

*На правах рукописи*

**Федотова Ольга Семеновна**

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

**1.5.11. Микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Екатеринбург – 2022

Работа выполнена в Екатеринбургском научно-исследовательском институте вирусных инфекций Федерального бюджетного учреждения науки Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент

**Захарова Юлия Александровна**

**Официальные оппоненты:**

**Летаров Андрей Викторович** – доктор биологических наук, Институт микробиологии имени С.Н. Виноградского Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория вирусов микроорганизмов, заведующий

**Исаева Гузель Шавхатовна** – доктор медицинских наук, доцент, Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по инновационному развитию

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург)

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 года 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 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор

**Борисова Ольга Юрьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Среди микроорганизмов – возбудителей гнойно-септических инфекций человека наиболее значимыми являются неферментирующие глюкозу в анаэробных условиях грамотрицательные бактерии, в их числе лидирующие место занимают *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* (Козлов Р.С. и др., 2015; Labarca J.A. et. al., 2016; Mac Vane S.H., 2017). Способность *A. baumannii* и *P. aeruginosa* формировать госпитальные популяции с резистентностью к различным классам антибиотиков, ряду дезинфицирующих средств существенно снижает эффективность лечебно-профилактических мероприятий, приводит к формированию эпидемических очагов гнойно-септических инфекций с высокой летальностью пациентов из групп риска (Сергео Е. et. al., 2016; Lim C.L.L. et. al., 2018; Тапальский Д.В., 2019).

В качестве альтернативных антибиотикам средств предлагается использование бактериофагов с избирательной активностью к бактериальным клеткам. В условиях глобального роста антибиотикорезистентности бактериофаги могут стать эффективными средствами для лечения и профилактики многих бактериальных инфекций (Międzybrodzki R. et. al., 2012; Зуева Л.П. и др., 2014; Асланов Б.И., 2015; Gorski A. et. al., 2016).

Проблема повышения эффективности препаратов бактериофагов предполагает не только использование их комбинаций, но и разработку принципиально новых композиций против актуальных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, прежде всего, вызванных *A. baumannii* и *P. aeruginosa*. Вместе с тем, в России отсутствует препарат бактериофага против *A. baumannii*, что ставит приоритетной задачей его разработку и широкое применение (в том числе в форме комбинаций с другими актуальными фагами) в клинических, диагностических и эпидемиологических целях, включая внутривидовое типирование микроорганизмов, которое активно проводилось с использованием бактериофагов для дифференциальной диагностики актуальных госпитальных патогенов, начиная с 60-х годов XX века (Алешкин А.В., 2015).

В настоящее время при внутривидовой идентификации внутрибольничных штаммов микроорганизмов акцент сделан на современные молекулярно-генетические методы (ПЦР, мультилокусное и полногеномное секвенирование) (Куракин Э.С., 2011; Воронина О.Л. и др., 2016). Однако, по-прежнему во многих медицинских организациях в качестве основного метода используют оценку антибиотикограммы. На фоне растущей антибиотикорезистентности данный метод оценки становится малоэффективным. Вместе с тем активная циркуляция в медицинских организациях штаммов внебольничного и внутрибольничного происхождения от пациентов, сотрудников и из внешней среды существенно затрудняет проведение эпидемиологической диагностики с определением интенсивности, временных и пространственных границ эпидемических очагов, установлением путей и факторов передачи (Фельдблюм И.В. и др., 2011).

### Степень разработанности темы исследования

В Российской Федерации и за рубежом накоплен значительный опыт в изучении бактериальных инфекций, вызванных представителями неферментирующих

грамотрицательных бактерий – *P. aeruginosa* и *A. baumannii* (Новицкая Н.В., 2010; Тапальский Д.В. и др., 2010; Покровский В.И. и др., 2011; Willyard С., 2017; Голошва Е.В. и др., 2019).

Ведутся активные разработки и усовершенствование антибактериальных препаратов, в частности бактериофагов против данных микроорганизмов. На сегодняшний день выделены и описаны вирулентные бактериофаги *A. baumannii* AB1 (Yang H. et. al., 2010), фаг vB\_AbaM-IME-AB2 (Peng, F. et. al., 2014), AP22 (Попова А.В. и др., 2012), vB\_AbaP\_AS11 и vB\_AbaP\_AS12 (Popova A.V. et. al., 2017), которые преимущественно используют с экспериментальной и диагностической целью, в том числе для идентификации представителей этого вида. При этом авторы указывают на узкий спектр их литической активности (Попова А.В. и др., 2012). Известно, что в настоящее время фармацевтическая промышленность выпускает коммерческий препарат для лечения и профилактики гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний, вызванных синегнойной палочкой – «Бактериофаг синегнойный жидкий».

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

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

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

**Задачи исследования:**

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

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

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

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

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

#### **Научная новизна работы**

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

Из нижних отделов дыхательных путей, раневого отделяемого пациентов и сточных вод многопрофильного стационара выделен, в последующем охарактеризован бактериофаг *Acinetobacter baumannii* семейства *Autographiviridae*. Анализ генома фага *Acinetobacter phage\_vB\_AbaP\_PE14* депонирован в международную базу GenBank № OL964948. На его основе получен комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный.

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

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

С использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный и оценки минимальной подавляющей концентрации (МПК) к антибиотикам усовершенствован метод внутривидового типирования *P. aeruginosa*, получена микробиологическая панель для проведения идентификации распространенных сиквенс-типов (ST 208; ST 944; ST 1167) полирезистентных штаммов *A. baumannii*.

#### **Теоретическая и практическая значимость исследования**

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

Результаты исследований, полученные в ходе разработки комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный, способствуют расширению теоретических

основ микробиологии в области создания эффективных лекарственных и профилактических средств, что имеет важное народно-хозяйственное значение.

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

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

Сформирована рабочая коллекция штаммов бактерий – продуцентов бактериофага *A. baumannii*, для дальнейшего промышленного получения лечебно-профилактического препарата ацинетобактерного и ацинетобактер-синегнойного бактериофага.

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

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

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

### **Методология и методы исследования**

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

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

исследования, использованы методы обработки информации и статистического анализа.

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

### **Материалы исследования**

Биологические образцы от пациентов и пробы из объектов внешней среды медицинских организаций забирались врачами различных подразделений в рамках соглашений (ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, ФБУЗ ПК «КМСЧ № 1» – г. Пермь; МБМУ «Городская Больница № 3» – г. Соликамск; МАУ «ГКБ 14», МАУ «ДГБ № 8» – г. Екатеринбург; ГБУЗ СО «Полевская ЦГБ» – Свердловская область).

Аналитические данные (18693 микробиологических исследований) получены на основе сведений из ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, МБМУ «Городская Больница № 3» в виде годовых отчетных форм Пермского края (ф.30) (Постановление Госкомстата России от 4 сентября 2000 г. №76 «Об утверждении статистического инструментария для организации Минздравом России статистического наблюдения за деятельностью медицинских учреждений»).

Типовые штаммы. В качестве контроля при постановке микробиологических тестов использовали четыре референс-штамма из коллекции ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ: *A. baumannii* ATCC 19606, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Клеточные культуры. В эксперименте по изучению специфической активности бактериофагов использовали диплоидную клеточную линию ЛЭЧ-3, полученную из нормальной ткани легкого эмбриона человека. Клеточная культура находится в коллекции ЕНИИВИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Бактериофаги. Для получения комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный, вторым компонентом был взят коммерческий бактериофаг «Бактериофаг псевдомонас аэругиноза (синегнойный)» с. Н11 от 11.2017 г. производства НПО «Микроген» г. Пермь. В эксперименте по изучению специфической активности бактериофагов с использованием клеточных культур использовали коммерческий «Бактериофаг Стафилококковый» с. Н 92 от 05.2018 г. производства НПО «Микроген» г. Пермь.

### **Методы исследования**

Микробиологические методы. Идентификацию *A. baumannii* и *P.aeruginosa* осуществляли по культуральным, тинкториальным, морфологическим, биохимическим свойствам, согласно стандартным методикам, в том числе с использованием коммерческого набора «NEFERMtest 24». Оценку чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом и методом серийных разведений (с оценкой минимальной подавляющей концентрации) руководствовались МУК 4.21890-04 и EUCAST (2018). Оценку интенсивности формирования биопленок проводили с использованием 96-луночных планшетов, по степени окраски 1% раствором кристаллического фиолетового. Чувствительность к анилиновым красителям определяли диффузионным («чашечным») методом. При изучении чувствительности к дезинфицирующим средствам руководствовались МУ 3.5.1.3439-17.

Методы исследования бактериофагов. С целью выделения бактериофагов, лизирующих штаммы *A.baumannii*, исследовали различные образцы биологического материала, смывы с объектов внешней среды стационаров, а также пробы сточных вод. При оценке чувствительности штаммов *A. baumannii* и *P.aeruginosa* к бактериофагам использовали диффузионный метод (спот-тест). Адаптацию слаболизирующихся фагами штаммов *A. baumannii* проводили путем последовательных селектирующих пассажей. Определение титра бактериофага осуществляли методом агаровых слоев по Грациа и в жидкой среде по методу Аппельмана. Скорость адсорбции, латентный период и средний урожай фаговых частиц бактериофагов определяли методикой, описанной М. Адамс (1961). При электронной микроскопии бактериофагов *A.baumannii*, *P.aeruginosa* использовали углеродные пленки-подложки, обработанные тлеющим разрядом в вакууме. Визуализацию объектов проводили на электронном микроскопе «Hitachi H-300» (Япония).

Молекулярно - генетические методы. Для выявления генов расширенного спектра БЛРС (*bla*<sub>СТХ-М</sub> и *bla*<sub>ТЕМ</sub>) применяли метод ПЦР. В работе были использованы праймеры (СТХ-М/Ф, СТХ-М/Р, ТЕМ/Ф, ТЕМ/Р). Выявление генов карбапенемаз проводили в режиме мультиплексной ПЦР в реальном времени с использованием диагностических наборов «АмплиСенс® MDR A.b.-ОХА-FL» (ОХА-23, ОХА-40, ОХА-58), «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (VIM, IMP, NDM), «АмплиСенс® MDR KPC/ОХА-48-FL» (KPC, ОХА-48) производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Секвенирование штаммов *A.baumannii* осуществляли с использованием наборов реагентов и оборудования фирмы Applied Biosystems (США) по методике, описанной производителем. Полученные в результате секвенирования нуклеотидные последовательности обрабатывали с помощью программы SeqMap. Сиквенс-тип (ST) определяли на основании комбинации аллелей с использованием оксфордской схемы. Штаммы, находящиеся в базе данных, группировали в клональные комплексы на основании кластеризации методом eBURST (<http://eburst.mlst.net/>) для *A. baumannii*. Полногеномное секвенирование генома бактериофага *A.baumannii* выполняли на платформе MiSeq, используя набор Nextera DNA library preparation kit (Illumina, San Diego, CA, USA). Полученные последовательности собраны в единый контиг программой SPAdes v. 3.13

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

Геном бактериофага аннотировали с помощью Prokka, используя встроенные базы данных. Предсказание функций, закодированных в геноме белков, выполняли с помощью поиска BLAST по известным гомологичным последовательностям и



сравнения схожих мотивов HMM с помощью онлайн-сервисов HHpred и Phyre2 с использованием баз данных SCOPe70\_2.07, ECOD\_ECOD\_F70 и UniProt-SwissProt-viral70. В качестве критерия достоверного сходства BLAST использовали величину E-value  $<10^{-5}$ , в качестве критерия достоверного сходства сравнения HMM использовали величины Phyre2 «confidence» и HHpred «probability» более 95%. Генетическую карту формировали с помощью программы Geneious Prime <https://www.geneious.com/>.

### **Личное участие автора в получении результатов**

Личный вклад соискателя заключается в непосредственном участии на всех этапах выполнения работы. Автор самостоятельно изучил отечественные и зарубежные литературные источники по теме работы. Лично выделил и охарактеризовал бактериофаг *A. baumannii*, получил комплексный бактериофаг ацинетобактер-синегнойный, изучил его характеристики, выполнил исследования по внутривидовой идентификации полирезистентных штаммов и разработал метод оценки специфической активности бактериофагов с использованием клеточных культур.

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

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

### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

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

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

3. Способ типирования *P. aeruginosa* с изучением минимальной подавляющей концентрации антибиотиков и использованием бактериофага ацинетобактер-синегнойный, а также разработанная микробиологическая панель для дифференцирования полирезистентных штаммов *A. baumannii* сиквенс-типов ST

1167, ST 208, ST 944 являются перспективным направлением внутривидовой идентификации микроорганизмов.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

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

Первичная научная документация проверена комиссией (акт проверки от 01.10.2019г.). Работа выполнена в рамках НИР: «Разработка и изучение фармакологических свойств медицинских иммунобиологических препаратов на основе биологически активных веществ, продуцируемых диплоидными клетками животного происхождения. Изучение возможностей использования клеточных культур для биотехнологии», регистрационный номер АААА-А16-116061710034-6, дата регистрации 17.06.2016г.

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

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

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 научных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых изданиях, 1 – в другом издании, 5 тезисов – в рецензируемых изданиях, 9 тезисов – в материалах конференций, получен 1 патент на изобретение РФ.

**Объем и структура диссертации.** Материалы диссертационной работы изложены на 143 страницах компьютерного текста, иллюстрированы 29 таблицами и 18 рисунками. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 2 главы результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, включающего 223 источника, из них 140 – зарубежных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Получение комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный. Создание музейной коллекции штаммов бактерий – продуцентов бактериофага *Acinetobacter baumannii*. Оценка чувствительности штаммов к антибиотикам и к комплексному бактериофагу**

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

В период с 2013 – 2017 гг. проведен анализ результатов бактериологических исследований 18693 биологических образцов, выделенных от пациентов из отделений многопрофильных стационаров и поликлинического звена, а также с объектов внешней среды. Частота встречаемости НГОБ в биологических материалах от пациентов и объектов внешней среды за 5 лет составила 25,8 % (95% ДИ [25,0 – 26,5]) с интервалом колебания показателя от 17,2 (95% ДИ [15,9– 18,7]) в 2015 г. до 36,0 (95% ДИ [34,5– 37,6]),  $p=0,0001$  в 2017 г.

Из объектов внешней среды представители НГОБ были выделены в 213 (6,3%) случаев. В результате проведенных исследований установлено, что чаще других в биологическом материале и на объектах внешней среды обнаруживали *P. aeruginosa* – 1135 (33,6%) и *A. baumannii* – 1041 (30,8%). Меньшую долю занимали *S. maltophilia* (13,2%). Удельный вес других представителей не превышал 7,9% – *A. lwoffii*, 4,1% – *A. junii*, 2,9% – *A. pittii*, 2,6% – *A. faecalis*, 2,4% – *P. alcaligenes*, 2,2% – *A. calcoaceticus*, 0,3% – *P. putida*. *A. baumannii* чаще встречался у пациентов (38,2% случаях), *P. aeruginosa* – в объектах внешней среды (53,1 %).

Для оценки чувствительности *P. aeruginosa* (n=1135) к антибактериальным препаратам были проанализированы данные статистической отчетной формы (ф. 30). Штаммы *P. aeruginosa* обладали высокой чувствительностью к полимиксину –  $96,8 \pm 0,5\%$  и цефоперзон/сульбактаму –  $93,8 \pm 0,7\%$ . Чувствительность к цефепиму составила  $73,6 \pm 1,3\%$ , имипенему –  $67,4 \pm 1,4\%$ , цефтазидиму –  $67,4 \pm 1,4\%$ . Ниже уровень чувствительности оказался к амикацину –  $51,8 \pm 1,5\%$ , цiproфлоксацину –  $45,7 \pm 1,5\%$ , цефоперазону –  $40,7 \pm 1,5\%$  и левофлоксацину –  $35,8 \pm 1,5\%$ .

Мониторинг чувствительности штаммов *A.baumannii* (n=1041) аналогично выявил её высокий уровень только к цефоперазон/сульбактаму –  $98,0 \pm 0,4\%$  и полимиксину –  $97,4 \pm 0,5\%$ . К имипенему чувствительность составила  $53,7 \pm 1,5\%$ , цефтазидиму –  $47,4 \pm 1,5\%$ , левофлоксацину –  $40,9 \pm 1,5\%$ , цефепиму –  $36,7 \pm 1,5\%$ , амикацину –  $32,7 \pm 1,4\%$ , цiproфлоксацину –  $27,3 \pm 1,4\%$ . Самый низкий уровень чувствительности установлен к гентамицину –  $14,8 \pm 1,1\%$ .

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

С целью выделения бактериофага *A.baumannii* исследовано 152 образца биологического материала, полученного в ОРИТ хирургического и терапевтического профиля, а также СПО. В их числе от пациентов – 102 (67,1%) пробы, с объектов больничной среды – 50 (32,9%). Частота выделения бактериофагов составила 5,3 на 100 проб исследуемого материала: 6 фаголизатов – из биологического материала (БАЛ и раневое отделяемое), 2 – из объектов внешней среды (сточные воды). Исходя из того, что все 8 полученных фаголизатов обладали однотипными фенотипическими свойствами, объединили их в один фаголизат.

По результатам электронного микроскопического исследования установлено, что представленный бактериофаг по морфологическим признакам принадлежал к морфогруппе С1 семейства *Podoviridae* (Рисунок 1 А).

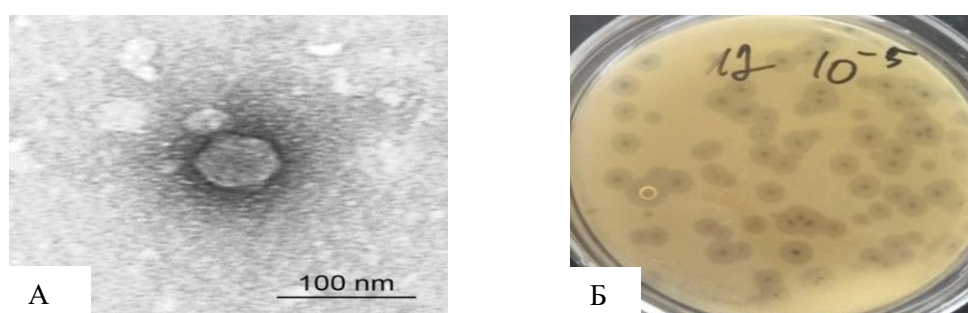


Рисунок 1 – Свойства бактериофага *A.baumannii*: электронная микроскопия бактериофага (А) («Hitachi Н-300, 5 000-кратное увеличение); негативные колонии бактериофага при титровании по методу Грация на газоне бактериальной культуры в разведении фага  $10^{-5}$  (Б)

На бактериальном газоне чувствительного к фагу штамма *A. baumannii* (№12) ацинетобактерный бактериофаг формировал круглые прозрачные негативные колонии с ровными краями диаметром 2-3 мм, окружённые непрозрачным ореолом (Рисунок 1Б).

Анализ генома бактериофага, при полногеномном секвенировании установил, что фаг является представителем вида *Acinetobacter virus AS11*, рода *Friunavirus*, подсемейства *Beijerinckvirinae*, семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales* (ictvonline.org). Линейный двухцепочечный ДНК-геном бактериофага состоял из 41655 пар оснований (bp) нуклеотидных последовательностей. Полученный бактериофаг депонировали в международный банк данных NCBI GenBank OL964948.

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

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

При формировании рабочей коллекции штаммов бактерий-продуцентов бактериофага *A.baumannii* изучено 1320 бактериальных культур (2014-2020 гг.) из двух городов РФ (Пермь, Екатеринбург). На этапе скрининга методом «спот-тест» к полученному и охарактеризованному фаголизату ацинетобактерного бактериофага нечувствительными (резистентными) оказались 912 штаммов *A. baumannii* (69,1%),

слабочувствительными – 272 (20,6%), высокочувствительными – 136 (10,3%).

Для повышения уровня чувствительности штаммов и увеличения активности маточного бактериофага проводили адаптацию (n=272) слабочувствительных штаммов путем последовательных селективирующих пассажей с бактериофагом под контролем оценки специфической активности. В процессе адаптации количество штаммов, лизирующихся маточным бактериофагом в титре не ниже  $10^{-5}$  по методу Аппельмана, увеличилось на 28,4 % и достигло 190.

Штаммы бактерий – продуценты бактериофага *A. baumannii*, в количестве 190, были протестированы на наличие генов, кодирующих карбапенемазы групп ОХА-23, ОХА-40, ОХА-58, NDM, IMP и VIM методом ПЦР. У всех из них гены указанных карбапенемаз отсутствовали.

Коллекция, включающая 190 штаммов бактерий – продуцентов бактериофага и адаптированный маточный ацинетобактерный бактериофаг, явились основой для получения жидкой формы бактериофага.

#### Получение комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный

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

Коммерческий препарат синегнойного бактериофага предварительно подвергли электронной микроскопии и визуализировали в нем присутствие трех видов бактериофага (Рисунок 2).

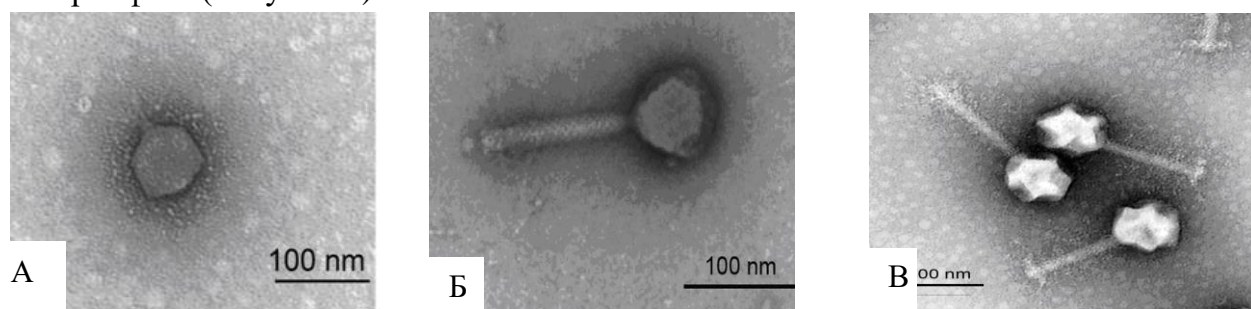


Рисунок 2 – Электронная микроскопия препарата бактериофага *P. aeruginosa*: фА) КМВ (семейство *Podoviridae*); Б) РВ1(семейство *Myoviridae*); В) КЗ (семейство *Myoviridae*) («Hitachi H-300, 5 000-кратное увеличение)

В препарате было установлено наличие *Podoviridae* КМВ-подобных бактериофагов (А), наличие *Myoviridae* РВ1-подобных фагов (Б) и фКЗ (В). Эти две группы фагов принадлежат к вирулентным, допустимы к применению в терапевтических целях.

При оценке морфологии бактериофага *P. aeruginosa* фаговые бляшки характеризовались параметрами: диаметр 3,0–4,5 мм, полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса.

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

На первом этапе разработки комплексного препарата ацинетобактер-синегнойный был получен ацинетобактерный монофаг. Работу проводили на лабораторном ферментере – биореакторе BIOSTAT® Aplus. Для этого в емкость,

содержащую 1 литр казеиново-кислотной среды, вносили 50 мл суточной бульонной культуры *A. baumannii* с концентрацией микробных клеток  $1 \times 10^9$  КОЕ/мл и добавляли 2,0 мл маточного ацинетобактерного бактериофага. Посевы инкубировали в биореакторе при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течении  $20 \pm 4$  часов. Уровень pH находился в пределах 7,2-7,4. Фаголизат подвергали фильтрации через микропористые мембраны ( $0,2 \mu\text{m}$ ) добавляли консервант хинозол (конечной концентрации в лизате 0,0001 г/мл), разливали во флаконы по 20 мл, герметизировали и хранили при температуре  $+5^\circ\text{C}$ .

Для получения комплексного бактериофага соединяли оба препарата (полученный экспериментальным путем ацинетобактерный бактериофаг и коммерческий препарат «Бактериофаг псевдомонас аэругиноза» с. Н11 от 11.2017 г.). Использованы объемы в равных соотношениях (1:1) каждого бактериофага. Для изучения основных свойств бактериофага ацинетобактер–синегнойный с доказательством его вирулентности произвели три экспериментальных образца (О.1; О.2; О.3).

Анализ литической активности комплексного бактериофага показал, что совместное использование монофагов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* не влияло на степень литической активности его отдельных компонентов (Таблица 1). Исходная активность компонента бактериофага *A. baumannii* по методу Аппельмана составляла  $10^{-5,0}$ , *P. aeruginosa* –  $10^{-6,0}$ .

Таблица 1 – Литическая активность отдельных компонентов экспериментальных образцов бактериофага ацинетобактер-синегнойный

№ серии комплексного бактериофага	Литическая активность ацинетобактерного бактериофага по методу Аппельмана	Литическая активность синегнойного бактериофага по методу Аппельмана
О.1	$10^{-5,1}$	$10^{-6,0}$
О.2	$10^{-4,9}$	$10^{-5,9}$
О.3	$10^{-5,0}$	$10^{-6,1}$
М± м	$10^{-4,93 \pm 0,12}$	$10^{-5,97 \pm 0,09^*}$
<i>p</i> – значение <i>t</i> ( <i>df</i> )	<i>p</i> = 0,63 <i>t</i> (2) = 0,55	<i>p</i> = 0,74 <i>t</i> (2) = 0,37

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

Усредненный показатель активности компонентов комплексного бактериофага по методу Аппельмана для *A. baumannii* составил  $10^{-4,93 \pm 0,12}$  и для *P. aeruginosa* –  $10^{-5,97 \pm 0,09}$ .

При изучении инфекционного процесса (**изучение адсорбции и основных фаз внутриклеточного развития**) двухкомпонентного бактериофага получены следующие результаты: скорость адсорбции на бактериальной клетке  $5,8 \times 10^{-10}$  для *A. baumannii* и  $5,0 \times 10^{-10}$  – для *P. aeruginosa*, урожайность фаговых частиц на одну инфицированную бактериальную клетку 61,1 и 91,2 соответственно. Параметры инфекционного процесса бактериофага ацинетобактер-синегнойный находились на аналогичном уровне с другими изученными фагами (Попова А.В., 2012; Козлова Ю.Н., 2012).

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

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

**Оценка специфической активности (диапазон действия) комплексного бактериофага** капельным методом («спот-тест») в отношении штаммов микроорганизмов различных видов, родов (*S. aureus*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Shigella spp.*, *Streptococcus spp.*, *Salmonella spp.*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*) позволила сделать вывод о высокой специфичности разработанного препарата. Бактериофаг лизировал только штаммы *A. baumannii* и *P. aeruginosa* при отсутствии лизиса микроорганизмов других видов (родов).

Для оценки специфической активности бактериофага на основе клеточной культуры ЛЭЧ-3 с изучением адгезивных свойств бактерий использовали по 20 штаммов *A. baumannii* и *P. aeruginosa*, в качестве контроля штаммы *S. aureus* из рабочей коллекции, экспериментальный образец комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный и коммерческий препарат бактериофага «Бактериофаг Стафилококковый» с. Н 92 от 05.2018 г.

Эксперимент оценивали по индексу адгезии, который выражали средним числом бактериальных клеток на одной эукариотической клетке (ИА, абс.) и процентом пораженных клеток монослоя, рассчитанный на 100 клеток (ПК, %). Процесс адгезии и степень поражения клеток исследовали микроскопически, определяя степень инфицированности монослоя сравнительно с культивированием штаммов без добавления бактериофага (контроль) (Рисунок 3А, Б).

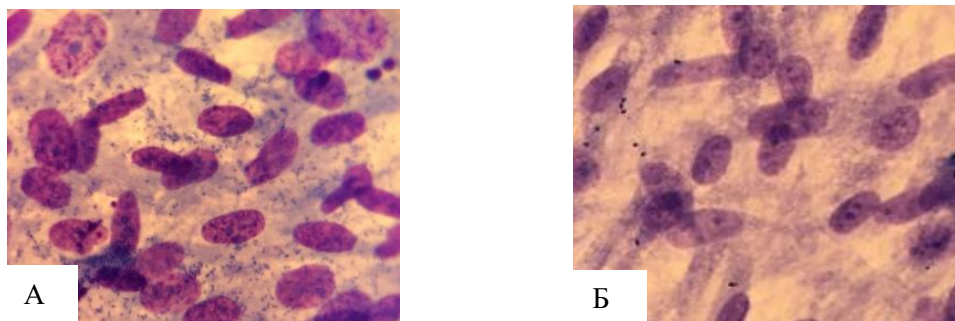


Рисунок 3 – Микроорганизмы *A. baumannii*, адгезированные на клеточной культуре (ЛЭЧ-3): А – без воздействия бактериофага, Б – с бактериофагом (Аxiосcop 40, объектив АСНROLAN 100 x 1,25Oil; окуляр W-PI 10 x /23)

По результатам опыта процент пораженных клеток (ПК%) в монослое ЛЭЧ-3 достоверно снизился относительно контроля после совместного культивирования в течение 1 часа: у штаммов *A. baumannii* с бактериофагом – с  $47,96 \pm 0,36\%$  до  $8,73 \pm 0,02\%$ , у *P. aeruginosa* – с  $48,96 \pm 0,25\%$  до  $6,36 \pm 0,04\%$ , у *S. aureus* – с  $42,49 \pm 0,12\%$  до  $2,54 \pm 0,01\%$  соответственно.

Аналогичные результаты по опыту индекса адгезии микроорганизмов у *A. baumannii* – с  $15,58 \pm 1,1$  до  $4,68 \pm 1,12$ , у *P. aeruginosa* – с  $27,54 \pm 1,17$  до  $4,47 \pm 1,17$ , у *S. aureus* – с  $19,95 \pm 1,07$  до  $4,79 \pm 1,12$  (Таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика адгезивной активности микроорганизмов на клеточной культуре ЛЭЧ-3

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

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

Совместное культивирование бактериофагов с микроорганизмами (в течение 1 часа) приводило к статистически значимому снижению показателей адгезии (p < 0,0001) по сравнению с культивированием штаммов без добавления бактериофага.

На представленную выше методику оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур получен патент RU 2723188 С1 (дата регистрации 09.06.2020г.).

**Сравнительную оценку чувствительности штаммов *A. baumannii* к антибиотикам и комплексному бактериофагу проводили в два этапа.**

На первом этапе протестированы 116 штаммов *A. baumannii*, выделенных 2014-2016 году (ФГБУЗ «ПКЦ» ФМБА России, ГБУЗ ПК «КМСЧ№1») от пациентов ОРИТ, а также от больных урологического, терапевтического, отоларингологического сомато-психиатрического профиля и амбулаторного звена. Выявили высокий уровень (81,0 ± 5,4%) чувствительности штаммов *A. baumannii* из ОРИТ к бактериофагу (Рисунок 4).



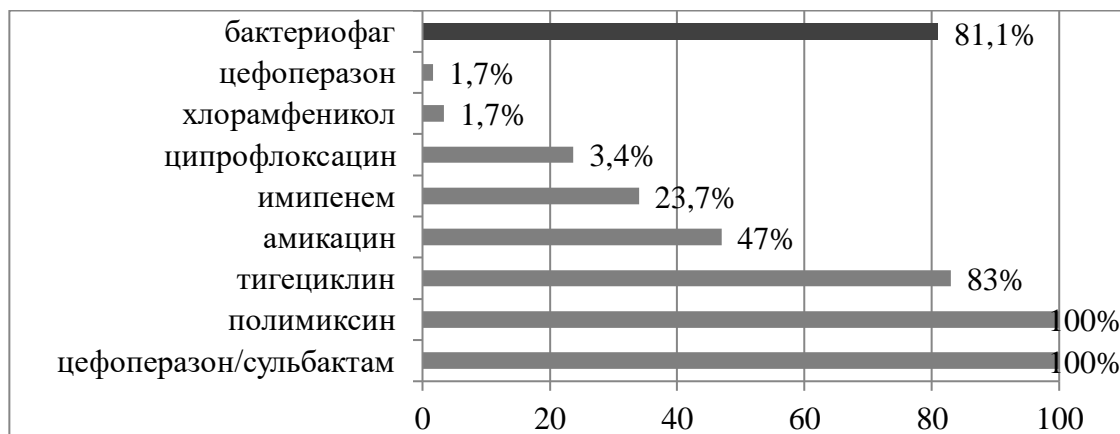


Рисунок 4 – Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций в 2014-2016 гг. (отделения реанимации и интенсивной терапии).

Чувствительность микроорганизмов к бактериофагу ацинетобактер-синегнойный ( $81,0 \pm 5,4\%$ ) была сопоставима с антибиотиком резерва тигециклином ( $83,0\% \pm 3,7\%$ ;  $\chi^2 = 0,06$ , d.f. = 1,  $p = 0,8$ ).

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

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

Таблица 3 – Чувствительность к бактериофагу ацинетобактер-синегнойный штаммов *A. baumannii*, выделенных из медицинских организаций в 2018-2020 гг. (отделения реанимации и интенсивной терапии)

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

Мониторинг чувствительности штаммов *A. baumannii* к разработанному комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный, проведенный нами на основе пространственной и временной характеристики (в динамике по годам и в различных медицинских организациях двух крупных промышленных центров РФ), установил высокую эффективность комплексного бактериофага в отношении штаммов, выделенных от пациентов ОРИТ с заболеваниями нижних отделов дыхательных путей.

**Совершенствование методов внутривидового типирования полирезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* с использованием комплексного бактериофага ацинетобактер-синегнойный**

Внутривидовая идентификация *P. aeruginosa*

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

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

По МПК к гентамицину, имипенему, меропенему, цефоперазон/сульбактаму, цiproфлоксацину сопоставимыми (отсутствие расхождений в показателях МПК) оказались все 13 (100,0%) тестируемых изолятов, по чувствительности к цефепиму, амикацину – 12 штаммов (92,3%). Наибольшее расхождение в МПК имел цефтазидим (61,5%). При детекции генов, кодирующих продукцию групп TEM, CTX-M, KPC, OXA-48 и MBL, методом ПЦР, ни у одного из тестируемых изолятов представленные гены обнаружены не были. К экспериментальной серии бактериофага ацинетобактер-синегнойный все штаммы были чувствительны.

Вторую группу (II группа) составили 19 штаммов *P. aeruginosa* из перинатального центра. В их числе, 6 штаммов выделены из палаты интенсивной терапии (ПИТ) – первая подгруппа и 13 штаммов из физиологического отделения «мать-дитя» – вторая подгруппа. Анализ данных МПК (мкг/мл) выявил сопоставимость изучаемых штаммов к цефоперазон/сульбактаму и цефтазидиму – в 100,0% случаев, амикацину, цефепиму, имипенему, цiproфлоксацину – в 94,7%, гентамицину – в 89,5%, меропенему – в 73,7%. Отметим, что штаммы из второй подгруппы II группы были выделены спустя три месяца относительно штаммов первой подгруппы. В целом, у изолятов второй группы обнаружен высокий уровень сопоставимости по МПК. Анализ чувствительности штаммов к бактериофагу так же свидетельствовал о формировании второй линии госпитальных штаммов *P. aeruginosa*. Изучаемые штаммы 1 подгруппы были резистенты к бактериофагу, 2 подгруппы – чувствительны. При детекции методом ПЦР гены, ответственные за продукцию групп TEM, CTX-M, KPC, OXA-48 и MBL, обнаружены не были.

В третью группу (III группа) вошли 5 штаммов, выделенных от пациентов и внешней среды отделения гнойной хирургии краевого хирургического стационара. Анализ значений МПК (мкг/мл) 5 штаммов: 3 – от пациентов и 2 – из внешней среды (смыв с перчатки медсестры, медицинские отходы) установил циркуляцию в отделении гнойной хирургии, как минимум двух вариантов возбудителя. Все 5 штаммов по значениям МПК к антибиотикам имели существенные отличия. Максимальные различия по цiproфлоксацину достигали 1067 раза. К комплексному бактериофагу чувствительность штаммов была вариабельной.

Штаммы *P. aeruginosa*, объединенные в группы по месту выделения, оказались

разнородными по чувствительности к антибиотикам (методом серийных разведений) и чувствительности к бактериофагу, что позволило сформировать подгруппы по признаку очаговости. При этом штаммы, выделенные из разных очагов ГСИ, имели существенные отличия в значениях МПК, достигающие 1024 раз. Показатели МПК внутри подгрупп не превышали 8-ми последовательных разведений.

#### Внутривидовая идентификация отдельных сиквенс-типов *A. baumannii*

Для внутривидового типирования отобраны 74 полирезистентных штаммов *A. baumannii* из четырех многопрофильных медицинских организации. Проведено MLST 15 штаммов *A. baumannii*, выбранных в случайном порядке. По результатам типирования штаммы отнесены к трем сиквенс-типам (ST): к ST 1167 – 6 штаммов, ST 944 – 5 штаммов, ST 208 – 4. Дальнейшая работа была посвящена характеристике их фенотипических признаков.

По результатам оценки биохимических свойств (диагностическая панель «NEFERMtest 24»), штаммы ST 1167 отличались от ST 944 и ST 208 по  $\gamma$ -глутамилтрансферазе и малонату. Наименьшей биохимической активностью характеризовались штаммы ST 944, были положительными лишь в 4-х из 24-х испытываемых тестов.

При изучении зон задержки роста на питательном агаре вокруг дисков с нанесенными антибиотиками (эритромицин (15 мкг), ванкомицин (5 мкг), рифампицин (5 мкг), клиндамицин (2 мкг), фузидин (10 мкг), линезолид (10 мкг)) установлено, что у штаммов ST 1167 отсутствовал рост вокруг дисков с эритромицином, ванкомицином, рифампицином, клиндамицином, линезолидом. Штаммы ST 944 имели зону задержки роста к рифампицину. Подавляли рост ST 208 только ванкомицин и рифампицин.

Все штаммы ST 1167 характеризовались умеренной пленкообразующей способностью (ОП=2,03-3,05), ST 944 – высокой (ОП=4,03-5,12), ST 208 – низкой (ОП=1,07-1,82).

Анализ чувствительности штаммов *A. baumannii* к анилиновым красителям и к дезинфицирующим средствам выявил их различный профиль.

При оценке чувствительности к комплексному бактериофагу ацинетобактер-синегнойный по 4-х крестной системе («+», «++», «+++», «++++»), все штаммы *A. baumannii* ST 1167 (100%) имели высокий уровень чувствительности к фагу («+++», «++++»). Штаммы сиквенс-типов ST 944 и ST 208 проявили полную устойчивость («-»).

В результате был сформирован оптимальный набор дифференцирующих тестов, позволяющий выявить внутривидовые особенности трех сиквенс-типов *A. baumannii* по фенотипическим признакам. Полученная итоговая диагностическая панель по ключевым тестам отображена в Таблице 3.

Новая диагностическая панель была использована для характеристики оставшихся 59 из 74 штаммов *A. baumannii* (15 штаммов были использованы при ее разработке). По результатам тестирования 28 штаммов были отнесены к ST 1167, 14 – к ST 944, 15 – к ST 208.

Таблица 3 – Ключевые фенотипические признаки штаммов *A. baumannii* сиквенс-типов ST 1167, ST 944, ST 208 для внутривидовой идентификации

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

Оставшиеся 2 штамма по основным признакам, входящим в панель тестирования, не подходили ни к одной из представленных групп. В дальнейшем, методом MLST штамм *A. baumannii* №80 (выделенный из БАЛ, г. Пермь) был отнесен к ST 502, штамм № 76 (выделенный из раневого отделяемого пациента, г. Пермь) – к ST 450.

В дальнейшем с использованием разработанного метода внутривидового типирования штаммов *A. baumannii* ST 1167, ST 944 и ST 208 было проведено эпидемиологическое расследование очагов ИСМП в медицинских учреждениях и приняты управленческие решения, направленные на их локализацию.

### ВЫВОДЫ

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

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

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

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

профилактической целью в структурных подразделениях высокого риска развития гнойно-септических инфекций.

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

### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

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

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

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

### **ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ**

1. Использовать созданную и охарактеризованную коллекцию штаммов *A. baumannii*, коллекцию штаммов-продуцентов ацинетобактерного бактериофага и полученный из биологического материала и сточных вод бактериофаг *A. baumannii* Acinetobacter\_phage\_vB\_AbaP\_PE14 семейства *Autographiviridae*, порядка *Caudovirales* для изучения экологии микробных сообществ и развития эволюционных механизмов микроорганизмов, оценки их взаимоотношений на уровне «хозяин-паразит».

2. Полученные результаты о возможности применения клеточных линий ЛЭЧ-3 для оценки адгезивных свойств и фаголизательности *A. baumannii* и *P. aeruginosa* открывают новые возможности изучения фенотипических свойств и факторов вирулентности актуальных бактериальных возбудителей гнойно-септической группы инфекций на клеточных культурах животных и человека.

3. Перспективным направлением исследований является продолжение исследовательской работы по оценке фенотипических и молекулярно-генетических особенностей внутрибольничных штаммов микроорганизмов с целью создания высокоэффективных диагностических тест-систем для проведения их внутривидовой идентификации, в том числе с использованием бактериофагов.

### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Захарова, Ю.А. Локализация, видовой состав и антибиотикочувствительность

грамотрицательных микроорганизмов, выделенных у пациентов отделений реанимации / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова**, А.М. Николаева // Материалы X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», 12-13 апреля 2012г., г. Москва. – Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, №1– 2(2). – С.268.

2. **Фельдблюм, И.В.** Эпидемиологическая диагностика внутрибольничных гнойно-септических инфекций синегнойной этиологии на основе внутривидового типирования возбудителя / **И.В. Фельдблюм, Ю.А. Захарова, А.М. Николаева, О.С. Федотова** // Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунологии. – 2013. – №1. – С. 14-20.
3. Захарова, Ю.А. Основные направления профилактики и основы микробиологического мониторинга инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Ю.А. Захарова, А.В. Климашина, Е.В. Березина, **О.С. Федотова** // Актуальные вопросы неотложных состояний в многопрофильном стационаре: материалы научно-практической конференции, 6-7 июня 2013г., г. Димитровград. – Димитровград, 2013. – С.63-64.
4. Захарова, Ю.А. Лабораторная диагностика и микробиологический мониторинг инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Проблемы и пути решения / Ю.А. Захарова, А.В. Климашина, **О.С. Федотова**, Н.В. Соколова // Материалы V межрегиональной научно-практической гериатрической конференции на Северном Кавказе, 12 декабря 2014г., г. Пятигорск.– Пятигорск, 2014. – С.147-150.
5. Захарова, Ю.А. Микробиологический мониторинг инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: актуальные проблемы и пути оптимизации / Ю.А. Захарова, И.В. Фельдблюм, А.В. Климашина, **О.С. Федотова** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т. 60, №9. – С.67.
6. Захарова, Ю.А. Изучение чувствительности *Acinetobacter baumannii*, циркулирующих в медицинских организациях г. Перми к антибиотикам и экспериментальной серии бактериофага / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова**, А.М. Николаева, А.В. Климашина // Дезинфекционное дело. – 2016. – №1(95). – С.23-25.
7. Николаева, А.М. Изучение специфической активности и безопасности лечебно-профилактического препарата бактериофага против *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* / А.М. Николаева, Ю.А. Захарова, М.Г. Ефимова, Е.В. Функнер, А.Н. Красильникова, Н.Р. Попова, **О.С. Федотова** // Медицинский алфавит. – 2016. – Т. 1, №6. – С.42-46.
8. **Федотова, О.С.** Антибиотикорезистентность *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii*, выделенных у пациентов многопрофильного стационара/ **О.С. Федотова, Ю.А. Захарова, А.В. Климашина** // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Т. 19, №2. – С.148.
9. Захарова, Ю.А. Мультилокусное сиквенс - типирование полирезистентных *Acinetobacter baumannii* и *Staphylococcus aureus*, циркулирующих в сомато-

- психиатрическом отделении / Ю.А. Захарова, С.В. Сидоренко, Н.А. Маянский, А.М. Николаева, **О.С. Федотова**, А.В. Климашина // Тезисы XIX Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии, 17-19 мая 2017г., г. Москва. – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, Приложение 1. – С.19.
10. **Федотова, О.С.** Пути оптимизации антибактериальной терапии против неферментирующих грамотрицательных бактерий в ОРИТ/ **О.С. Федотова**, Ю.А. Захарова, А.М. Николаева, А.В. Климашина // Актуальные проблемы инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции, 23-14 мая 2017г., г. Екатеринбург. – Екатеринбург, 2017.– С.120-121.
  11. **Федотова, О.С.** Микробиологические аспекты получения препарата бактериофага против *Acinetobacter baumannii* / **О.С. Федотова**, Ю.А. Захарова // **Медицинский альманах.** – 2018.– №1 (52). – С. 126-129.
  12. Захарова, Ю.А. Внутривидовое типирование госпитальных штаммов *Acinetobacter baumannii* с множественной лекарственной устойчивостью / Ю.А. Захарова, С.В. Сидоренко, **О.С. Федотова** // Тезисы XX Международного конгресса МАКМАХ по антимикробной терапии и клинической микробиологии, 23-25 мая 2018 г., г. Москва, – Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2018.– Т. 20, № 1. – С. 22-23.
  13. Алимов, А.В. Разработка алгоритма внутривидовой микробиологической диагностики отдельных сиквенс-типов *Acinetobacter baumannii* / А.В. Алимов, **О.С. Федотова** // Материалы IV Российского конгресса лабораторной медицины, 3-5 октября 2018г., г. Москва.– Лабораторная служба. – 2018.– № 3, Выпуск 2 – С.104.
  14. Захарова, Ю.А. Видовой состав актуальных госпитальных штаммов микроорганизмов в ОРИТ и их чувствительность к антибиотикам, бактериофагам и дезинфицирующим средствам / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова** // Сборник тезисов «Перспективы развития производства и применения иммунобиологических лекарственных препаратов в XXI веке», 14-15 июня 2018 г., г. Пермь, – Пермь, 2018. – С. 181-185.
  15. Захарова, Ю.А. Актуальные проблемы и перспективные направления фаготерапии и фагопрофилактики / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова** // Материалы IV научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 24-26 сентября 2018г., г. Нижний Новгород. – Нижний Новгород, 2018. – С.46.
  16. Захарова, Ю.А. Внутривидовая характеристика отдельных сиквенс-типов *Acinetobacter baumannii* / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова**, У.А. Бажанова // Международная научно-практическая конференция «Молекулярная Диагностика 2018», 27- 28 сентября 2018г., г. Минск. – Минск, 2018. – С.60.
  17. Захарова, Ю.А. Перспективные направления использования препаратов бактериофагов / Ю.А. Захарова, **О.С. Федотова** // Сборник тезисов

Межрегиональной научно-практической конференции с международным участием «Вирусные инфекции и общество: проблемные вопросы диагностики, лечения и профилактики», 17-18 октября 2018г., г. Екатеринбург. – Екатеринбург, 2018. – С. 33-34.

18. Захарова, Ю.А. Новый способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточной культуры ЛЭЧ-3 / Ю.А. Захарова, О.С. Федотова, Н.А. Шмелева // Медицинский алфавит. – 2019. – Т. 2, № 32. – С. 24-26.
19. **Федотова, О.С.** Адгезивные свойства микроорганизмов в условиях монослоя культуры клеток / О.С. Федотова, Ю.А. Захарова, Н.А. Шмелёва, А.В. Остапчук, В.В. Василевский // Материалы VI Национального конгресса бактериологов, 14-16 сентября 2021г., г. Казань. – Бактериология. – 2021. – С. 72-73.
20. **Федотова, О.С.** Фенотипический профиль актуальных полирезистентных сиквенс-типов (ST 1167, ST 944, ST 208) *Acinetobacter baumannii* / О.С. Федотова, Ю.А. Захарова, А.В. Остапчук, У.А. Бажанова, А.А. Захаров // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.– 2021.– №6 (98).– С. 639-647.

#### Патенты

Патент 2723188 Российская Федерация, МПК C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) C12Q 1/18 (2006.01) Способ оценки специфической активности бактериофага с использованием клеточных культур / Алимов А.В., Захарова Ю.А., Федотова О.С., Шмелева Н.А. заявитель и патентообладатель Федеральное бюджетное учреждение науки «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН "ЕНИИВИ" Роспотребнадзора) (RU).– № 2019113055; заявл.27.04.2019; опубл.09.06.2020, Бюл. №16– 7с.:

#### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БОЕ	– бляшкообразующая единица
БЛРС	– бета-лактамазы расширенного спектра
ГСИ	– гнойно-септические инфекции
ЛЭЧ -3	– легочные фибробласты эмбриона человека
МПК	– минимальная подавляющая концентрация
МО	– медицинские организации
МУ	– методические указания
НГОБ	– неферментирующие грамотрицательные бактерии
НИР	– научно-исследовательская работа
ОП	– оптическая плотность
ОРИТ	– отделение реанимации и интенсивной терапии
ПИТ	– палата интенсивной терапии
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
СПО	– сомато-психиатрическое отделение
АТСС	– American Type Culture Collection
MLST	– мультилокусное сиквенс-типирование