2758	1955	2827*	2833	2785	2785(1)	2044*	2035	2038	2036
A	0,212	0,359	0,243	0,219	0,561	0,229	0,22	0,229	0,528	0,223	0,225	0,22
B	0,223	0,331	0,238	0,224	0,555	0,244	0,217	0,218	0,625	0,215	0,24	0,228
C	0,212	0,312	0,214	0,216	0,39	0,216	0,206	0,209	0,571	0,212	0,212	0,209
D	0,217	0,317	0,21	0,229	0,534	0,219	0,209	0,21	0,716	0,207	0,214	0,211
E	0,222	0,356	0,215	0,222	0,57	0,22	0,204	0,21	0,532	0,215	0,219	0,225
F ОП фона	0,207	0,213	0,212	0,208	0,211	0,208	0,209	0,213	0,207	0,212	0,21	0,209
G	0,612	0,454	0,817	0,724	0,898	0,787	0,739	0,775	1,097	0,594	0,801	0,409
H	1,038	0,638	0,594	0,729	1,141	0,728	0,677	0,888	0,716	0,594	1,078	0,562
ОПср.	0,22	0,335	0,226	0,222	0,51	0,226	0,212	0,217	0,61	0,214	0,222	0,217
ОПср.- ОП фона	0,01	0,12	0,01	0,01	0,30	0,02	0,00	0,00	0,40	0,00	0,01	0,01
Количество выросших колоний (КОЕ/мл) после воздействия бактериофага (A,B,C,D,E) и контроль роста культуры без бактериофага (G,H)												
A	12	250	11	12	190	15	2	5	250	12	2	6
B	0	180	18	10	230	5	1	0	180	0	10	0
C	5	160	0	6	260	25	10	3	150	5	4	0
D	8	196	0	15	250	2	0	2	200	5	6	1
E	0	190	21	2	300	10	12	12	280	3	2	3
F ОП фона	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	С л и в н о й р о с т											
H	С л и в н о й р о с т											
Среднее КОЕ (A,B,C,D,E)	5	195,2	10	9	246	11,4	5	4,4	212	5	4,8	2

Примечание: * - культуры, устойчивые к бактериофагу

и бактериофага, и вычесть оптическую плотность фона компонентов (питательный бульон и бактериофаг). При значении полученного показателя не более $0,045 \pm 0,025$ испытуемый бактериальный штамм оценивается как чувствительный к бактериофагу, при этом значения оптической плотности контроля роста бактерий должны превышать средний показатель оптической плотности более чем в 2 раза, при значении показателя литической активности выше указанного, бактериальный изолят считают устойчивым к исследуемому бактериофагу.

Разработанный способ количественной оценки литической активности бактериофагов обладает рядом преимуществ:

1. Повышение надежности за счет измерения оптической плотности среды взаимодействия бактерии и бактериофага стандартизованным оборудованием, объективности оценки результата исследования и определения цифровых значений литической способности бактериофагов.
2. Использование жидкой питательной среды позволяет максимально активировать процессы хемотаксиса бактериальных культур, а, следовательно, и условий взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг».
3. Простота постановки реакции в условиях лабораторий.
4. Возможность одновременно поставить несколько десятков тестов.
5. Минимальный расход питательной среды (мясо-пептонного бульона) и бактериофага.

«Способ количественной оценки литической активности бактериофагов» защищен патентом на изобретение РФ № 2587636 от 20.06.2016 г.

Разработанный способ обеспечит рациональное использование бактериофагов, достоверное исследование литической активности фагосодержащих препаратов будет способствовать снижению уровня рисков возникновения и распространения инфекционных заболеваний, в том числе, связанных с оказанием медицинской помощи, что позволит оптимизировать систему профилактики и лечения болезней в различных областях здравоохранения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стремительное нарастание резистентности бактериальных возбудителей инфекционных заболеваний к антимикробным препаратам привело к повышенному интересу к бактериофагам для использования их в лечебно-профилактических целях. Изучение популяционных особенностей вирулентных бактериофагов обеспечило представление о безопасности их применения. Бактериофаги оказывают сугубо специфичное действие на бактериальные клетки, обладают иммуногенным действием, характеризуются отсутствием аллергических реакций, побочных эффектов и противопоказаний, не влияют на нормобиоту человека [1, 9, 33, 41, 80, 93, 96, 151, 153, 180].

В связи с различными механизмами действия бактериофагов и АМП, вирионы могут лизировать полирезистентные штаммы бактерий. Имеется опыт использования бактериофагов при борьбе с возбудителями ИСМП [20]. Рассматривая вопрос применения бактериофагов в лечебной деятельности необходимо учитывать большую роль умеренных бактериофагов в формировании субпопуляций бактерий, обладающих патогенным потенциалом [153, 184]. Благодаря обмену генетической информации посредством бактериофагов клональные линии бактериальных культур могут изменять морфологические и токсигенные свойства, а также формировать резистентность к АМП. По данным мировых научных исследований ИСМП поражают в среднем от 5 до 15 % госпитализированных пациентов, а в отделениях высокого риска - до 40 % [131]. В течение последних 10 лет лидирующие места, связанные с заболеваниями при оказании медицинской помощи, продолжают оставлять за собой хирургические стационары и родовспомогательные учреждения [54]. Обеспечение биологической безопасности пациентов при оказании медицинской помощи необходимо построить на проведении противоэпидемических мероприятий при установлении первых признаков перестройки микробных популяций, а не на регистрации заболевания и ликвидации последствий распространения инфекционных болезней [128, 160].

В представленной работе определены предвестники активации процесса формирования резистентности штаммов, обладающие селективными преимуществами выживания в условиях акушерского стационара.

В ходе проведения работы была изучена структура и характеристика микробиоты, циркулирующей в организациях родовспоможения, обусловленная различными подходами к технологии ведения родов и послеродового периода, ориентированной на участие семьи. В исследовании участвовали женщины с физиологической беременностью в сроке более 36 недель (родильницы и роженицы), без соматической патологии и новорожденные, среднее время пребывания которых в родильном доме составляло 4 дня. С целью оценки биологической безопасности оказания медицинской помощи и отличительных особенностей лечебных организаций в течение двух лет проводилось независимое анкетирование родильниц. Определено, что роддом № 2 отличался меньшей приверженностью соблюдения правил, регламентированных РОУС. Установлено, что шансы более агрессивного ведения родов (кесарево сечение, рассечение промежности) были выше, а соблюдение контакта между матерью и ребенком в родовых залах, включая прикладывания к груди, напротив, достоверно ниже, чем в группе пациентов роддома № 3. При этом наиболее выраженные различия обусловлены удельным весом новорожденных, получавших докорм, величина которого в роддоме № 2 была на порядок больше при сравнении с другим стационаром. Установлено, что молочные смеси получали 48 - 63 % новорожденных роддома № 2, а в роддома № 3 - от 5 до 8%.

В основу оценки биологической безопасности оказания медицинской помощи был положен еженедельный микробиологический мониторинг микробиоты новорожденных, родильниц и объектов производственной среды стационаров. Выделенные штаммы бактерий анализировались по резистентности к индикаторным антибиотикам. Установлен период с низким уровнем заболеваемости пациентов родильного дома № 2, с регистрацией минимальной степени резистентности микробиоты, выделенной из смывов, и нарастающей резистентностью штаммов, изолированных от пациентов, но не выходящей за

свои контрольные пределы в соответствии с картой Шухарта. Определено, что показатель резистентности микробиоты обследованных достоверно отличался от изученных штаммов, выделенных из роддома № 3. Статистическая оценка отдельных биотопов выявила максимальные значения резистентности изолятов в содержимом толстой кишки и коже пупочного остатка новорожденных. Скорее всего, контаминация кожи пупочного остатка происходит благодаря частым (до 10 раз в сутки), выделениям из кишечного тракта и гигиеническим процедурами ребенка. Сдвиги в антибиотикограмме бактерий в пищеварительном тракте новорожденных обеспечены большим количеством микроорганизмов, где создаются условия для передачи генетического материала, в том числе и с помощью бактериофагов, и вероятнее всего докорм детей служит одной из причин изменения свойств в популяции бактерий.

Изучение структуры штаммов-предвестников активации процесса формирования патогенного потенциала, с учетом удельного веса, показало становление резистентности бактерий за счет грамотрицательных изолятов. Полученные данные о преобразовании микробиоты новорожденных в межэпидемический период соответствуют сведениям, описанным в литературе [14, 48]. Так, на сегодняшний день наиболее значимыми возбудителями ИСМП являются бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующие грамотрицательные штаммы *P. aeruginosa* и *A. baumannii* [48]. Исследование структуры и локализации источников активации механизмов генерирования вирулентного потенциала штаммов послужат ориентиром для принятия своевременных корректирующих мер, в том числе и использование видоспецифичных литических бактериофагов для лечебно-профилактических целей. Данные о предвестниках эпидемиологического процесса станут вектором целевого применения бактериофагов с привязкой к возбудителю и категории пациента, направленным не на ликвидацию вспышек инфекционных заболеваний, а на этап становления штаммов с селективными свойствами.

Выделены два новых штамма протейных бактериофагов, активных в отношении бактериальных культур *P. mirabilis*, изолированных из акушерского

стационара № 2 г. Тюмени, в период формирования возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Особенности их морфологических свойств, таксономическое положение (порядок хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейство *Siphoviridae*, для *Proteus phage* 2207-№35 род *Gorganvirus*), подтвержденное кладограммой и гомологией множественных полногеномных выравниваний и молекулярно-генетическая структура фаговых геномов, указывающая на отсутствие известных и гомологичных интеграз прокариот и вирусов, определила строго литическую природу полученных бактериофагов. Аннотированные полногеномные последовательности *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№ 35 депонированы в NCBI GenBank под номерами MN840486.1 и MN840487.1. Данные бактериофаги могут быть рекомендованы в качестве производственно-перспективных штаммов.

В литературе указаны сведения о формировании резистентности бактерий к АМП под влиянием фагов [20, 72, 76, 224]. Это диктует необходимость более глубокого изучения вопросов, связанных с применением бактериофагов, как лечебных средств. Геном вирулентных фагов не изучен полностью. Не расшифрованные гены могут кодировать различные функции и участвовать в выработке вспомогательных белков, оказывающие воздействие на физиологию бактерий [190], определяя влияние на чувствительность бактерий к АМП. Кроме того, описаны единичные примеры как синергии при воздействии антибиотиков и бактериофагов на бактерии, так и антагонистического действия [164, 195].

Проведено предварительное (скрининговое) исследование системы «бактериофаг-бактерия» на примере *S. aureus* и штаммов бактерий рода *Klebsiella* в отношении АМП различных групп. Результаты эксперимента с коммерческим стафилококковым фагом показали увеличение количества культур *S. aureus*, резистентных к гентамицину, после сокультивирования бактерий и фагосодержащего лекарственного средства. При изучении влияния бактериофага клебсиелл поливалентного на бактерии рода *Klebsiella* установлены статистически значимые отличия по тетрациклину, их чувствительность к этому антибиотику возросла в 2 раза. Зарегистрированы расхождения с литературными

данными о природной резистентности бактерии рода *Klebsiella* к ампициллину [89]. В ходе экспериментальной части работы зафиксировано снижение количества резистентных штаммов на 9 % после взаимодействия с гомологичным фагосодержащим препаратом.

Для подтверждения рабочей гипотезы о роли фагов в изменении чувствительности бактерий к АМП изучены монолинии штаммов бактериофагов, активных в отношении *S. aureus* и *P. mirabilis* с помощью молекулярной генетики. Установлена литическая природа бактериофагов на основании родоспецифической ПЦР и отсутствия известных интеграз, а также их гомологов: PsP3, P2, Kp6, P21, Lambda и специфичных для стафилококковых фагов Salint – Sa7int [166, 194, 219]. Определена таксономическая принадлежность штаммов фагов *S. aureus* к порядку *Caudovirales*, семейству *Herelleviridae*, подсемейству *Twortvirinae*, роду *Kayvirus*, штаммы протейных бактериофагов относились к порядку хвостатых фагов – *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*, *Proteus phage* 2207-№35 к роду *Gorganvirus*.

Экспериментальная часть работы включала проведение многократной постановки серий исследований с бактериальными штаммами в трех повторах (трехкратный пассаж культур) и подобранными вирулентными монобактериофагами с высокой литической способностью к изучаемым бактериям *S. aureus* и *P. mirabilis*, отслеживанием количественного соотношения бактериофагов и бактериальных культур (титр фага 10^8 БОЕ/мл, бактериальная суспензия 0,5 ЕД по McFarland Standart - $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Такая пропорция (менее одного вириона на бактериальную клетку) позволяет исключить феномен «массивного лизиса извне» и свидетельствует о возможности активного инфицирования бактериофагом бактерий-мишеней. В результате проведенной работы и статистической обработки данных установлено отсутствие влияния вирулентных (строго литических) бактериофагов на чувствительность бактерий к антибиотикам.

Одной из ведущих групп инфекционных патологий остаются ОКИ, обусловившие в 2018 году более 816 тыс. случаев заболеваний в Российской

Федерации (555,71 на 100 тысяч населения) [54]. Значительная часть их вызвана бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Данная группа представлена как патогенными (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *E. coli* с патогенными свойствами), так и условно-патогенными микроорганизмами. Условно-патогенные бактерии широко распространены в окружающей среде и являются резидентными представителями микрофлоры человека. Высокая экологическая пластичность этих бактерий позволяет им легко адаптироваться к различным условиям, формировать штаммы с патогенными свойствами, в том числе и резистентностью к лекарственным препаратам. Проведено изучение литической активности коммерческих фаговых коктейлей, в отношении наиболее этиологически значимых бактериальных возбудителей ОКИ семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих на территории города Тюмени и юга Тюменской области. Результаты исследования показали стопроцентную чувствительность бактерий рода *Salmonella* к сальмонеллезному бактериофагу. Более 70 % штаммов *E. coli* различных ОК серогрупп были лизированы колипротейным и пиобактериофагом поливалентным. Исключением является штамм *E. coli* серовариант O26, чувствительность которого установлена лишь в 25 % случаев к колипротейному бактериофагу. Изоляты *E. coli* с различными биохимическими особенностями были чувствительны к фагосодержащим препаратам в 54 % (колипротейный бактериофаг) и 71 % случаев (пиобактериофаг поливалентный). Около 40 % бактерий рода *Proteus* были лизированы изучаемыми бактериофагами. Литическая активность на «++++» и «+++» креста пиобактериофага поливалентного зарегистрирована в отношении 35 % бактерий рода *Klebsiella* и 28 % изолятов к бактериофагу клебсиелл поливалентному. Следовательно, анализ эффективности лечебных бактериофагов, реализуемых в аптечной сети, выявил низкую чувствительность бактерий родов *Klebsiella*, *Proteus* и *E. coli* O26 к ряду специфических фаговых коктейлей.

Авторы научных исследований отмечают, что литическая активность монофагов равна или выше поливалентных бактериофагов [69, 86, 217]. Изучение литической активности коммерческих фаговых коктейлей, выпущенных

предприятием АО «НПО «Микроген», в отношении бактерий семейства *Enterobacteriaceae* указало на тенденцию более высокой чувствительности бактерий к пиобактериофагу поливалентному по сравнению с более узкоспецифическими фагами, хотя достоверная разница получена только по бактериям *E. coli*, отличающихся биохимическими свойствами. Можно предположить, что присутствие большого числа фаговых частиц в поливалентном бактериофаге интенсифицирует процессы обмена и усиливает его литический эффект. Известно, что некоторые бактериофаги способны проявлять «феномен лизиса извне». Он индуцирован адсорбцией фагов и разрушением оболочки бактериальной клетки с помощью ферментов, находящихся с хвостовой части (лизоцим, лизин). В случае адсорбции значительного количества фагов, может произойти лизис клеток [165]. Безусловно, на эффективность литических свойств фагосодержащих лекарственных средств оказывают влияние титр и количество видоспецифичных фагов, входящих в состав лекарственного коктейля, а также наличие профагов в бактериальной клетке. Установлено, что пиобактериофаг поливалентный содержит почти в два раза больше фаговых вирионов, активных в отношении бактерий *E. coli*, в сравнении с другими изучаемыми видами бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (родов *Klebsiella* и *Proteus*).

С целью уменьшения распространения антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов при проведении исследований следует проводить определение чувствительности бактерий к бактериофагам в каждом конкретном случае и осуществлять тестирование к нескольким видам лекарственных бактериофагов, произведенных на разных площадках страны для подбора оптимального препарата [153].

Определена необходимость многоуровневого мониторинга (локального, регионального, национального) чувствительности патогенных агентов к различным видам бактериофагов. Это даст более широкое представление о чувствительности популяций бактерий к коммерческим фагосодержащим препаратам на разных ступенях. Включение исследования фагорезистентности в мониторинг позволит проводить своевременную актуализацию бактериофагов,

используемых в качестве лекарственных средств. Комплексный подход обеспечит изучение резистентности возбудителей ИСМП к бактериофагам, стратификацию объектов и сопоставление с эпидемиологическими данными.

Проведено сравнительное исследование методов определения литической активности бактериофагов: метод на плотной питательной среде (нанесение капли бактериофага на газон бактериальной культуры) [106] и в бульоне (определение роста культуры по мутности питательного бульона) [28], установлены статистически достоверные отличия. При использовании мясо-пептонного агара для определения литических свойств пиобактериофага поливалентного по отношению к *S. aureus* литическая способность оказались в 2,7 раза меньше, чем при использовании мясо-пептонного бульона. Изучение пиобактериофага поливалентного, бактериофага клебсиелл пневмонии и клебсиелл поливалентного показало более высокие шансы установления фагорезистентности штаммов *K. pneumoniae* при постановке исследования на плотной питательной среде по всем изучаемым фагам. Этот факт свидетельствует о несовершенстве существующих методов определения чувствительности бактерий к фагам. Широкий диапазон данных о чувствительности условно-патогенных бактерий к бактериофагам, представленный в научных изданиях, варьирующий от 28 до 84 %, нацеливает на необходимость оптимизации методов определения [6, 24, 52, 55, 69, 144, 145, 159]. Разработка технологии, позволяющая количественно определять и оценивать литическую активность бактериофагов возбудителей бактериальных инфекций, обеспечит повышение достоверности результата исследования.

Известен способ оценки литической активности бактериофагов в монослое клеток эмбриона человека, предложенный Г. Е. Афиногеновым [23], при котором результат исследования определяется в течение 2 ч. Однако, представленная методика достаточно трудоемкая, дорогостоящая и не прижилась в повседневной практике.

В настоящее время на территории РФ оценка литической активности бактериофагов осуществляется в соответствии с клиническими рекомендациями «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической

практике» [153]. Ранее Л. М. Майской [106], Н. В. Алексаниной [6] были описаны способы изучения свойств бактериофагов так же на плотной питательной среде в системе «крестов», но с несколько другой интерпретацией шкалы результатов. В литературе представлен метод Фюрта в модификации Фишера, основанный на соединении бактериофага с расплавленным агаром с последующим внесением капли испытуемой бульонной культуры на поверхность среды [51]. Кроме того, известен метод радиального лизиса [78]. Он базируется на возможности взаимодействия бактериального возбудителя с изучаемым бактериофагом в геле. По диаметру зоны лизиса судили о литических свойствах фагов. Согласно изложенным методам, исследования проводятся однократно и с использованием плотных и полуагаризованных питательных сред. Однако плотность среды активно влияет на способность микроорганизмов двигаться в сторону нахождения питательных веществ [68]. Применение жидкого питательного бульона позволяет обеспечить оптимальные условия для механизмов хемотаксиса. Кроме того, если происходит лизогенизация бактерий (не гибель), то есть встраивание ДНК фага в хромосому бактерии без лизиса штамма, то питательный бульон обеспечивает массивный рост лизогенизированных бактерий, а, следовательно, позволяет сделать вывод о нецелесообразности назначения данного бактериофага. Оценка в системе «крестов» включает необходимость рутинного подсчета количества выросших колоний в зоне нанесения капли бактериофага или измерение диаметра лизиса бактерий в геле, что вносит субъективизм в интерпретацию результата.

Метод, описанный М. О. Биргером [28], предполагает соединение суспензии бактериальной культуры и от 1 до 10 капель бактериофага в жидкой питательной среде. При этом проведение исследования не предусматривает определение концентрации бактериального инокулята и установление количественного соотношения бактерии и бактериофага, хотя известно, что с понижением множественности фаговой инфекции возрастает частота лизогенизации [39]. Результат основывается на визуальной оценке мутности питательного бульона.

Одной из задач диссертационной работы явилась разработка способа измерения литической активности бактериофагов с применением современного

стандартизованного оборудования для оценки результата и возможностью многократной постановки реакции для получения более точного заключения. Представленный нами способ, основывается на изменении оптической плотности жидкой питательной среды в результате взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг» с интерпретацией ответа в числовых значениях. Он предусматривает приготовление суспензии суточной бактериальной культуры в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, соединение ее с мясо-пептонным бульоном и специфическим бактериофагом для дальнейшей совместной инкубации с последующим измерением оптической плотности среды сокультивирования бактерии и вирионов. Согласно изобретению, оценка литической активности бактериофага осуществляется по среднему значению пятикратных измерений оптической плотности реакции взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг» за вычетом оптической плотности фона компонентов (питательного бульона и бактериофага). В соответствии с полученными цифровыми значениями литической активности бактериофага бактериальный штамм считается чувствительным или устойчивым к действию вириона. Осуществляются контроли роста изучаемого штамма и вероятности контаминации бактериофага бактериальной культурой.

Разработанный способ позволяет увеличить достоверность оценки литической активности бактериофагов. Внедрение предложенного способа в российскую практику обеспечит рациональное применения бактериофагов с лечебной и профилактической целью.

Таким образом, с одной стороны бактериофаги - это природные антимикробные средства, применяемые в различных отраслях народного хозяйства, с другой стороны это векторы горизонтального переноса генетической информации, несущие информацию о вирулентности, патогенности, токсигенности и антибиотикорезистентности. Поэтому только целесообразное использование бактериофагов позволит избежать развития спорадических случаев и вспышек социально-значимых инфекционных заболеваний бактериальной этиологии.

ВЫВОДЫ

1. Субпопуляции потенциальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в акушерском стационаре, формируются в кишечнике и на коже пупочного остатка новорожденных, и представлены бактериями семейства *Enterobacteriaceae* и неферментирующими грамотрицательными штаммами, при этом шансы выявления этих изолятов, обладающих резистентностью к антимикробным препаратам, были в 2 раза больше ДИ 95% [1,4 - 2,9] в сравнительных исследованиях.

2. Выделены два вирулентных штамма бактериофагов *Proteus phage* P16-2532 и *Proteus phage* 2207-№35, активные в отношении бактерий *P. mirabilis*, изолированных из акушерского стационара, определено их таксономическое положение в семействе *Siphoviridae*. Установлено отсутствие в геномах выделенных штаммов фагов генов, кодирующих известные интегразы или их гомологи, что подтверждает их строго литические свойства.

3. Выявлено отсутствие влияния вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий *S. aureus* и *P. mirabilis* к антимикробным препаратам. Строго литическая природа фагов подтверждена молекулярно-генетическими методами.

4. Чувствительность клинически значимых изолятов к изученным лекарственным препаратам, содержащим бактериофаги, регистрируется у бактерий рода *Klebsiella* в 31,7 % случаев, у штаммов *Proteus spp.* в 40 %, для патогенной *E. coli* O26 данное значение составляет 25 %.

5. Установлено, что чувствительность бактерий к специфическим бактериофагам отличается при сравнении методов определения на плотной и в жидкой питательных средах, и обосновывает необходимость разработки новых методов, более четко определяющих литические свойства бактериофагов.

6. Разработан способ количественной оценки литической активности бактериофагов, основанный на измерении оптической плотности среды взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг». Предложенный способ

повышает надежность методики изучения свойств бактериофагов, за счет интерпретации результатов в количественных значениях.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В качестве основного критерия оценки предвестников активации эпидемического процесса в акушерских стационарах рекомендовано изучение резистентности бактериальных штаммов к индикаторным антибиотикам, выделенных из кишечного содержимого толстой кишки и с кожи пупочного остатка.
2. Проведение многоуровневого мониторинга (локального, регионального, национального) чувствительности патогенных агентов к различным видам фагосодержащих препаратов позволит проводить своевременную оценку эффективности бактериофагов, используемых в качестве лекарственных средств, «адресность» результатов (привязка данных к возбудителю, категории пациентов, типу мониторинга) и сопоставление их с эпидемиологическими данными.
3. Результаты экспериментальных исследований *in vitro*, свидетельствующие об отсутствии антогонистической активности вирулентных бактериофагов и АМП в отношении бактерий *P. mirabilis* и *S. aureus*, и имеющиеся литературные данные о терапевтическом эффекте *in vivo* их совместного использования определяют возможность разработки схем лечения пациентов с комбинированием антибактериальных препаратов
4. Выделенные бактериофаги *Proteus phage* P16-2532 и *Proteus phage* 2207-№ 35 являются перспективными для использования в лечебной деятельности.
5. Внедрение способа количественной оценки литической активности бактериофагов в лабораторную практику позволит повысить эффективность применения бактериофагов в лечебной и профилактической деятельности, даст возможность проводить одномоментно тестирование чувствительности бактерий к нескольким видам лекарственных бактериофагов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшее изучение бактерий, обладающих селективными преимуществами выживания в условиях больничной среды, за счет резистентности к антимикробным препаратам, необходимо продолжить с применением молекулярно-генетических методов для исследования механизмов формирования патогенных свойств штаммов.
2. Целесообразно продолжить отработку способа количественной оценки литической активности бактериофагов в отношении пигментообразующих бактерий (*P. aeruginosa*), а также провести корректировку оценки результата с учетом титра изучаемого бактериофага.
3. Необходимо провести дальнейшее изучение характеристик *Proteus phage* P16-2532 и 2207-№ 35 (стабильность титра при различных температурах и pH, урожайность, устойчивость к хлороформу) для производства и использования в лечебных целях.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ООО «НИЦФ»	-	Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский центр фармакотерапии»
ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора	-	Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора	-	Федеральное бюджетное учреждение науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
АМП	-	антимикробные препараты
АМП	-	ампициллин
БОЕ	-	бляшкообразующая единица
ВОЗ	-	всемирная организация здравоохранения
ГЕН	-	гентамицин
ДИ	-	доверительный интервал
ДНК, оцДНК, дцДНК	-	дезоксирибонуклеиновая кислота, одноцепочечная ДНК, двухцепочечная ДНК
ЕД	-	единицы
ИПР	-	индекс полирезистентности к индикаторным антибиотикам
ИСМП	-	инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи
КОЕ	-	колониеобразующая единица
ЛА	-	литическая активность
МУ, МУК, МР	-	методические указания, методические рекомендации
ОКИ	-	острые кишечные инфекции
ОКС	-	оксациллин
ОП	-	оптическая плотность
ОРЗ	-	острые респираторные заболевания
ОРИТ	-	отделения интенсивной терапии и реанимации
ОСО	-	отраслевой стандартный образец
ОСТ	-	отраслевой стандарт
ОФ	-	офлоксацин
ПЦР	-	полимеразная цепная реакция
Р	-	вероятная справедливость нулевой гипотезы
РНК	-	рибонуклеиновая кислота
РОУС	-	родовспоможение, ориентированное на участие семьи
Сыворотка диагностическая эшерихиозная ОК поливалентная, ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ	-	сыворотки содержащая специфические агглютинины к О - соматическому антигену и К - поверхностному антигену
ТЕТ	-	тетрациклин
ЦАЗ	-	цефтазидим
ЦОС	-	цефуросим
ЦТК	-	цефотаксим

ЦФЛ	- цефалексим
ЭРИ	- эритромицин
<i>E. coli</i> (gem+)	- <i>E. coli</i> гемолитические
<i>E. coli</i> lac-	- <i>E. coli</i> лактозонегативные
ESCAPE	- «приоритетные патогены» – 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека.
EUCAST	- Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам
I	- умеренная резистентность
ICTV	- международный комитет по таксономии вирусов
Infectious Diseases Society of America, IDSA	- Американское общество по инфекционным болезням
M	- средние арифметические величины
MALDI-TOF Biotyper MicroFlex	- настольный времяпролетный масс-спектрометр с матричной лазерной десорбцией
Me	- медиана
Q	- критерий МакНемара
Q1-Q3	- нижний и верхний квартили
R	- резистентность
S	- чувствительность
SPSS	- полнофункциональная статистическая система, предназначенная для решения исследовательских и бизнес-задач при помощи анализа данных

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимкин, В. Г. Актуальные направления научных исследований в области инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, на современном этапе / В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян // Здоровье населения и среда обитания. - 2018. - №4(301). – С.46-50.
2. Акимкин, В. Г. Бактериофаги: история изучения и применения / В. Г. Акимкин // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.54-55.
3. Акимкин, В. Г. Современные аспекты эпидемиологии и профилактики нозокомиального сальмонеллеза / В. Г. Акимкин // Медицинский совет. - 2013. - №5-6. - С.33-38.
4. Алексанина, Н. В. Влияние лактоглобулина на чувствительность к бактериофагам условно-патогенных микроорганизмов и сальмонелл, выделенных от детей с ОКИ и дисбиозами / Н. В. Алексанина, О. В. Моисеева // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями», 25 мая 2016 г, г. Нижний Новгород. – Н. Новгород, 2016. - С.118-120.
5. Алексанина, Н. В. Изучение влияния иммунного лактоглобулина на чувствительность к бактериофагам сальмонелл, выделенных от детей, в опытах *in vitro* / Н. В. Алексанина // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.132-134.
6. Алексанина, Н. В. Изучение чувствительности к бактериофагам условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от детей раннего возраста / Н. В. Алексанина // Инфекции и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.62-63.

7. Аленкина, Т. В. Разработка лиофилизированных препаратов холерных бактериофагов для типирования энтеропатогенных вибрионов / Т. В. Аленкина, Г. И. Коровкина, А. К. Никифоров // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.134-139.
8. Алешкин, А. В. Бактериофаги - пробиотические средства регуляции микробиоценозов и деконтаминации микроорганизмами продуктов питания, животных и растений / А. В. Алешкин, А. В. Караулов, Э. А. Светоч, Н. В. Воложанцев, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, О. В. Рубальский, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, М. С. Афанасьев, В. М. Лахтин, М. О. Рубальский // Иммунология, аллергология, инфектология. - 2013. - №3. - С.80-89.
9. Алешкин, А. В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: история исследований до широкого применения антибиотиков / 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, Е. О. Рубальский, К. Н. Смирнова, Э. Р. Зилькарнеев, А. Д. Теплый // Астраханский медицинский журнал. - 2016. - №2. - С.8-16.
10. 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, Е. О. Рубальский, К. Н. Смирнова, Э. Р. Зилькарнеев, А. Д. Теплый, А. С. Вихрова // Астраханский медицинский журнал. - 2016. - №3. - С.8-16.
11. Алешкин, А. В. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов / А. В. Алешкин, Н. В. Воложанцев, Э. А. Светоч, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. И. Борзилов, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, А. В. Караулов, Х. М. Галимзянов, И. А. Киселева, М. С. Афанасьев, Е. О. Рубальский, М. О. Рубальский // Астраханский медицинский журнал. - 2012. - Т.7, №3. - С.31-39.

12. 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 // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.56.
13. Алешкин, А. В. Исторический обзор опыта применения бактериофагов в России / А. В. Алешкин // Медицинский совет. - 2015. - №7. - С.12-16.
14. Алешкин, А. В. Концепция персонализированной фаготерапии пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии, страдающих инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / А. В. Алешкин, Е. П. Селькова, О. Н. Ершова, И. А. Савин, А. С. Шкода, С. С. Бочкарева, С. Д. Митрохин, И. А. Киселева, О. Е. Орлова, Е. О. Рубальский, Э. Р. Зулькарнеев // Фундаментальная и клиническая медицина. - 2018. - Т.3, №2. - С.66-74.
15. Алешкин, А. В. Специализированный продукт питания «Фудфаг» в профилактике пищевых инфекций / А. В. Алешкин, Н. В. Воложанцев, Э. А. Светоч, С. С. Афанасьев, В. В. Вережкин, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, И. А. Киселева // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.93-99.
16. Алешкин, В. А. Биодеконтаминация пищевых полуфабрикатов с помощью бактериофагов / В. А. Алешкин, Ю. В. Ларина, И. А. Киселева, С. С. Афанасьев, А. В. Алешкин // Инфекция и иммунитет. - 2014. – спец. выпуск. - С.63.
17. Алешкин, В. А. Гуморальный иммунный ответ на бактериофаги в оценке эффективности энтеральной фаготерапии / В. А. Алешкин, Л. И. Новикова, С. С. Бочкарева, А. В. Алешкин, О. Н. Ершова, И. А. Киселева, Э. Р. Зулькарнеев // Материалы III научно-практической конференции с международным участием

«Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.56-57.

18. Алешукина, А. В. Сочетанное применение бактериофагов с лактоглобулином для санации семейных очагов / А. В. Алешукина, Е. В. Голошва, Э. А. Яговкин, И. С. Алешукина // Инфекция и иммунитет. - 2014. – спец. выпуск. - С.64-65.

19. Анурова, М. Н. Разработка вязко-пластичных лекарственных форм бактериофагов / М. Н. Анурова, А. В. Алешкин, Е. О. Бахрушина, И. А. Киселева, С. С. Бочкарева, Э. Р. Зилькарнеев // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.57-58.

20. Асланов, Б. И. Бактериофаги - эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б. И. Асланов // Медицинский альманах. - 2015. - №13. - С.106-110.

21. Асланов, Б. И. Бактериофаги для купирования вспышки, вызванной *Staphylococcus aureus*, в отделении реанимации новорожденных / Б. И. Асланов, А. В. Любимова, Л. П. Зуева, А. А. Малашенко, Н. А. Шаляпина, Г. В. Рубин // Медицинский альманах. - 2015. - № 5(40). - С.115-118.

22. Асланов, Б. И. Бактериофаги для предотвращения формирования биопленок *Pseudomonas aeruginosa* / Б. И. Асланов, С. Д. Конев, М. Н. Ильина, Т. А. Гришко // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.58.

23. Афиногенов, Г. Е. Влияние пиобактериофага на адгезивность и цитотоксичность стафилококка / Г. Е. Афиногенов, А. Г. Афиногенова, Д. Ю. Мадай // Инфекция и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.66.

24. Баязитова, Л. Т. Мониторинг чувствительности *P. aeruginosa* к бактериофагам / Л. Т. Баязитова, О. Ф. Тюпкина, Т. А. Чазова, К. Н. Сюзов, Н. С. Конышев // Материалы XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням «Инфекционные болезни в современном мире: этиология, диагностика, лечение и профилактика», 7 - 9 сентября 2020 г., г. Москва. – Москва, 2020. – С. 27.
25. Белокрысенко, С. С. Этиологическое значение, экология и генетические механизмы формирования госпитальных штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*: дис. ... докт. мед. наук: 03.00.07 / Белокрысенко Сергей Сергеевич. - М., 1993. -51с.
26. Белопольская, Х. А. Возможности фаговой терапии гинекологической инфекции / Х. А. Белопольская, И. С. Сидорова, Л. С. Шахгиреева, А. А. Белопольский // Трудный пациент. – 2014. - № 8-9. - С.6-9.
27. Беляков, В. Д. Эпидемиологический надзор – основа современной организации противоэпидемической работы / В. Д. Беляков // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. - 1985. - Т.62, № 5. - С.53-58.
28. Биргер, М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. М. О. Биргера. – М.: Медицина, 1982. – 464с.
29. Болдырев, А. Н. Получение тонкодисперсной суспензии культуры клеток - путь к промышленному производству микобактериофагов как лечебных средств против туберкулеза / А. Н. Болдырев, Ю. В. Туманов // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.149-153.
30. Боргоякова, М. Б. Использование технологии фагового дисплея *in vitro* для поиска пептидов, связывающихся с аденокарциномой легких / М. Б. Боргоякова, В. И. Каледин, В. П. Николин, Н. А. Попова, А. А. Ильичев / Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и

пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.154-158.

31. Борисова, О. Ю. Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи / О. Ю. Борисова, Е. О. Рубальский, А. В. Алешкин, Н. Т. Гадуа, О. Н. Ершова, Н. В. Курдюмова, И. А. Савин, И. А. Киселева, С. С. Бочкарева // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.60-61.

32. Бронников, К. А. Исследование литического цикла стафилококкового бактериофага SA20 методом проточной цитометрии / К. А. Бронников, В. В. Морозова, Ю. Н. Козлова, А. Л. Матвеев, Н. В. Тикунова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.61.

33. Васильев, Д. А. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов (биопротессинг): научная монография / Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, А. В. Алешкин, С. Н. Золотухин, А. В. Мاستиленко, И. А. Киселева, Е. В. Сульдина, Д. В. Никитченко. Ульяновск: ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2019. – 450с.

34. Васильев, Д. А. Бактериофаги рода *Citrobacter* / Д. А. Васильев, Л. П. Пульчеровская, С. Н. Золотухин // Вестник Ульяновской сельскохозяйственной академии. - 2017. - №3. - С.40-44.

35. Васильев, Д. А. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, Е. В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. - 2014. – спец. выпуск. - С.69-70.

36. Васильева, Е. И. Микробиологический мониторинг чувствительности стафилококков к бактериофагам / Е. И. Васильева, Е. А. Костюк // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.62.
37. Васильева, Ю. Б. Выделение бактериофагов *Bordetella bronchiseptica* / Ю. Б. Васильева, Д. А. Васильев, А. В. Мاستиленко, Е. Н. Семанина, А. А. Ломакин, К. Н. Пронин, С. Н. Золотухин, А. А. Щербина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.62.
38. Викторов, Д. А. Бактериофаги, активные в отношении основных возбудителей бактериальных болезней рыб, и перспективы их применения в целях диагностики, лечения и профилактики / Д. А. Викторов, Т. А. Гринева, Д. А. Васильев, И. Г. Горшков, Н. Г. Куклина // Инфекции и иммунитет. - 2014. – спец. выпуск. - С.71.
39. Викторов, Д. А. Разработка методики дифференцирования умеренных и вирулентных бактериофагов / Д. А. Викторов, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Т. А. Гринева, И. Г. Горшков, Н. Г. Куклина, И. Р. Насибуллин, Н. А. Парамонова, А. М. Артамонов, А. П. Воротников, П. А. Антошкин // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.32-38.
40. Викторов, Д. А. Экспериментальное получение фагорезистентных мутантов на примере бактерий рода *Pseudomonas* / Д. А. Викторов, Т. А. Гринева, Д. А. Васильев, А. М. Артамонов, А. П. Воротников, П. А. Антошкин, С. Н. Золотухин // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и

пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.38-44.

41. Власов, В. В. Бактериофаги как терапевтические препараты: что сдерживает их применение в медицине / В. В. Власов, Н. В. Тикунова, В. В. Морозова // Биохимия. – 2020. – Т.85(11). – С. 1587-1600.

42. Власов, В. В. Персонализированная фаготерапия инфицированных трофических язв на фоне сахарного диабета / В. В. Власов, Д. А. Ганичев, Ю. Н. Козлова, В. В. Морозова, И. В. Саранина, Н. В. Тикунова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.62-63.

43. Воложанцев, Н. В. Бактериофаги *Clostridium perfringens*: выделение, биологические свойства, геномный анализ и перспективы практического использования / Н. В. Воложанцев, В. А. Баннов, В. В. Вережкин, В. М. Красильникова, В. П. Мякина, Э. А. Светоч, И. А. Дятлов // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.44-48.

44. Воложанцев, Н. В. Оценка эффективности бактериофагов при лечении экспериментального сепсиса, острой пневмонии и инфекции бедра, вызванных *Klebsiella pneumoniae* у мышей / Н. В. Воложанцев, А. И. Борзилов, В. П. Мякина, О. В. Коробова, Т. И. Комбарова, В. М. Красильникова, В. В. Вережкин, Э. А. Светоч // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.63.

45. Воробьев, А. Л. Диагностическая эффективность бруцеллезного антигена, содержащего специфический фаг / А. Л. Воробьев, Л. Н. Гордиенко // Ветеринарная патология. - 2017. - №3. - С.8-16.
46. Воробьев, А. Л. Литический спектр фагов L- форм бруцелл / А. Л. Воробьев // Ветеринарная патология. – 2010. - № 2. – С. 11-16.
47. Воронкова, О. С. Чувствительность пленкообразующих штаммов стафилококков, выделенных из дыхательных путей, к лечебным препаратам бактериофагов / О. С. Воронкова, О. А. Сирокваша, Т. М. Шевченко, А. И. Винников, В. Е. Кудрявцева // Запорожский медицинский журнал. - 2014. - №6(87). - С.105-108.
48. Всемирная организация здравоохранения [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.who.int/ru/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (Дата обращения: 11.10.2020).
49. Гаевская, Н. Е. Экспериментальные бактериофаги для диагностики холеры / Н. Е. Гаевская, А. О. Кочеткова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.65-66.
50. Головинская, Т. М. Чувствительность к бактериофагам штаммов *Bacillus anthracis* с различным типом капсулообразования / Т. М. Головинская, О. И. Цыганкова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.65.
51. Гольдфарб, Д. М. Бактериофагия / Д. М. Гольдфарб; под ред. В.Д. Тимакова. М.: Медгиз, 1961. - 297с.
52. Гончар, Н. В. Антибиотико- и фагорезистентность клинических штаммов кишечной палочки у госпитализированных детей Санкт-Петербурга, больных

эшерихиозами / Н. В. Гончар, И. В. Партина, О. И. Ныркова, А. С. Драп // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. - №59. – С. 9-10.

53. Гостищев, В. К. Применение бактериофагов в программе лечения больных с тяжелой абдоминальной патологией / В. К. Гостищев, И. В. Горбачева, У. С. Станоевич // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.65-66.

54. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году», М.: Роспотребнадзор, 2019. – 254 с.

55. Григорова, Е. В. Характеристика чувствительности к бактериофагам штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных из микробиоценоза ротоглотки у детей г. Иркутска / Е. В. Григорова, Н. М. Воропаева, У. М. Немченко, Е. И. Иванова, Е. А. Кунгурцева, Т. В. Туник, Л. С. Козлова // Asta Biomedica Scientifica. – 2017. – Т.2, №5. – часть 2. – С.65-69.

56. Гулий, О. И. Иммунодетекция бактериофагов методом электроакустического анализа / О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, А. М. Шихабудинов, А. А. Теплых, И. А. Бородина, А. С. Фомин, С. А. Староверов, Л. А. Дыкман, О. В. Игнатов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.66.

57. Гулий, О. И. Определение спектра литической активности бактериофагов методом электрооптического анализа клеточных суспензий [Электронный ресурс] / О. И. Гулий, С. А. Павлий, В. Д. Бунин, С. А. Коннова, О. В. Игнатов // Электронное периодическое издание ЮФУ «Живые и биокосные системы». - №9. - 2014. - Режим доступа: <http://www.jbks.ru/archive/issue-9/article-3>. (Дата обращения: 15.10.2018).

58. Гулий, О. И. Определение спектра литической активности бактериофагов методом акустического анализа / О. И. Гулий, Б. Д. Зайцев, И. Е. Кузнецова, А. М. Шихабудинов, Л. А. Дыкман, С. А. Староверов, О. А. Караваева, С. А. Павлий, О. В. Игнатов // Биофизика. - 2015. - Т.60. - С.722-728.
59. Делягин, В. М. Бактериофаготерапия на современном этапе / В. М. Делягин // Актуальная проблема на современном этапе. - 2015. - №3. - С.132-136.
60. Додова, Е. Г. Постантибиотиковая эра: бактериофаги как лечебная стратегия / Е. Г. Додова, Е. А. Горбунова, И. А. Аполихина // Медицинский совет. - 2015. - №11. - С.49-53.
61. Дроздова, О. М. Применение бактериофагов в эпидемиологической практике: взгляд через столетие / О. М. Дроздова, Е. Б. Брусина // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2010. - №5. - С.20-24.
62. Дрюккер, В. В. Бактериофаги и их функционирование в биопленках / В. В. Дрюккер, А. С. Горшкова // Известия Иркутского государственного университета. Серия «Биология. Экология». - 2012. - Т.5, №3. - С.8-16.
63. Дубровин, Е. В. Использование атомно-силовой микроскопии для исследования фаговой инфекции / Е. В. Дубровин, А. В. Попова, С. В. Краевский, С. Г. Игнатов, И. В. Яминский, Н. В. Воложанцев // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.177-180.
64. Дьяченко, С. В. Фармакоэпидемиологические основы антибактериальной терапии распространенных заболеваний / С. В. Дьяченко // Хабаровск: изд. центр ГОУ ВПО ДВГМУ, 2010. - 400с.
65. Дятлов, И. А. Создание новых средств профилактики и лечения инфекционных болезней на основе бактериофагов и их литических ферментов / И. А. Дятлов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.67.

66. Ефрейторова, Е. О. Фагоиндикация бактерий рода *Serratia* / Е. О. Ефрейторова, Л. П. Пульчеровская, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, И. Б. Павлова, Т. Г. Юдина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.67-68.
67. Журавская, Н. П. Подбор бактериофагов для индикации бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* методом РНФ / Н. П. Журавская, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.69.
68. Завальский, Л. Ю. Хемотаксис бактерий / Л. Ю. Завальский // Соросовский образовательный журнал. – 2001. - Т.7, №9. – С. 23-29.
69. Завгородняя, Е. Ф. Вопросы фагорезистентности условно-патогенных бактерий, изолированных от лиц с дисбиотическим состоянием толстого отдела кишечника / Е. Ф. Завгородняя, Л. А. Сташкевич // Инфекция и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.79-80.
70. Завгородняя, Е. Ф. Фагорезистентность условно-патогенных бактерий в пейзаже кишечной микробиоты у лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника / Е. Ф. Завгородняя // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.70.
71. Затевалов, А. М. Влияние бактериофагов на микрофлору толстой кишки / А. М. Затевалов, И. А. Киселева, Ю. А. Копанев, А. В. Алешкин, С. С. Афанасьев, Е. П. Селькова // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.9-14.

72. Землянко, О. М. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам / О. М. Землянко, Т. М. Рогоза, Г. А. Журавлева // Генетические основы эволюции экосистем. - 2018. – Т.16, №3. – С.4-17.
73. Зильбер, Л. А. Учение о вирусах / Л. А. Зильбер. - М.: Медгиз: Государственное издательство медицинской литературы, 1956. - 316 с.
74. Золотухин, Д. С. О специфичности бактериофагов *Hafnia alvei* / Д. С. Золотухин, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, А. М. Семенов, А. В. Летаров // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.1. - С.63-66.
75. Зубрицкий, В. Ф. Оптимизация антибиотикопрофилактики нагноений ран с помощью поливалентных бактериофагов и иммуноориентированной терапии / В. Ф. Зубрицкий, А. Н. Ивашкин, А. И. Ковалев, П. Г. Кривошапов, А. В. Низовой, Е. М. Фоминых // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.71.
76. Зуева, Л. П. Роль бактериофагов в эволюции штаммов возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Л. П. Зуева, Б. И. Асланов, А. А. Долгий, Л. В. Белова // Профилактическая и клиническая медицина. – 2019. - №4(73). – С. 4-8.
77. Зурабов, А. Ю. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов / А. Ю. Зурабов, Н. Н. Каркищенко, Д. В. Попов, Е. Л. Жиленков, В. М. Попова // Биомедицина. - 2012. - №1. - С.134-138.
78. Ибрагимова, С. М. Метод радиального лизиса при детекции *Bacillus anthracis* с использованием бактериофага диагностического сибиреязвенного / С. М. Ибрагимова // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». - 2014. - №2. - С.34-37.

79. Игнатов, С. Г. Бактериофаги для имплантатов / С. Г. Игнатов, Е.А. Денисенко, А. Г. Волошин // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.72.
80. Иконникова, Н. В. Бактериофаги - вирусы бактерий: учебное пособие // Минск: ИВЦ Минфина, 2017. – 41с.
81. Карамышева, Н. Н. Подбор и усовершенствование технологических параметров выделения бактериофагов анаэробных бактерий *Desulfovibrio desulfuricans* / Н. Н. Карамышева, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.I. - С.73-75.
82. Кирик, И. В. Изучение способов хранения бактериофагов / И. В. Кирик, С. Л. Василенко, Н. Н. Фурик // Актуальные вопросы переработки мясного и молочного сырья: сб. науч. тр. – Минск, 2016. – Вып.10. - С.122-131.
83. Киселева, И. А. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: пути повышения эффективности / И. А. Киселева, А. В. Алешкин, О. Н. Ершова, Н. В. Воложанцев, Э. А. Светоч, Л. И. Новикова, С. С. Бочкарева // Инфекции и иммунитет. - 2016. - Т.6, № 3. - С.259-260 (Материалы II национального конгресса бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях»).
84. Ковалева, Е. Н. Выделение и характеристика бактериофагов *Listeria monocytogenes* / Е. Н. Ковалева, Д. А. Васильев, Е. В. Сульдина, М. А. Имамов // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.130-133.

85. Ковалева, Е. Н. Разработка биопрепарата на основе энтерококковых фагов для детекции *Enterococcus faecalis* / Е. Н. Ковалева, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т. II. - С. 133-136.
86. Ковалишена, О. В. Чувствительность стафилококков, циркулирующих на территории Нижегородской области, к коммерческим препаратам бактериофагов / О. В. Ковалишена, Р. Ф. Чанышева // Инфекция и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С. 88.
87. Ковязина, Н. А. Разработка твердых лекарственных форм на основе комплексных поливалентных препаратов бактериофагов / Н. А. Ковязина, А. В. Казьянин, А. М. Николаева, Е. В. Функнер // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т. II. - С. 136-140.
88. Ковязина, Н. А. Технологические аспекты разработки капсул с бактериофагами / Н. А. Ковязина, Е. В. Функнер, А. М. Николаева, Е. В. Орлова, М. Г. Ефимова, О. И. Шитова // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. - 2015. - №1. - С. 132-136.
89. Козлов, Р. С. Справочник по антимикробной терапии / под ред. Р. С. Козлова, А. В. Дехнич. – Смоленск: МАКМАХ, 2013. – 480 с.
90. Комисарова, Е. В. Геномный анализ бактериофагов, лизирующих высоковирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* капсульных типов K1 и K2 / Е. В. Комисарова, В. П. Мякина, В. М. Красильникова, В. В. Веревкин, А. А. Кисличкина, Н. В. Воложанцев // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С. 74.

91. Корначев, А. С. Алгоритмизированная система управления эпидемическим процессом внутрибольничных инфекций в родильных домах и отделениях патологии новорожденных: автореферат дис. ... канд. мед. наук: 14.00.03 / Корначев Александр Сергеевич. – М., 1992. – 24 с.
92. Коровкин, С. А. Разработка новых лекарственных форм для производства лечебно-профилактических препаратов бактериофагов / С. А. Коровкин, А. В. Катлинский, П. А. Набатников, А. В. Семченко, Е. Н. Сятчихина // Инфекции и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.89-90.
93. Косякова, Н. И. Иммунологические аспекты фаготерапии бронхиальной астмы у детей с частыми интеркуррентными респираторными инфекциями / Н. И. Косякова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.74.
94. Красильников, И. В. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: современное состояние применения и производства / И. В. Красильников, К. А. Лыско, А. К. Лобастова // Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. - 2010. - №4. - С.9-11.
95. Красильников, И. В. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И. В. Красильников, К. А. Лыско, Е. В. Отрашевская, А. К. Лобастова // Сибирский медицинский журнал. - 2011. - Т.26. - С.33-37.
96. Красильников, И. В. Роль бактериофагов в терапии бактериальных инфекций / И. В. Красильников // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.74-75.
97. Крылов, В. Н. Модульные композиции из моновидовых смесей бактериофагов для терапии инфекций *P. aeruginosa* / В. Н. Крылов, О. В. Шабурова, Е. А. Плетенева, М. В. Буркальцева, В. Н. Крылов, А. М. Каплан, Е. Н.

Чеснокова, О. А. Польша // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.75.

98. Куклина, Н. Г. Разработка бактериофагового биопрепарата для индикации и идентификации бактерии *Aeromonas salmonicida* / Н. Г. Куклина, Д. А. Васильев, Д. А. Виктор, А. А. Щербина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.76.

99. Куракин, Э. С. Опыт применения бактериофага в профилактике госпитального шигеллеза / Э. С. Куракин // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.76-77.

100. Лазарева, Е. Б. Бактериофаги - история вопроса и современное состояние фаготерапии / Е. Б. Лазарева, Д. Д. Меньшиков // Медицинский алфавит. - 2014. - №4. - С.43-48.

101. Лахтин, В. М. Бактериофаги и молочнокислые бактерии. Обзор / В. М. Лахтин, А. В. Алешкин, М. В. Лахтин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин // Acta Biomedica Scientifica. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2012. - №5(87). – Часть 1. - С.382-385.

102. Лахтин, М. В. Лектин-гликоконъюгатные системы в организме человека / М. В. Лахтин, А. В. Караулов, В. М. Лахтин, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, Ю. В. Несвижский, М. С. Афанасьев, Е. А. Воропаева, А. В. Алешкин // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2012. - №1. - С.27-36.

103. Летаров, А. В. Бактериофаги в микробиомах кишечника человека и животных: современное состояние вопроса / А. В. Летаров // Инфекции и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.93-94.

104. Летифов, Г. М. Особенности комплексного лечения вульвовагинита у девочек - дошкольников с различными формами пиелонефрита / Г. М. Летифов // Журнал в журнале. Актуальные проблемы урологии. – 2017. – Т.21, №5. – С.59-64.
105. Лыско, К. А. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов. Краткий обзор / К. А. Лыско, Г. М. Игнатьев, Е. В. Отрашевская // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.30-36.
106. Майская, Л. М. Методика определения фагочувствительности штаммов, выделенных от больных, к препаратам бактериофагов / Л. М. Майская, О. С. Дарбеева, Р. Л. Парфенюк, А. Д. Гвоздева, В. Ф. Малышева // БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение. - 2003. - №2. - С.22-23.
107. Македонова, Л. Д. Бактериофаги патогенных иерсиний: характеристика биологических свойств / Л. Д. Македонова, Т. А. Кудрякова, Г. В. Качкина, Н. Е. Гаевская // Инфекция и иммунитет. - 2014. - спец. выпуск. - С.95-96.
108. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями: МУ № 04-723/3: утверждены заместителем министра здравоохранения СССР. – М., 1984. – 78с.
109. Мидленко, В. И. Микробиологическое обоснование применения бактериофагов для лечения больных с инфекционными осложнениями в клинике травматологии и ортопедии / В. И. Мидленко, С. Н. Золотухин, Г. А. Шевалаев, И. М. Ефремов, Ю. В. Пичугин // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.40-44.
110. Микулинская, Г. В. Термостабильные пептидогликангидролазы бактериофагов как альтернатива антибиотикам / Г. В. Микулинская, С. В. Чернышов, М. С. Шаврина, А. А. Зимин // Материалы III научно-практической

конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.77.

111. Микулинская, Г. В. Эндолизин бактериофага T5 как потенциальный энзибиотик / Г. В. Микулинская, А. А. Зимин, О. А. Степная // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т. II. - С.145-148.

112. Мирошников, К. А. Бактериофаги пектолитических патогенов картофеля / К. А. Мирошников, А. П. Кабанова, Во Тхи Нгок Ха, М. М. Шнейдер, Н. Н. Сыкилинда, С. В. Тоцаков, А. Н. Игнатов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.78.

113. Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней: Основы иммунологии: том III / под ред. Г.В. Выгодчикова. - М: Изд-во Медицина, 1964. – 643с.

114. Мозговая, Ю. А. Иммуноморфологические изменения в лимфатических узлах и селезенке после комплексной терапии экспериментального генерализованного процесса, вызванного *Klebsiella pneumoniae* / Ю. А. Мозговая, М. М. Мишина, Н. Фарзуллаев, О. Козыренко // Современные тенденции развития науки и технологий: Сборник научных трудов по материалам II международной научно-практической конференции. – Белгород, 2015. – Часть II. - С.38-40.

115. Молофеева, Н. И. Тест система ускоренной индикации бактерий *E. coli* 0157: H7 / Н. И. Молофеева, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, С. В. Мерчина, А. Г. Шестаков // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.78.

116. МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*: Методические указания. – М.: Федеральный госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. - 31с.
117. МУК 4.2.1884-04 Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2005. - 75с.
118. МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам»: методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. - 91 с.
119. МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»: методические указания. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 87с.
120. Найговзина, Н. Б. Оптимизация системы мер борьбы и профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи в Российской Федерации / Н. Б. Найговзина, А. Ю. Попова, Е. Е. Бирюкова, Е. Б. Ежлова, Е. П. Игонина, В. И. Покровский, В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян, Н. В. Шестопалов, С. А. Краевой, Н. А. Костенко, Н. И. Брико, Е. Б. Брусина, Л. П. Зуева, И. В. Фельдблюм, В. В. Шкарин, Р. С. Козлов, В. Л. Стасенко, А. А. Голубкова, Г. Т. Сухих, Т. В. Припутневич, Р. Г. Шмаков, В. В. Зубков, А. С. Шкода, В. И. Шумилов, С. Д. Митрохин, О. Н. Ершова, Е. П. Селькова, Т. А. Гренкова, И. В. Иванов, О. Р. Швабский // Оргздрав: новости, мнения, обучение. - 2018. - №1. - С.17-26.
121. Национальная Концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [Электронный ресурс] / утв. Главным государственным санитарным врачом РФ Онищенко Г.Г. 6 ноября 2011 г.- Режим доступа: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/>. (Дата обращения: 11.05.2017).
122. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-

профилактических учреждений: приказ Министерства здравоохранения СССР № 535 от 22 апреля 1985 г. – М., 1985. – 124с.

123. Определитель бактерий Берджи / пер. с англ. Г.А. Заварзина; под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. - М: Мир, 1997. – 432 с.

124. Падруль, М. М. «Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов / М. М. Падруль, Е. Г. Кобаидзе, А. А. Олина, Г. К. Садыкова // Современные проблемы науки и образования. - 2015. - №1. - С.1358-1370.

125. Патент 2296163 Российской Федерации, МПК C12Q 1/70, C12Q 1/02, C12N 5/00. Способ оценки специфической активности бактериофагов / Г. Е. Афиногенов, Р. М. Тихилов, А. Г. Афиногенова, А. Г. Кравцов; заявитель и патентообладатель ФГУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию». - № 2005110248/13; заявл. 08.04.2005; опубл. 27.03.2007, Бюл. № 9. - 5 с.

126. Перепанова, Т. С. Бактериофаготерапия мочевой инфекции / Т. С. Перепанова, О. С. Дарбеева // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.79.

127. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: отраслевой стандарт: ОСТ 91500.11.0004-2003: приказ Минздрава России. – М., 2003. – 173 с.

128. Покровский, В. И. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней // под ред. В. И. Покровского. – М.: Медицина, 1993. - Т.1. - 484с.

129. Покровский, В. И. Эпидемический процесс как социально-экологическая система // под ред. В. И. Покровского. – М.: Медицина, 1986. - 179 с.

130. 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.

131. Попова, А. Ю. Эпидемиологическая безопасность - неотъемлемый компонент системы обеспечения качества и безопасности медицинской помощи / А. Ю. Попова // Вестник Росздравнадзора. - 2017. - №4. - С.5-9.
132. Припутневич, Т. В. Клиническая и микробиологическая эффективность санации влагалища гелем с бактериофагами «Фагогин» при анаэробном вагините и бактериальном вагинозе / Т. В. Припутневич, И. А. Аполихина, В. В. Муравьева, Е. Г. Додова, Л. А. Любасовская, А. Р. Мелкумян, Е. Л. Жиленков, В. М. Попова, А. Ю. Зурабов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.80.
133. Пульчеровская Л. П. Изучение повреждающего действия бактериофага в отношении бактерий рода *Serratia* / Л. П. Пульчеровская, Г. Р. Садртдинова, Д. Г. Сверкалова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. - 2019. - №1(41). – С.12-16.
134. Пульчеровская, Л. П. Биологические свойства выделенных из песка детских песочниц цитробактерных бактериофагов / Л. П. Пульчеровская, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Е. О. Ефрейторова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.81.
135. Рекомендации Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST), версия 10.0. [Электронный ресурс], Режим доступа: <http://www.eucast.org>. (Дата обращения: 15.04.2019).
136. Рубальский, Е. О. Молекулярно-генетическое типирование бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* для фаготерапии и фагопрофилактики / Е. О. Рубальский, А. В. Алешкин, О. Ю. Борисова, Н. Т. Гадуа, И. А. Киселева, С. С. Бочкарева, С. С. Афанасьев, М. О. Рубальский // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические

аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.82.

137. Рубальский, О. В. Использование бактериофагов для профилактики инфицирования бактериальными патогенами и предотвращения бактериальной контаминации продуктов питания (по данным патентов на изобретение) / О. В. Рубальский, А. В. Алешкин, С. С. Афанасьев, В. А. Алешкин, М. С. Афанасьев, А. В. Караулов, Е. О. Рубальский, М. О. Рубальский // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.168-171.

138. Садртдинова, Г. Р. Особенности выделения вирулентных фагов активных к трибе *Klebsiellae* / Г. Р. Садртдинова, Л. П. Пульчеровская, Е. О. Ефрейторова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Е. А. Ляшенко, И. Б. Павлова, Т. Г. Юдина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.83.

139. Степанов, Д. Н. Опыт применения бактериофага для лечения экспериментального сальмонеллеза цыплят-бройлеров / Д. Н. Степанов, В. И. Плешакова, В. Г. Пугачев // Инфекция и иммунитет. - 2014. – спец. выпуск. - С.112.

140. Сульдина, Е. В. Бактериофаги бактерий *Enterobacter* и их основные биологические характеристики / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, И. И. Богданов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017. - №4. - С.94-97.

141. Сульдина, Е. В. Выделение бактерий и бактериофагов *Yersinia enterocolitica* / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2017. - №3(39). - С.50-54.

142. Сульдина, Е. В. Листерийные бактериофаги – как средство индикации и идентификации *L. monocytogenes* / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев, С. Н.

Золотухин, Е. Н. Ковалева, А. А. Щербина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.85.

143. Сырым, Н. С. Изоляция МБфагов из объектов внешней среды и биологического материала / Н. С. Сырым, Б. А. Еспембетов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.85-86.

144. Тапальский, Д. В. Чувствительность госпитальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к препаратам для фаготерапии / Д. В. Тапальский // Вестник витебского государственного медицинского университета. - 2018. - Т.17, №2. - С.47-54.

145. Тапальский, Д. В. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности / Д. В. Тапальский, А. И. Козлова // Проблемы здоровья и экологии. – 2018, №1(55). - С.56-62.

146. Тец, Г. В. Роль компонентов матрикса во взаимодействии бактериофагов с бактериями биопленок / Г. В. Тец, Н. К. Артеменко, М. Ф. Вечерковская, В. В. Тец // Практическая пульмонология. - 2017. - №3. - С.55-57.

147. Тикунов, А. Ю. Бактериофаги специфичные к *Stenotrophomonas maltophilia* / А. Ю. Тикунов, Ю. Н. Козлова, В. В. Морозова, С. О. Кретьен, И. В. Саранина, В. В. Власов, Н. В. Тикунова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.86.

148. Тикунова, Н. В. Бактериофаги, специфичные к бактериям рода *Acinetobacter* / Н. В. Тикунов, Ю. Н. Козлова, В. В. Морозова, В. В. Власов // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги:

теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.86.

149. Тикунова, Н. В. Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленных серий лекарственного препарата Пиобактериофаг поливалентный очищенный / Н. В. Тикунова, Н. Н. Ворошилова, О. А. Полыгач, В. В. Морозова, А. Ю. Тикунов, А. М. Курильчиков, В. В. Власов // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2016. - Т.15, №2(87). – С. 93-100.

150. Толордава, Э. Р. Влияние фаговых препаратов на процесс формирования биопленок / Э. Р. Толордава, Ю. М. Романова // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.86-87.

151. Топчий, Н. В. Бактериофаги при лечении острых кишечных инфекций / Н. В. Топчий, А. С. Топорков // Медицинский совет. - 2015. - №8. - С.74-81.

152. Уткин, Д. В. Оценка фаголизабельности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии / Д. В. Уткин, П. С. Ерохин, Н. А. Осина, Н. П. Коннов // Изв. Саратов. ун-та. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология. - 2013. - Т.13, Вып.3. - С.81-84.

153. Федеральные клинические (методические) рекомендации. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике - Москва, 2014. - 54с.

154. Феоктистова, Н. А. Методы идентификации *Bacillus coagulans*, включая фагоидентификацию / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, К. В. Белова, К. В. Шокина, М. А. Лыдина, А. В. Алешкин, Б. И. Шморгун, И. Б. Павлова, Т. Г. Юдина // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты

применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.89-90.

155. Феоктистова, Н. А. Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага для сибиреязвенного бактериофага / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, К. В. Белова, Е. И. Климушкин, А. И. Калдыркаев, А. В. Алешкин, Б. И. Шморгун // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.87-88.

156. Халибеков, С. Н. Потенциал бактериофагов в лечении инфекций мочевыводящих путей / С. Н. Халибеков, Х. А. Хизриев, А. М. Исагаджиев // Современные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации: сб. статей IV Международной научно-практической конференции. В 2ч, Ч.1 – Пенза: МЦНС «Наука и просвещение», 2018. - 30с.

157. Цыганкова, О. И. Изучение фагорезистентности штаммов *Bacillus anthracis* и разработка схемы их фаготипирования / О. И. Цыганкова, Т. М. Головинская, Н. П. Буравцева // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2016. - Т.11, №4. - С.561-564.

158. Чанышева, Р. Ф. Оптимизация применения бактериофагов для борьбы с инфекциями по результатам регионального микробиологического мониторинга / Р. Ф. Чанышева, О. В. Ковалишена, Т. В. Присада // Медицинский альманах. - 2017. - №4(49). - С.33-37.

159. Чанышева, Р. Ф. Состояние фагочувствительности стафилококковых возбудителей инфекций в медицинских организациях Нижегородской области / Р. Ф. Чанышева, О. В. Ковалишена // Медицинский альманах. - 2014. - №2(32). - С.32-35.

160. Черкасский, Б. Л. Эпидемиологический диагноз. – Москва, 1990. - 208с.

161. Чернядьев, А. В. Электронно-микроскопическое исследование взаимодействия клеток *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia pestis* со специфическими бактериофагами / А. В. Чернядьев, Л. Г. Дудина, С. Г. Литвинец,

- В. П. Черников, А. А. Бывалов // Проблемы особо опасных инфекций. - 2014. – Выпуск 4. - С.80-82.
162. Чугунова, Е. О. Методы титрования бактериофагов / Е. О. Чугунова // Материалы XIV международной научно - практической конференции «Наука и образование: опыт, проблемы, перспективы развития: Часть II. Наука: опыт, проблемы, перспективы развития», 19-21 апреля 2016 г., г. Красноярск. – Красноярск, 2016. - С.262-264.
163. Чугунова, Е. О. Применение бактериофагов для детекции бактерий (обзор литературы) / Е. О. Чугунова // Пермский аграрный вестник. - 2016. - №4(16). - С.121-125.
164. Abedon, S. T. Phage-Antibiotic Combination Treatments: Antagonistic Impacts of Antibiotics on the Pharmacodynamics of Phage Therapy? / S. T. Abedon // Antibiotics. – 2019. - Vol. 8, № 4. – P.182.
165. Abedon, S. T. Lysis from without / S. T. Abedon // Bacteriophage. – 2011. – Vol.1, № 1 - P. 46-49.
166. Balding, C. Diversity of phage integrases in *Enterobacteriaceae*: development of markers for environmental analysis of temperate phages / C. Balding, S. A. Bromley, R. W. Pickup, J. R. Saunders // Environmental Microbiology. – 2005. - Vol. 7. – P. 1558-1567.
167. Born, Y. The effectiveness of T5-like phages to control *Salmonella enterica* / Y. Born, L. Fieseler // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.12.
168. Bryan, D. T4 infection of stationary phase *E. coli*: the hibernation mode / D. Bryan, E. Kutter // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.13.
169. Callin, S. Mc. Metagenome analysis of Russian and Georgian Pyophage cocktails

and a placebo-controlled safety trial of single phage versus phage cocktail in healthy *Staphylococcus aureus* carriers / S. Mc. Callin, S. A. Sarker, S. Sultana, F. Oechslin, H. Brüssow // *Environ Microbiol.* – 2018. – Vol.20, № 9. – P. 3278-3293.

170. Callin, S. Mc. Safety analysis of a Russian phage cocktail: From MetaGenomic analysis to oral application in healthy human subjects / S. Mc. Callin, S. A. Sarker, C. Barretto, S. Sultana, S. Huq, L. Krause, R. Bibiloni, B. Schmitt, G. Reuteler, H. Brüssow // *Virology.* - 2013. – Vol. 443, № 2. – P. 187-196.

171. Capparelli, R. Bacteriophage therapy of *Salmonella enterica*: a fresh appraisal of bacteriophage therapy / R. Capparelli, N. Nocerino, M. Iannaccone, D. Ercolini, M. Parlato, M. Chiara, D. Iannelli // *J Infect Dis.* – 2010. – Vol. 201, №1. – P. 52-61.

172. Capparelli, R. Bacteriophage-resistant *Staphylococcus aureus* mutant confers broad immunity against staphylococcal infection in mice / R. Capparelli, N. Nocerino, R. Lanzetta, A. Silipo, A. Amoresano, C. Giangrande, K. Becker, G. Blaiotta, A. Evidente, A. Cimmino, M. Iannaccone, M. Parlato, C. Medaglia, S. Roperto, F. Roperto, L. Ramunno, D. Iannelli // *PLoS One.* – 2010. – Vol.5, № 7. – e11720.

173. Carvalho, C. A phage-based assay for detection of pathogens / C. Carvalho, S. Costa, L. Melo, S. Santos, F. Freitas, J. Azeredo // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.13.

174. Chan, B. Experimental phage therapy to treat a persistent *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with an aortic Dacron graft / B. Chan, P. E. Turner, S. Kim, H. R. Mojibian, J. Eleftheriades, D. Narayan // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.13-14.

175. Chan, B. K. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* / B. K. Chan, M. Sistrom, J. E. Wertz, K. E. Kortright, D. Narayan, P. E. Turner // Sci Rep. – 2016. – Vol.6. – e26717.
176. Chan, B. K. Phage therapypharmacology phage cocktails / B. K. Chan, S. T. Abedon // Adv. Appl. Microbiol. - 2012. - Vol.78, №1. - P.1–23.
177. Chatterjee, A. Bacteriophage Resistance Alters Antibiotic-Mediated Intestinal Expansion of *Enterococci* / A. Chatterjee, C. N. Johnson, P. Luong, K. Hullahalli, S. W. McBride, A. M. Schubert, K. L. Palmer, P. E. Jr. Carlson, B. A. Duerkop // Infect Immun. – 2019. – Vol.87, № 6. – P.1-14.
178. Colomer-Lluch, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry / M. Colomer-Lluch, L. Imamovic, J. Jofre, M. Muniesa // Antimicrob Agents Chemother. - 2011. - Vol.55, №10. - P.4908-4911.
179. Cox, C. Exploitation of phage-host interactions for rapid bacterial identification and antibiotic resistance determination / C. Cox // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.15.
180. Dąbrowska, K. Immunological reactions to bacteriophage applied in vivo / K. Dąbrowska // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.15.
181. Darling, A. E. ProgressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement / A. E. Darling, B. Mau, N. T. Perna / PLoS One. – 2010. – Vol. 25, №5(6). - e11147.
182. De Coster, W. NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data / W. De Coster, S. D'Hert, DT. Schultz, M. Cruts, Van C. Broeckhoven // Bioinformatics. – 2018. – Vol.34, № 5. – P. 2666-2669.

183. Debarbieux, L. Bacteriophages Can Treat and Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Lung Infections / L. Debarbieux, D. Leduc, D. Maura, E. Morello, A. Criscuolo, O. Grossi, V. Balloy, L. Touqui // J Infect Dis. – 2010. - Vol.201, № 7. - P.1096-1104.
184. Deghorain, M. The *Staphylococci* Phages Family: An Overview / M. Deghorain , L. V. Melderer // Viruses. - 2012. - Vol.4, №12. - P.3316-3335.
185. Di Luca, M. C. Lysogenic transfer of *mef(A)* and *tet(O)* genes carried by Phim46.1 among group A *Streptococci* / M. C. Di Luca, S. D'Ercole, D. Petrelli, M. Prenna, S. Ripa, L. A. Vitali // Antimicrob Agents Chemother. - 2010. - Vol.54, № 10. - P.4464-4466.
186. Domenech, M. In Vitro Destruction of *Streptococcus pneumoniae* Biofilms with Bacterial and Phage Peptidoglycan Hydrolases / M. Domenech, E. García, M. Moscoso // Antimicrob. Agents Chemother. - 2011. - Vol.55. - P.4144-4148.
187. Doskar, J. Bacteriophage transduction of mobile genetic elements in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* / J. Doskar, M. Varga, I. Maslanova, R. Pantucek, M. Mosa // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.87-90.
188. Doskar, J. Comparison of the lytic effect of staphylococcal polyvalent bacteriophages / J. Doskar, M. Varga, I. Kolackova, R. Karpiskova, I. Maslanova // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.16.
189. Fancello, L. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota / L. Fancello, C. Desnues, D. Raoult, J. M. Rolain // J. Antimicrob. Chemother. - 2011. - Vol.66, №11. - P.2448-2454.
190. Fernando, L. Phage Therapy in the Postantibiotic Era / L. Fernando, FL Altamirano Gordillo, J. J. Barr // Clin Microbiol Rev. – 2019. – Vol.32, №2. - e00066-18.

191. Fish, R. Resolving diabetic foot infections: compassionate use of staph phage SB-1 / R. Fish, E. Kutter, G. Wheat, M. Kutateladze, S. Kuhl // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.21.
192. Gigante, A. Mycobacteriophage Ms6 LysB: role on the mycobacteria lysis process / A. Gigante, C. Hampton, R. Dillard, J. Moniz-Pereira, E. Wright, M. Pimentel // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.21-22.
193. Gillis, A. Phage vB_BcyT_E283: a novel tectivirus infecting *Bacillus cytotoxicus* / A. Gillis, C. Michaux, J. Mahillon // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.22.
194. Goerke, C. Diversity of prophages in dominant *Staphylococcus aureus* clonal lineages / C. Goerke, R. Pantucek, S. Holtfreter, B. Schulte, M. Zink, D. Grumann, B. M. Bröker, J. Doskar, C. Wolz // Journal of bacteriology. – 2009. – Vol. 191, №11. – P. 3462–3468.
195. Gu Liu, C. Phage-Antibiotic Synergy Is Driven by a Unique Combination of Antibacterial Mechanism of Action and Stoichiometry / C. Gu Liu, S. I. Green, L. Min, J. R. Clark, K. C. Salazar, A. L. Terwilliger, H. B. Kaplan, B. W. Trautner, R. F. Ramig, A. W. Maresso // mBio. - 2020. - Vol.11, №4. - e01462-20.
196. Haq, I. U. I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review / I. U. I. Haq, W. N. Chaudhry, M. N. Akhtar, S. Andleeb, I. Qadri // Virology Journal. - 2012. - Vol.9, №9. - P.1-8.
197. Hock, L. The phage approach to control emetic *Bacillus cereus* / L. Hock, J. Mahillon // Материалы III научно-практической конференции с международным

участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.25.

198. Hong, Y.-P. Combining of Bacteriophage and *G. asaii* Application to Reduce *L. monocytogenes* on Fresh-Cut Melon under Low Temperature and Packing with Functional Film / Y.-P. Hong, J. W. Choi, J. H. Lee, R.-Y. Yang // Journal of Food and Nutrition Sciences. - 2015. - Vol.3, №1-2. - P.79-83.

199. Hyman, P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth / P. Hyman // Pharmaceuticals (Basel). – 2019. – Vol. 12, № 1. – P.35.

200. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. (Дата обращения: 11.11.2020).

201. Jarabkova, V. Phage endolysin: a way to understand a binding function of C-terminal domains a mini review / V. Jarabkova, L. Tisakova, A. Godany // Nova Biotechnologica et Chimica. - 2015. - Vol.14, №2. - P.117-134.

202. Kadija, E. Potential therapeutic applications of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Stab8 / E. Kadija, Z. Hobbs // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.26.

203. Knoll, B. M. Antibacterial Bioagents Based on Principles of Bacteriophage Biology: An Overview / B. M. Knoll, E. Mylonakis // Clin Infect Dis. - 2014. - Vol.58, №4. - P.528-534.

204. Koren, S. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation / S. Koren, B. P. Walenz, K. Berlin, J. R. Miller, H. N. Bergman, A. M. Phillippy // Genome Research. – 2017. - Vol.27, №5. – P.722-736.

205. Koren, S. De novo assembly of haplotype-resolved genomes with trio binning / S. Koren, A. Rhie, B. P. Walenz, A. T. Dilthey, D. M. Bickhart, S. B. Kingan, S. Hiendleder, J. L. Williams, T. P. L. Smith, A. M. Phillippy // Nat Biotechnol. – 2018. - Vol.10. – P.1038.

206. Kornienko, M. Contribution of *Podoviridae* and *Myoviridae* bacteriophages to the effectiveness of anti-staphylococcal therapeutic cocktails / M. Kornienko, N. Kuptsov, R. Gorodnichev, D. Bespiatykh, A. Guliaev, M. Letarova, E. Kulikov, V. Veselovsky, M. Malakhova, A. Letarov, E. Ilina, E. Shitikov // Sci Rep. - 2020. - Vol.10, №1. - e18612.
207. Kutter, E. Hot tales of T4's transition from host tophage metabolism / E. Kutter, G. Ray, D. Bryan / Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.30.
208. Leskinen, K. Characterization of vB_SauM-fRuSau02, a *Twort-Like* Bacteriophage Isolated from a Therapeutic Phage Cocktail / K. Leskinen, H. Tuomala, A. Wicklund, J. Horsma-Heikkinen, P. Kuusela, M. Skurnik, S. Kiljunen, H. Brüssow // Viruses. – 2017. - Vol.9, №9. - P.258.
209. Lin, Y. Synergy of nebulized phage PEV20 and ciprofloxacin combination against *Pseudomonas aeruginosa* / Y. Lin, Rachel Yoon Kyung Chang, Warwick J Britton, S. Morales, E. Kutter, Hak-Kim Chan // Int J Pharm. – 2018. – Vol.551, № 1-2. – P.158–165.
210. Mattila, S. On-Demand Isolation of Bacteriophages Against Drug-Resistant Bacteria for Personalized Phage Therapy / S. Mattila, P. Ruotsalainen, M. Jalasvuori // Front Microbiol. - 2015. - Vol.6. - P.1271.
211. Matuschka v. Greiffenclau, M. Artilysin - moving from topical to systemic applications in the clinic / M. Matuschka v. Greiffenclau // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.23.
212. Mazaheri Nezhad Fard, R. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in *enterococci* / R. Mazaheri Nezhad Fard, M. D. Barton, M. W. Heuzenroeder // Lett Appl Microbiol. - 2011. - Vol.52, №6. - P.559-564.

213. Melo, L. D. R. Characterization of a new *twortlikevirus* infecting *Staphylococcus epidermidis* that exhibits activity against biofilm and stationary bacterial populations / L. D. R. Melo, G. Pinto, F. Oliveira, A. Franca, H-W. Ackermann, A. M. Kropisnki, S. Sillankorva, J. Azeredo, N. Cerca // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.33.
214. Oechslin, F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy / F. Oechslin // Viruses. - 2018. – Vol. 10, № 7. – P.351.
215. Oliveira, A. A new phage endolysin as a powerful tool to detect and kill *Paenibacillus* larvae / A. Oliveira, S. B. Santos, D. R. L. Melo, J. Azeredo // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.35.
216. Oliveira, H. Capsule depolymerase activity of phages infecting the *Acinetobacter baumannii*- *calcoaceticus* complex / H. Oliveira, A. R. Costa, N. Konstantinidis, A. Nemec, M. Shneider, A. Dötsch, S. Sillankorva, J. Azeredo // Материалы III научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13 – 15 октября 2016 г., г. Москва. - Москва, 2016. - С.35-36.
217. Pantucek, R. Comparison of in vitro lytic activities of three bacteriophage preparations *stafal* *staphylon* and *pyobacteriophagum liquidum* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / R. Pantucek, P. Petras, J. Doskar, V. Ruzickova, J. Bostik, M. Mosa // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013, г. Ульяновск. – Ульяновск, 2013. - Т.II. - С.91-93.

218. Richards, G. P. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology / G. P. Richards // Bacteriophage. - 2014. - Vol.4, №4. - e975540.
219. Rubalskii, E. O. Integrative approach for control of temperate bacteriophages in phage-based products / E. O. Rubalskii, A. V. Aleshkin, S. S. Afanasiev, V. A. Aleshkin, Kh. M. Galimzyanov, A. R. Umerova, O. V. Rubalsky, O. N. Ershova, E. E. Rubalskaya, I. A. Kiseleva, S. S. Bochkareva, E. R. Zul'Karneevev, A. Kh. Akhmineeva, M. O. Rubalsky, I. O. Lunina, V. V. Uskov, M. M. Karnaukh, O. Yu. Borisova, N. T. Gadua, A. D. Teply, S. Rümke, Ch. Salmoukas, Ch. Kühn, A. Haverich // Астраханский медицинский журнал. - 2017. – Т.12, №3. – С.56-63.
220. 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 // Antimicrob Agents Chemother. – 2017. – Vol.61, №10. – e00954-17.
221. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. - Vol.30, №14. – P.2068-9.
222. Torres-Barceló, C. A Window of Opportunity to Control the Bacterial Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Combining Antibiotics and Phages / C. Torres-Barceló, F. I. Arias-Sánchez, M. Vasse, J. Ramsayer, O. Kaltz, M. E. Hochberg // PLoS One. – 2014. – Vol.9, №9. – e106628.
223. Torres-Barceló, C. The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria / C. Torres-Barceló // Emerg Microbes Infect. – 2018. - Vol. 7. – P.168.
224. Varga, M. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone / M. Varga, L.

- Kuntová, R. Pantucek, I. Maslanová, V. Ruzicková, Jirí Doskar // FEMS Microbiol Lett. - 2012. - Vol.332, №2. - P.146-152.
225. Weinbauer, M. G. Ecology of prokaryotic viruses / M. G. Weinbauer // FEMS Microbiology Reviews. – 2004. – Vol.28. - P.127–181.
226. Wick, R. R. Completing bacterial genome assemblies with multiplex MinION sequencing / R. R. Wick, L. M. Judd, C. L. Gorrie, K. E. Holt. // Microb Genom. – 2017. - Vol.3, №10. - e000132.
227. Wittebole, X. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens / X. Wittebole, S. D. Roock, S. M. Opal // Virulence. - 2014. - Vol.5, №1. - P.226-235.
228. Zhang, Q.- G. Phages limit the evolution of bacterial antibiotic resistance in experimental microcosms / Q.-G. Zhang, A. Buckling // Evol Appl. - 2012. - Vol.5, №6. - P.575-582.

Приложение 1

Анкета-опросник для пациентов, получающих медицинскую помощь в акушерском стационаре

Я, (ФИО роженицы) _____

получила медицинскую помощь в Муниципальном медицинском лечебно-профилактическом учреждении г. Тюмени «Родильный дом» № _____

Настоящим подтверждаю свое добровольное участие в анкетировании. Цели, задачи анкетирования мне разъяснены. Я согласна ответить на все вопросы.

Дата _____

Подпись _____

	Варианты ответа:	
Роды проводились путем кесарева сечения	да	нет
Производилось рассечение промежности во время родов сотрудниками акушерского стационара	да	нет
Проводилась медикаментозная стимуляция родов	да	нет
Выполнялось прикладывание ребенка к матери сразу после родов	да	нет
Соблюдалось прикладывание ребенка к груди матери в родовом зале	да	нет
Осуществлялся докорм новорожденного молочными смесями (роды первые)	да	нет
Осуществлялся докорм новорожденного молочными смесями (роды повторные)	да	нет

Примечание: подчеркнуть вариант правильного ответа