

На правах рукописи

Вакарина Арина Александровна

Литические свойства бактериофагов основных возбудителей бактериальных инфекций

1.5.11. – микробиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Тюмень – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Степанова Татьяна Федоровна

кандидат биологических наук

Рубальский Евгений Олегович

Официальные оппоненты:

Туйгунов Марсель Маратович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии, вирусологии, заведующий

Гаевская Наталья Евгеньевна - кандидат медицинских наук, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории бактериофагов, и.о. начальника отдела диагностических препаратов

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «__»_____ в__ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__»_____ 2022 году

Ученый секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Бактериофаги играют важную роль в поддержании «бактериального баланса». Анализ результатов изучения литических свойств фагосодержащих лекарственных препаратов показал большой диапазон чувствительности клинических значимых бактериальных изолятов, составляющий 15,4 - 84 % случаев (Алексанина Н.В., 2014; Завгородняя Е.Ф. и др., 2014; Гончар Н.В. и др., 2014; Григорова Е.В. и др., 2017; Тапальский Д.В., 2018; Баязитова Л.Т. и др., 2020). Эти данные свидетельствуют о необходимости мониторинга спектра литической активности коммерческих средств в отношении циркулирующих штаммов патогенных и условно-патогенных возбудителей инфекционных заболеваний, а также регулярного поиска новых видов бактериофагов (Власов В.В. и др., 2016; Тапальский Д.В. и др., 2018).

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 (МР «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике», 2014; Асланов Б.И., 2015). В различных исследованиях показана способность фагов к горизонтальному переносу генов резистентности к антимикробным препаратам (Varga M. et. al., 2012; Землянко О.М. и др., 2018), что обеспечивает формирование штаммов - возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, которые поражают в среднем от 5 до 15% госпитализированных пациентов, а в отделениях высокого риска до 40 % (Попова А.Ю., 2017). Этиологической причиной большинства инфекционных заболеваний с тяжелым течением являются ESCAPE – патогены (ВОЗ, 2017; <http://www.who.int/ru/>; Алешкин А.В. и др., 2018). Мероприятия по ликвидации инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, должны быть направлены на организацию предупреждения их возникновения и базироваться на установлении предвестников активизации взаимодействия биоэкологической системы (Покровский В.И., 1993; Черкасский Б.Л., 1990).

В связи со сложностью разработки и длительностью внедрения в практику новых антимикробных препаратов, а также растущей множественной резистентностью возбудителей бактериальных инфекций становится очевидной необходимость создания и применения комбинированных схем лечения бактериальных инфекций, в том числе с назначением бактериофагов (Мозговая Ю.А. и др., 2015). Для подтверждения возможности сочетания антибиотиков и бактериофагов с целью лечения бактериальных инфекций, актуально изучение влияния литических бактериофагов на чувствительность бактерий к антибиотикам.

Разработка унифицированного способа определения литической активности бактериофагов будет способствовать повышению эффективности лечения и профилактики различных бактериальных заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

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 (Debarbieux L. et. al., 2010; Лазарева Е.Б. и др., 2014; Белопольская Х.А. и др., 2014; Воронкова О.С. и др., 2014; Падруль М.М. и др., 2015; Алешкин А.В. и др., 2016; Акимкин В.Г., 2016; Воложанцев Н.В. и др., 2016; Асланов Б.И. и др., 2016; Чугунова Е.О., 2016; Chan V. et. al., 2016; Васильев Д.А. и др., 2019). Благодаря молекулярно-

генетическим технологиям определены маркеры, обеспечивающие дифференцировку бактериофагов на вирулентные (строго литические) и умеренные (Di Luca M.C. et. al., 2010; Colomer-Lluch M. et. al., 2011; Mazaheri Nezhad Fard R. et. al., 2011; Deghorain M. et. al., 2012; Васильев Д.А. и др., 2019; Зуева Л.П. и др., 2019). 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 (Fernando L. et. al., 2019). Анализ современных представлений показал отсутствие научных работ отечественных и зарубежных авторов, посвященных влиянию литических бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам.

Данные о литической активности имеющихся коммерческих бактериофагов представлены многими авторами (Алексанина Н.В., 2014; Завгородняя Е.Ф. и др., 2014; 2014; Doskar J. et. al., 2016; Тапальский Д.В. и др., 2018), 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 с оценкой в крестовой системе (Майская Л.М. и др., 2003; Алексанина Н.В., 2014; МР «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике», 2014). В литературе описан метод изучения активности бактериофага в расплавленном агаре Фюрта в модификации Фишера (Гольдфарб Д.М., 1961), а также способ с применением жидкого питательного бульона (Биргер М.О., 1982). Г.Е. Афиногенов (2014) предложил исследовать взаимодействие бактериофага и бактерии в монослое культуры клеток эмбриона человека. Представленные подходы по изучению литического потенциала бактериофагов имеют свои недостатки, 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 различия результатов выявлены по пиобактериофагу поливалентному в отношении штаммов *Staphylococcus 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 *Escherichia 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,

серологический, методы исследования бактериофагов, молекулярно-генетический, биоинформатический, аналитический и статистический (с программным обеспечением SPSS). Все исследования одобрены локальным этическим комитетом ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (протокол от 21 января 2019 г.).

Образцы биоматериала и объем исследованных штаммов бактерий

При подготовке диссертационной работы использованы штаммы бактерий, изолированные из биоматериала новорожденных, родильниц (6760 штаммов) и с объектов окружающей среды (621 изолят) акушерских стационаров. Включены биопробы от амбулаторных пациентов с острыми кишечными инфекциями, обратившихся за медицинской помощью в клиническое отделение ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (выделено 2268 штаммов). С целью выделения бактериофагов, активных в отношении штаммов *Proteus mirabilis*, изучено 75 проб почвы и воды водоемов г. Тюмени. Использовались коллекционные штаммы микроорганизмов («ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

Научно-исследовательская работа осуществлялась: в соответствии с договором на выполнение работ по организации и проведению санитарно-противоэпидемических мероприятий с ГБУЗ ТО «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).

Бактериофаги

Штаммы бактериофагов

В работе использованы монофаги, охарактеризованные молекулярными методами, из рабочих коллекций ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, а также выделенные из коммерческих бактериофагов. Это фаги *P. mirabilis*: 2207-№ 35, PRO-1, P16-2532 (семейство *Siphoviridae*); фаги *S. aureus*: H125/4037, П15/4037, H159/4040, Sa30 (семейство *Herelleviridae*, подсемейство *Twortvirinae*, род *Kayvirus*).

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*. Изучение чувствительности бактериальных штаммов осуществлялось к следующим коммерческим лекарственным препаратам: бактериофаг стафилококковый, 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 (АМП) проводилось с использованием дисков производителя ООО «Научно-исследовательский центр фармакотерапии», Россия.

Сыворотки

Изучение антигенной структуры бактериальных штаммов осуществлялось с применением иммуноглобулинов и сывороток диагностического производства ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова; ЗАО «ЭКОлаб», г. Электрогорск; ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» Федерального медико-биологического агентства.

Аналитические данные

Анкета-опросник была разработана в ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора, проанализированы данные от 6463 пациентов.

Бактериологические методы исследования

Выделение и идентификация микроорганизмов

Выделение штаммов бактерий проводилось в соответствии с приказом № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»; МУ № 04-723/3 «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями»; ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Идентификация осуществлялась классическим бактериологическим методом и методом масс-спектрометрии.

Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам проводилось диско-диффузионным методом в соответствии с 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.

Индекс полурезистентности бактерий (ИПР)

Оценка значения резистентности штаммов, циркулирующих в лечебном учреждении, рассчитывалась по формуле (Корначев А.С., 1992):

$$ИПР = \frac{ab}{b \times n} \times 100\%$$

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

Серологические методы исследования

E. coli с патогенными свойствами дифференцировали по О- и К- антигенам, серовары штаммов *Salmonella spp.* - по О- и Н- антигенам в соответствии со схемой Кауфмана-Уайта и инструкциями производителя.

Методы исследования бактериофагов

Титрование бактериофага методом агаровых слоев (метод Грациа) осуществляли с использованием агара Мюллера-Хинтона (Conda, Испания), в качестве поверхностного слоя применяли мягкий 0,7 % агар на основе сердечно-мозгового экстракта (Conda, Испания) (Васильев Д.А. и др., 2019).

Изучение литической активности фагов в жидкой питательной среде (Биргер М. О., 1982). В мясо-пептонном бульоне (Оболенск, Россия) совместно инкубировали бактериальную культуру и бактериофаг. Мутный бульон свидетельствовал о

размножении бактерий и низкой активности фага, опалесцирующий – о средней активности, прозрачная среда - о высокой литической способности бактериофага.

Изучение литической активности фагов на плотной питательной среде (Майская Л.М., 2003). На поверхности плотного питательного агара (Оболенск, Россия) распределялась суспензия культуры клинического изолята, после ее подсыхания наносилась одна капля бактериофага. Реакция лизиса бактерий на «++++» и «+++» креста свидетельствовала о высокой литической способности бактериофага, два креста «++» - умеренной, один «+» - слабой активности.

Выделение бактериофагов методом обогащения «с подсевом» осуществляли с применением питательного бульона (ГРМ-бульон, Оболенск, Россия), в котором соединяли пробу речной воды или почвы и суточную бульонную бактериальную культуру. Для фильтрации использовали фильтры 0,22 мкм (Merck, Германия) (Васильев Д.А. и др., 2019).

Метод индукции профага митомицином С выполняли путем добавления в питательный бульон (Оболенск, Россия) исследуемой бактериальной культуры и митомицина С (в подобранной концентрации - 0,5 мкг/мл). Для фильтрации использовали фильтры 0,22 мкм (Merck, Германия) (Васильев Д.А. и др., 2019).

Индукция профага ультрафиолетовым излучением проводили последовательным облучением бактериальных изолятов УФ лампой мощностью 30 Ватт. Для фильтрации использовали фильтры 0,22 мкм (Merck, Германия) (Васильев Д.А. и др., 2019).

Молекулярно-генетические методы исследования

ПЦР – исследования бактериофагов проводили на предмет отсутствия умеренных фагов, несущих известные гены интеграз стафилококковых умеренных фагов Salint – Sa7int, интеграз умеренных фагов PsP3, P2, Kp6, P21, Lambda, а также для установления таксономической принадлежности фагов. Выделение ДНК проводили при помощи набора К-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию ПЦР осуществляли на амплификаторе «Терцик» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Детекцию продуктов амплификации проводили методом горизонтального гель-электрофореза (Balding C. et. al., 2005; Goerke C. et. al., 2009; Rubalskii E.O. et. al., 2017).

Полногеномное нанопоровое секвенирование выделенных протейных бактериофагов осуществляли с использованием наборов реагентов Rapid Sequencing Kit и Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore, Великобритания) согласно протоколу производителя. Биоинформатическую сборку геномов проводили в следующем порядке: распознавание оснований – программное обеспечение Guppy, удаление адаптерных последовательностей – Porechop (Wick R.R. et. al., 2017), фильтрация качества прочтений – NanoFilt (De Coster W. et. al., 2018), сборка последовательностей *de-novo* – Canu v.1.9 (Koren S. et. al., 2017, 2018), выравнивание прочтений на собранные последовательности – UGENE v33 (Unipro, Россия). Аннотирование геномов проводили при помощи программы Prokka с пороговым значением e-value равным 10^{-6} (Seemann T., 2014). Множественное полногеномное выравнивание проводили при помощи алгоритмов MAFFT в программном обеспечении UGENE v33 (Unipro, Россия), blastn (NCBI, США) и progressiveMauve (Darling A.E. et. al., 2010), построение филогенетических деревьев – с использованием модели Tamura-Nei и метода присоединения соседей в программном обеспечении Geneious Prime (Biomatters Ltd., Новая Зеландия). 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 и Колмогорова-Смирнова.

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. Результаты 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 ТНИИКИП 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 МНИИЭМ 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 ГБУЗ ТО «Родильный дом № 2» и Е. В. Косоруковой заместителя главного врача по лечебной работе ГБУЗ ТО 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.).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 6 статей в рецензируемых изданиях, 1 статья - в другом издании, 2 тезиса в рецензируемых изданиях, 8 публикаций в сборниках научных трудов и материалах конференций. Получен 1 патент РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертационной работы изложены на 165 страницах машинописного текста и иллюстрированы 20 рисунками, 37 таблицами. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки темы, списка сокращений и списка литературы, включающего 228 источников, из которых 163 - отечественных и 65 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Предвестники активации процесса формирования антибиотикорезистентности штаммов - возбудителей бактериальных инфекций

В исследовании участвовали родильные дома г. Тюмени № 2 и № 3, ориентированные на технологию родовспоможения с участием семьи (РОУС). В наблюдение и статистический анализ включались женщины с нормально протекающим периодом беременности и родами без сопутствующих заболеваний. Среднее время пребывания в стационаре пациентов составляло четыре дня.

По данным анкет-опросников 6463 родильниц установлено: более агрессивное ведение родов (количество случаев кесарева сечения и рассечения промежности), частое не соблюдение первого контакта ребенка с матерью в родовых залах, высокая частота использования докорма искусственными смесями новорожденных в роддоме № 2.

Биологическая безопасность пациентов оценивалась по динамике зависимости зарегистрированных случаев инфекционных заболеваний и уровню показателя резистентности микробиоты пациентов акушерского стационара (Рисунок 1). Хи-квадрат Пирсона определил линейную зависимость перестройки популяций бактерий и фактов инфекционных болезней родильниц 67 % ($R^2=0,6714$) и новорожденных – 87 % случаев ($R^2=0,8796$).

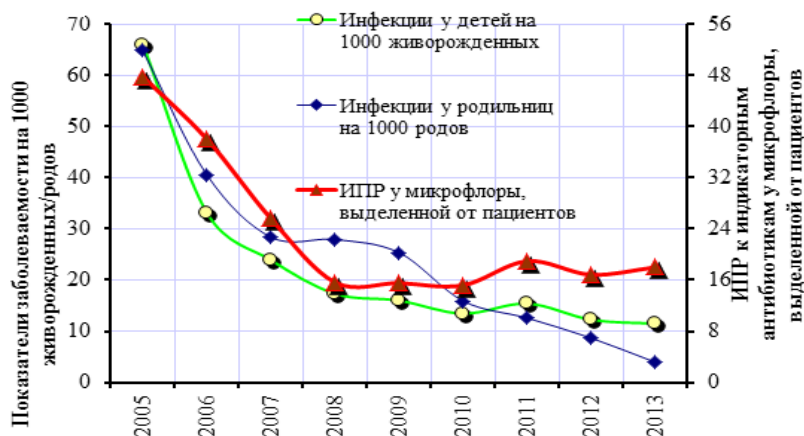


Рисунок 1 - Среднегодовые значения инфекционной заболеваемости пациентов и уровень резистентности их микробиоты (роддом № 2)

Качество оказания медицинской помощи и активность эпидемического процесса в

акушерском стационаре № 2, основанные на результатах наблюдений за формированием резистентности микробиоты пациентов и штаммов, изолированных с объектов производственной среды роддома, представлены на контрольных картах Шухарта (Рисунок 2).

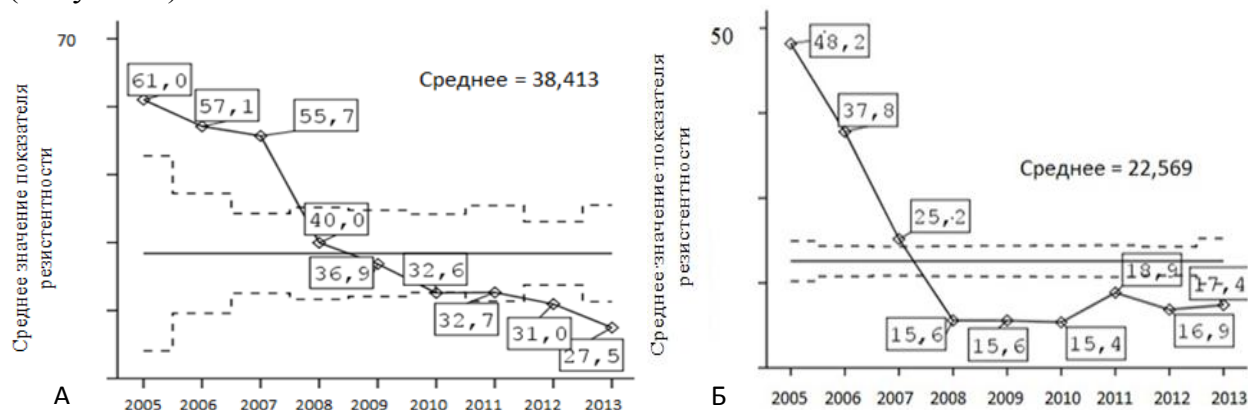


Рисунок 2 - Среднегодовые значения показателей резистентности микрофлоры объектов производственной среды (А) и микрофлоры, выделенной от пациентов (Б)

Активное проведение противоэпидемических мероприятий обеспечило синхронное снижение показателей резистентности микрофлоры, выделенной от пациентов, и с объектов окружающей среды, а также последующую стабилизацию механизмов формирования патогенного потенциала бактериальных штаммов в 2008-2011 гг. (расчетный показатель резистентности к АМП устойчиво расположился ниже верхней контрольной границы карт Шухарта). С 2011 года отмечены нежелательные отклонения в перестройке популяций микробиоты пациентов с нарастающими значениями резистентности, но не выходящими за рамки верхнего контрольного предела в соответствии с картой Шухарта (Рисунок 3), при этом показатели инфекционной заболеваемости родильниц и новорождённых были на стабильном уровне.

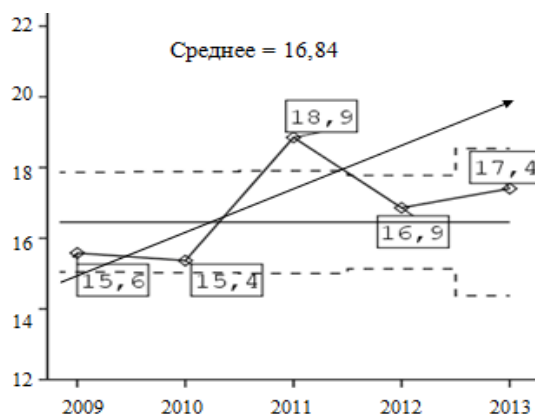


Рисунок 3 - Значения показателей резистентности бактериальных культур, выделенных от пациентов

Минимизация действия такого мощного фактора, как распространение возбудителей инфекционных заболеваний через объекты окружающей среды, позволила визуализировать формирование резистентности штаммов в локусах пациентов (Таблица 1). Установлено, что в роддоме № 2 преобладала микробиота, характеризующаяся большей резистентностью к АМП (95 % ДИ 1,27 [0,4 – 2,1]), обусловленная изолятами из содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка новорожденных. Уровень резистентности бактерий слизистой зева новорожденных роддома № 2 был ниже, чем у младенцев роддома № 3, что свидетельствует об отсутствии прямого влияния

микробиоты зева на резистентность бактерий содержимого толстой кишки и культуры пупочного остатка.

Таблица 1 – Структура микробиоценоза содержимого толстой кишки, кожи пупочного остатка новорожденных и уровень ее резистентности

	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]
толстая кишка 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 ($p < 0,05$)

В ходе исследования видового состава бактериальной флоры содержимого толстой кишки и кожи пупочного остатка определены различия между новорожденными роддомов № 2 и № 3 (Таблица 2). Наиболее резистентные субпопуляции штаммов были изолированы в акушерском стационаре № 2 и идентифицированы как бактерии рода *Streptococcus* и грамотрицательные бактерии.

Таблица 2 - Структура микробиоценоза содержимого толстой кишки, кожи пупочного остатка новорожденных и уровень ее резистентности

Субпопуляции бактерий	Род дом	Число культур	Среднее значение ИПР 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 ($p < 0,05$)

Ключевым отличием микробиоты новорожденных явилась частота выделения бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (кроме *E. coli*) и неферментирующих грамотрицательных бактерий, шансы обнаружения которых были в 2 раза (95 % ДИ [1,4 - 2,9]) выше, чем в роддоме № 3 (Таблица 3).

Таблица 3 – Частота встречаемости и показатель резистентности микрофлоры 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 ($p < 0,05$)

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

Таким образом, структура потенциальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обладающих селективными особенностями, необходимыми для выживания в условиях производственной среды акушерского стационара, представлена субпопуляциями клинических изолятов семейства *Enterobacteriaceae* (кроме *E. coli*) и неферментирующими грамотрицательными штаммами. Формирование резистентности бактерий осуществляется в кишечнике и на коже пупочного остатка новорожденных. Данные о предвестниках эпидемиологического процесса могут быть положены в основу разработки алгоритмов локального использования бактериофагов, направленных на профилактику инфекционной заболеваемости в акушерских стационарах.

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*, изолированных в период, характеризующийся становлением возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Методом обогащения «с подсевом» выделено 2 штамма протейных фагов, активных в отношении данных бактерий. В мягком агаре бактериофаги образовывали круглые бляшки, прозрачные, четкие, ровные, с ореолом, диаметром 3 мм. Негативные колонии трехкратно пассировались. Титр фагов составлял не менее 10^8 БОЕ/мл по методу Грациа. Бактериальные штаммы-продуценты, необходимые для наращивания бактериофагов, были протестированы на наличие профагов, интегрированных в геном клетки методами индукции митомицином С и ультрафиолетовым излучением. Изучение литических свойств выделенных бактериофагов в отношении штаммов *P. mirabilis*, изолированных от пациентов акушерского стационара № 2, показало их активность в 70 % случаев методом «spot-test».

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 протейных 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. Выравнивание генома фага *Proteus phage* P16-2532 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. Данные подтверждены кладограммами, построенными на основе выравнивания при помощи алгоритма MAFFT, отражающие генетическую дистанцию (Рисунок 4). Близкая гомология геномов бактериофагов вышеуказанного кластера подтверждается множественным выравниванием при помощи алгоритма progressiveMauve.

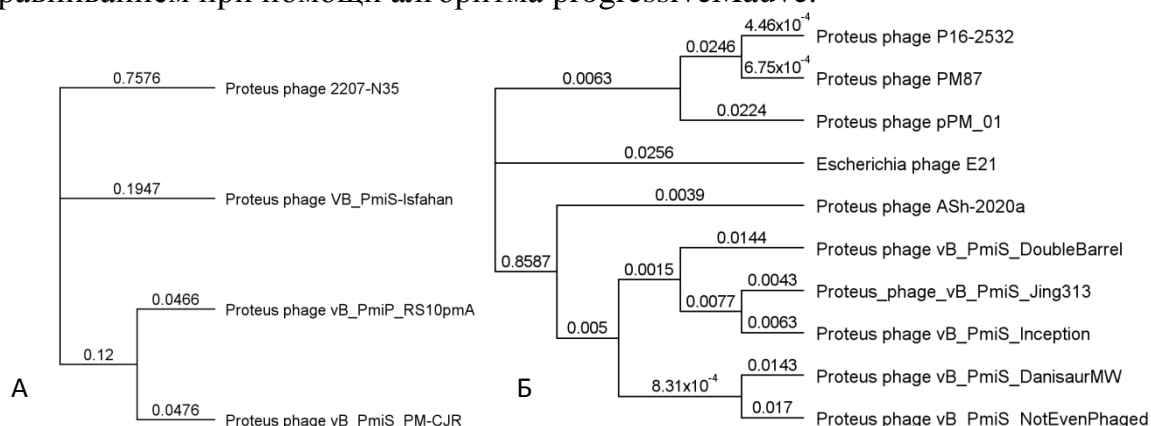


Рисунок 4 – Филогенетические деревья геномов известных бактериофагов, имеющих не менее 80 % идентичности с геномом фага *Proteus phage* 2207-№35 (А) и P16-2532 (Б)

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.

Взаимодействие специфических бактериофагов и клинических штаммов бактерий **Скрининговое исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий** **к антимикробным препаратам**

Предварительное (скрининговое) исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП проводилось с 97 бактериальными изолятами рода *Klebsiella* и 108 культурами *S. aureus*, выделенными из акушерского стационара. Суточные культуры оценивались на чувствительность к АМП диско-диффузионным методом, затем штаммы с идентичными бактериофагами инкубировались в течение 24 ч

в жидкой питательной среде. Определение жизнеспособных бактериальных клеток осуществляли высевом на плотную питательную среду. Из выросших колоний готовили инокулят с последующим повторением определения чувствительности бактерий к АМП. Обнаруженные различия интерпретаций значений зон задержки роста под влиянием АМП проанализированы с использованием критерия McNemar's test. Исследование влияния бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП установило формирование устойчивости штаммов *S. aureus* к гентамицину. Бактерии рода *Klebsiella* после инкубирования с гомологичными бактериофагами продемонстрировали увеличение количества изолятов, чувствительных к тетрациклину.

Влияние вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий к антимикробным препаратам

Для углубленного исследования влияния вирулентных бактериофагов на чувствительность бактерий были использованы 4 штамма бактериофага *S. aureus* и 3 штамма *P. mirabilis*. Фаги были протестированы на предмет отсутствия известных интеграз, гомологичных интегразам умеренных фагов, при помощи метода ПЦР. Высокий титр бактериофагов (не менее 10^8 БОЕ/мл по методу Грациа) 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* в мягком агаре образовывали прозрачные, четкие, ровные, круглые негативные колонии диаметром 1-2 мм (без ореола), протейные бактериофаги - круглые колонии, прозрачные, четкие, ровные, с ореолом, диаметром 3 мм.

Проведенное исследование методом «spot-test» определило бактериальные культуры (5 штаммов *S. aureus* и 10 изолятов *P. mirabilis*), литическая активность фагов к которым оценивалась по пятибалльной системе на три креста (+++) и характеризовалась как зона лизиса с единичными колониями вторичного лизиса. Для проведения экспериментальной работы по влиянию бактериофагов на чувствительность бактерий к АМП сформировано 9 пар (фаг/бактерия) со штаммами *S. aureus* и 11 пар с бактериями *P. mirabilis*.

Определение чувствительности бактерий к АМП выполняли согласно МУК 4.2.1890-04 и рекомендациям EUCAST комитета диско-диффузионным методом. Далее осуществляли совместное культивирование бактерий с бактериофагами в жидкой питательной среде. 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 высев 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.

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.

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». Количественные значения зон подавления роста бактерий до и после взаимодействия с вирулентными

бактериофагами в разрезе каждого антимиicrobialного препарата были представлены в виде медиан, верхнего и нижнего квартилей Q1 и Q3, кроме того проведено сравнение показателей с использованием непараметрического критерия Вилкоксона для связанных выборок. Анализ влияния бактериофагов на бактерии *S. aureus* и *P. mirabilis* выявил, что значения чувствительности штаммов к АМП до и после сокультивирования с вирулентными бактериофагами не обладали статистической значимостью.

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

Изучение литических свойств лекарственных средств в отношении бактериальных культур семейства *Enterobacteriaceae*, способных вызывать острые кишечные инфекции, проводилось методом «spot-test». Интенсивность лизиса бактерий «++++» и «+++» креста, свидетельствовала о высокой литической способности бактериофага.

Литическая активность сальмонеллезного бактериофага обеспечивала лизис почти 100 % исследованных культур бактерий рода *Salmonella*, представленных 18 серологическими вариантами. Пиобактериофаг поливалентный проявлял антибактериальный эффект в отношении 70,6±1,9 % штаммов *E. coli*, при этом колипротейный бактериофаг только в 55,2±1,4 % случаев (p<0,001). Зарегистрированные отличия по чувствительности культур *E. coli*, характеризующиеся лактозонегативными и гемолитическими свойствами, обладали статистической разницей. Литическая активность бактериофагов в отношении штаммов *E. coli* с выраженными патогенными свойствами (ОКА серогруппы), бактерий родов *Klebsiella* и *Proteus* представлены в таблице 4. Сравнительный анализ эффективности бактериофагов различных родов семейства *Enterobacteriaceae* показал, что 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 4 - Литическая активность бактериофагов в отношении различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*

Виды бактерий	Бактериофаги							
	Сальмонеллезный ¹		Коли протейный 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 ¹ - г. Н. Новгород, ² - г. Уфа

Наиболее частыми возбудителями кишечных инфекций с патогенными свойствами явились *E. coli* O25 (ОКД серогруппа) и *E. coli* O144 (ОКЕ серогруппа). В пятерку лидеров по частоте встречаемости вошли штаммы O151 (ОКЕ серогруппа), O1,

O26 (ОКВ серогруппа). В отношении данных культур исследуемые бактериофаги проявляли литическую активность от 66,7 % до 100,0 % случаев, исключение составил колипротейный бактериофаг (производство Н. Новгород). Он лизировал *E. coli* ОКВ серогруппы в 50 % случаев, низкий процент был зарегистрирован за счет *E. coli* O26 (количество устойчивых штаммов составило 75 %).

Таким образом, установлена более низкая литическая активность бактериофагов касательно бактерий родов *Klebsiella*, *Proteus* и *E. coli* O26.

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

Определение литической активности фагосодержащих лекарственных препаратов с использованием различных консистенций питательных сред по методам, предложенным Л. М. Майской и М. О. Биргером в отношении штаммов *S. aureus*, представлено в таблице 5, бактерий *K. pneumoniae* - в таблице 6.

Таблица 5 - Устойчивость бактерий *S. aureus* к бактериофагам

Бактериофаги	Мясо-пептонный агар			Мясо-пептонный бульон		
	Число культур	% устойчивых штаммов	95 % ДИ	Число культур	% устойчивых штаммов	95 % ДИ
Стафилококковый ³	159	27,7	[20,6 - 34,8]	165	37,6	[30,7 - 45,1]
Пиобактериофаг поливалентный ²	99	46,5*	[36,5 - 56,5]	103	24,3*	[15,9 - 32,8]
Интести-бактериофаг ¹	156	26,9	[19,8 - 34,0]	165	28,5	[21,5 - 35,5]
Пиобактериофаг комплексный ¹	55	38,2	[25,1 - 51,3]	62	40,3	[27,8 - 52,8]

Примечание: *наличие статистически достоверных различий; производитель¹-г. Н. Новгород, ² - г. Уфа, ³ - г. Пермь

Количество устойчивых штаммов *S. aureus* к пиобактериофагу поливалентному с использованием питательного агара составило 46,5 %, а в случае применения жидкой среды - 24,3 %. Расчет отношения шансов показал, что литическая способность бактериофагов с оценкой на плотном агаре в 2,7 раза меньше, чем при постановке метода с питательным бульоном (95% ДИ [1,5 - 4,9]).

Таблица 6 - Устойчивость бактерий *K. pneumoniae* к бактериофагам

Бактериофаг	Мясо-пептонный агар			Мясо-пептонный бульон		
	Число культур	% устойчивых штаммов	95 % ДИ	Число культур	% устойчивых штаммов	95 % ДИ
Клебсиелл пневмонии ³	62	67,7*	[55,8-79,6]	62	24,2*	[13,3-35,1]
Клебсиелл поливалентный ²	59	76,3*	[65,2-87,4]	59	15,3*	[5,9-24,7]
Пиобактериофаг поливалентный ²	49	83,7*	[73,2-94,3]	52	19,2*	[8,3-30,1]

Примечание: * наличие статистически достоверных различий; производитель² - г. Уфа, ³ - г. 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.

Таким образом, в ходе проведения статистического анализа дискретных данных и таблиц сопряженности выявлена разница в литических свойствах некоторых фагосодержащих лекарственных препаратов, изготовленных на различных производственных площадках, и определена необходимость мониторинга за активностью маточных штаммов бактериофагов в отношении циркулирующих возбудителей инфекций. Кроме того, сравнение количества устойчивых штаммов *S. aureus* в отношении пиобактериофага поливалентного и изолятов *K. pneumoniae* по всем изучаемым бактериофагам в жидких и на плотных питательных средах 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.

Разработка способа количественной оценки литической активности бактериофагов

В основе способа количественной оценки литической активности бактериофагов лежит измерение оптической плотности (ОП) жидкой среды взаимодействия бактерий и бактериофагов, определяемое фотометром Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Финляндия). Постановку опыта осуществляли в плоскодонных планшетах для иммуноферментного анализа. Для реализации поставленной задачи в ячейки для проведения испытания вносили мясо–пептонный бульон (Оболенск, Россия), изучаемый бактериофаг и суспензию бактериальной культуры в соответствии с таблицей 7. Дополнительно осуществляли постановку контролей: контроль стерильности бактериофага и контроль ростовых свойств бактериальной культуры.

Таблица 7 - Алгоритм определения количественной оценки литической активности бактериофагов

A	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	Определение показателя литической активности бактериофага
B	150 мкл бульона, 50 мкл бактериофага, 20 мкл суспензии бактерии 0,5 ЕД McFarland	
C	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	
E	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

Предотвращение высыхания среды обеспечивали покрытием микропланшета пленкой на клеевой основе, далее его инкубировали в течение 10-12 ч при температуре 37° С. По истечении данного периода защитную пленку удаляли, для считывания

результата использовали диапазон волны 450/620 нм, подобранный экспериментальным путем. Показатель литической активности (ЛА) рассчитывали по формуле:

$$\text{ЛА} = \text{ОП средняя (лунки А, В, С, D, E)} - \text{ОП фона (лунка F)}$$

Для определения фагоактивности и интерпретации числового показателя ЛА фага по ОП среды культивирования из каждой опытной ячейки микропланшета производили высеив на чашку Петри с мясо-пептонным агаром, равномерно распределяли шпателем и подсчитывали количество выросших колоний. Сопоставление результатов количества выросших единичных колоний при высеиве 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 бактерий (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 *E. coli*, выделенных от пациентов акушерского стационара.

Таким образом, разработанный способ количественной оценки литической активности бактериофагов, основанный на измерении оптической плотности среды взаимодействия комплекса «бактерия - бактериофаг», позволяет интерпретировать результат в числовых значениях. Получен патент на изобретение РФ № 2587636 от 20.06.2016 «Способ количественной оценки литической активности бактериофагов».

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 антагонистической 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 одновременно 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 (*Pseudomonas 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 рН, урожайность, устойчивость к хлороформу) для производства и использования в лечебных целях.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Катаева, Л.В. Оценка литической активности некоторых бактериофагов / Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Н.Ф. Нижегородцева // Материалы международной научно-практической конференции «Бактериофаги: Теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 23-25 апреля 2013г., г. Ульяновск. - Ульяновск, 2013. – Том II. - С. 17-22.
2. **Корначев, А.С. Оценка угроз колонизации пациентов акушерских стационаров штаммами с высокой устойчивостью к антибиотикам в акушерских стационарах, различающихся характером вскармливания новорожденных / А.С. Корначев, А.А.**

Вакарина, Л.В. Катаева, М.К. Грибоедова, Е.В. Косорукова // Биозащита и биобезопасность. - 2014. - Т. VI, № 1(18). - С. 30-39.

3. Вакарина, А.А. Оценка угроз колонизации пациентов акушерских стационаров резидентными штаммами с высокой устойчивостью к антибиотикам / А.А. Вакарина, А.С. Корначев, Л.В. Катаева // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т.4, № 1. - С. 56-57.

4. Ребещенко, А.П. Подходы к оценке результативности системы биологической безопасности акушерских стационаров / А.П. Ребещенко, А.С. Корначев, А.А. Вакарина, Л.В. Катаева // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Т. 4, №1. - С. 88.

5. Катаева, Л.В. Возможность применения бактериофагов для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии / Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Т.Ф. Степанова, Л.А. Бычкова // Инфекция и иммунитет. - 2014. - Специальный выпуск, сентябрь. - С. 84-85.

6. Вакарина, А.А. Структура и характеристика микроорганизмов, колонизирующих новорожденных, включая их резистентность к антибиотикам / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, О.В. Посоюзных // Дезинфекция. Антисептика. - 2014. - Т. 5, № 4 (20). - С. 52-57.

7. Вакарина, А.А. Рациональные аспекты использования бактериофагов / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, Н.Ф. Карпухина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - № 5. - С.76-79.

8. Катаева, Л.В. Литическая активность бактериофагов в отношении возбудителей острых кишечных инфекций / Л.В. Катаева, А.А. Вакарина, Т.Ф. Степанова, К.Б. Степанова, Л.А. Бычкова // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. - № 3 (264). - С. 39-42.

9. Вакарина, А.А. Актуальность и перспективы применения бактериофагов / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева // В сборнике: Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней, 24-25 сентября 2015 г., г. Тюмень. – Тюмень, 2015. - Т. 1. - С. 45-47.

10. Вакарина, А.А. Структура бактерий, колонизирующих новорожденных и формирование их резистентности / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, А.С. Корначев // В сборнике: Итоги и перспективы изучения проблем инфекционных и паразитарных болезней, 24-25 сентября 2015 г., г. Тюмень. – Тюмень, 2015. - Т. 1. - С. 48-53.

11. Вакарина, А.А. Методы определения чувствительности бактерий к бактериофагам / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», 8-10 декабря 2015 г., г. Санкт-Петербург – Санкт-Петербург, 2015. - С. 99-101.

12. Вакарина, А.А. Количественная оценка литической активности бактериофагов / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова // 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. – Нижний Новгород, 2016. - С. 130-135.

13. Вакарина, А.А. Бактериофаги. Современные аспекты их применения / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева // В сборнике: Важнейшие вопросы инфекционных и паразитарных болезней, 2016 г., г. Тюмень. – Тюмень, 2016. - С. 28-36.

14. Вакарина, А.А. Антибиотикограмма бактерий рода *Klebsiella* и *Staphylococcus aureus* под влиянием специфических бактериофагов / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова // Материалы IV научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в

медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24 - 26 сентября 2018 г., г. Нижний Новгород. – Нижний Новгород, 2018. - С. 40.

15. Вакарина, А.А. Влияние бактериофагов на чувствительность условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам / А.А. Вакарина, Л.В. Катаева, Т.Ф. Степанова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2019. - № 2. - С. 3-7.

16. Вакарина, А.А. Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий *Staphylococcus aureus* / А.А. Вакарина, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Ф. Степанова, И.А. Киселева, Л.В. Катаева // Астраханский медицинский журнал. – 2020. – Т. 15, № 4. – С. 29-39.

17. Вакарина, А.А. Влияние вирулентных бактериофагов на антибиотикочувствительность бактерий вида *Proteus mirabilis* / А.А. Вакарина, А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Т.Ф. Степанова, И.А. Киселева, Л.В. Катаева, Э.Р. Зулькарнеев, Р.С. Календр // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова - 2021. – Т. 17, № 2. – С. 18 -25.

Патент

18. Патент 2587636 Российская Федерация, МПК C12Q 1/70 (2006.01), C12Q 1/02 (2006.01). Способ количественной оценки литической активности бактериофагов / Катаева Л.В., Вакарина А.А., Степанова Т.Ф. заявитель и патентообладатель: ФБУН ТНИИКИП Роспотребнадзора (RU). - № 2015107203/10; заявл. 02.03.2015; опубл. 20.06.2016., Бюл. № 17. - 9с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АМП	- антимикробные препараты
БОЕ	- бляшкообразующая единица
ВОЗ	- Всемирная организация здравоохранения
ДИ	- доверительный интервал
ЕД	- единицы
ИПР	- индекс полирезистентности к индикаторным антибиотикам
КОЕ	- колониеобразующая единица
ЛА	- литическая активность
ОП	- оптическая плотность
р	- вероятная справедливость нулевой гипотезы
РОУС	- родовспоможение, ориентированное на участие семьи
ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ	- сыворотки диагностические эшерихиозные, содержащие агглютинины к О - и К - антигену
<i>E. coli</i> (gem+)	- <i>E. coli</i> гемолитические
<i>E. coli</i> lac-	- <i>E. coli</i> лактозонегативные
EUCAST	- Европейский комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам
М	- средняя арифметическая величина
Me	- медиана
Q	- критерий МакНемара
Q1-Q3	- нижний и верхний квартили
SD	- стандартное отклонение
SPSS	- статистическая система для научных исследовательских задач