

СОЛОВЬЕВА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

**КАПСУЛОСПЕЦИФИЧНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ И ИХ ПОЛИСАХАРИД-ДЕГРАДИРУЮЩИЕ
ФЕРМЕНТЫ, АКТИВНЫЕ В ОТНОШЕНИИ ГИПЕРМУКОИДНЫХ ШТАММОВ
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE***

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Оболенск – 2018

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

Летаров Андрей Викторович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», лаборатория вирусов микроорганизмов, заведующий

Зимин Андрей Антонович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской Академии Наук», лаборатория молекулярной микробиологии, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Москва

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 142279, Московская область, Серпуховский район, пос. Оболенск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Klebsiella pneumoniae – известный оппортунистический патоген, являющийся причиной внебольничных и госпитальных инфекций. За счет быстрого формирования экстремального уровня устойчивости к антибактериальным препаратам *K. pneumoniae* занимает лидирующее место среди госпитальных патогенов (Podschun, 1998, Chung, 2016). Всемирная организация здравоохранения рассматривает штаммы *K. pneumoniae*, несущие β -лактамазы расширенного спектра действия и карбапенемазы, как возбудителей заболеваний первой категории приоритетности для научных разработок в области создания новых антибактериальных препаратов. По данным исследования системы Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) на территории Российской Федерации 12 % клинических изолятов *K. pneumoniae* устойчивы к карбапенемам, 91 % – к цефалоспорином третьего поколения, а 85 % изолятов обладают множественной лекарственной устойчивостью.

В настоящее время рядом исследователей отмечено формирование новой «гипервирулентной» группы *K. pneumoniae* (hvKp). Первые упоминания об инфекциях, вызванных подобными штаммами, появились в 80-х годах XX века; большинство сообщений акцентировали внимание на высоком уровне вирулентности hvKp-штаммов, позволяющем им инфицировать здоровых людей. Одним из ярких отличительных признаков большинства hvKp-штаммов является гипермукоидность (ГМ), ассоциированная с гиперпродукцией капсульных полисахаридов (Hsu et al., 2011, Shon et al., 2013). Среди более чем 80 капсульных типов, выявленных к настоящему моменту, штаммы *K. pneumoniae* капсульных типов K1 и K2 (в меньшей степени K5, K20, K54 и K57), обладающие признаком гипермукоидности, являются наиболее вирулентными для человека (Fang et al., 2007, Yu et al., 2008, Liu et al., 2014). Особенности клинической картины инфекций, вызываемых hvKp-штаммами, ознаменовали появление нового клинического синдрома – внебольничного *K. pneumoniae*-ассоциированного абсцесса печени (КР-АП), часто приводящего к развитию тяжелых осложнений (эндофтальмит, менингит). Несмотря на то, что большинство случаев КР-АП было описано среди жителей Азиатско-Тихоокеанского региона (Китай, Япония, Корея и т.д.), на данный момент заболевания с характерной клинической картиной синдрома встречаются и в других частях мира.

Современная проблема hvKp-штаммов состоит не только в высоком уровне их вирулентности. С момента появления гипервирулентных штаммов в больничной среде исследователи были озабочены проблемой возможного приобретения подобными штаммами детерминант антибиотикорезистентности. В настоящий момент подобная тенденция четко прослеживается по данным зарубежных исследований: первые публикации подчеркивали низкий уровень антибиотикоустойчивости hvKp-штаммов, в то время как сейчас мы наблюдаем, как такие штаммы становятся всё более и более резистентными (Li et al., 2014, Shankar et al., 2016, Arena et al., 2017). Фактически на наших глазах происходит формирование «суперпатогена», обладающего экстремальными характеристиками вирулентности и антибиотикорезистентности.

Разработка альтернативных способов лечения инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями, является одним из самых приоритетных направлений современной биомедицины. Именно на фоне критического уровня устойчивости патогенных бактерий фаготерапия переживает свой второй расцвет (Bogysowski et al., 2014, Alvarez, 2017). Исследование бактериофагов на современном научном уровне способствует обнаружению дополнительных средств для борьбы с патогенными бактериями. Например, одним из актуальных направлений исследований является изучение фаговых ферментов, участвующих в стадии адсорбции бактериофагов на бактериальных клетках. Некоторые бактерии синтезируют различные вещества, которые позволяют им экранировать структуры клеточной стенки, делая адсорбцию фагов невозможной. Примером таких веществ могут служить капсульные полисахариды, часто играющие роль важного фактора вирулентности бактерии. Для того чтобы преодолеть барьер, образованный капсульными полисахаридами, бактериофаги синтезируют специальные ферменты (полисахарид-деполимеразы, ПС-деполимеразы), расщепляющие подобные поверхностные образования (Leiman, 2008). Изучение механизмов взаимодействия между фагом и бактериальной клеткой на этапе деполимеризации поверхностных полисахаридов позволяет открыть новые возможности как в борьбе с бактериальными патогенами, так и в применении этих знаний в различных направлениях микробиологических технологий.

Степень разработанности темы исследования

На момент начала нашего исследования (2015 г.), публикации о наличии гипервирулентных/гипермукоидных штаммов в Российской Федерации отсутствовали. На данный

момент опубликована только одна работа о выделении гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* от новорожденного в инфекционном стационаре г. Казани (Khaertynov et al., 2017).

Использование бактериофагов для лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae*, не является инновационным, эффективность терапевтического использования клебсиеллезных бактериофагов продемонстрирована российскими и польскими исследователями еще в 80-х годах прошлого века (Cislo et al., 1987, Ворошилова, 1992). Современные исследования лечебно-профилактической эффективности бактериофагов проводятся на модельных животных. Активно ведутся исследования бактериофагов, лизирующих мультирезистентные штаммы *K. pneumoniae* (Kęsik-Szeloch et al., 2013, Cao et al., 2015), а также фагов, эффективных для борьбы с биопленками, сформированными *K. pneumoniae* (Verma et al., 2010, Jamal et al., 2015). Особенно актуальными являются исследования бактериофагов, лизирующих карбапенем-устойчивые штаммы *K. pneumoniae* (D'Andrea et al., 2017). Тем не менее, на данный момент опубликованы результаты лишь нескольких работ, связанных с изучением бактериофагов, лизирующих гипермукоидные hvKp-штаммы (Hung et al., 2011, Lin et al., 2014, Hoyles et al., 2015). Так как гипермукоидные штаммы чаще всего принадлежат к определенному капсульному типу (K1, K2 и, в меньшей степени, K5, K20, K54 и K57), логично предположить, что поиск капсулоспецифичных бактериофагов, лизирующих подобные штаммы будет перспективным направлением дальнейших исследований. В России исследования, направленные на изучение капсулоспецифичных бактериофагов, лизирующих гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*, отсутствуют.

Достаточно активно публикуются экспериментальные и обзорные статьи, посвященные фаговым ПС-деполимеразам (Yan et al., 2014, Drulis-Kawa et al., 2015). Имеется ряд исследований литических бактериофагов *K. pneumoniae* и их ферментов с ПС-деградирующей активностью (Hsu et al., 2013, Lin et al., 2014, Hoyles et al., 2015). Тем не менее, информация о разнообразии и специфичности ПС-деполимераз фагов *Klebsiella* всё ещё ограничена малым количеством исследований (Pires et al., 2016). Исследования фаговых ПС-деполимераз показывают, что они могут применяться в комбинации с противомикробными препаратами против резистентных патогенов, особенно тех, которые входят в состав биопленок. Помимо борьбы с бактериальными инфекциями, ПС-деполимеразы могут быть использованы в качестве альтернативы антисыворотке для типирования бактериальных штаммов и обнаружения полисахаридов в иммуногистологических исследованиях. Высокая специфичность ПС-деполимераз позволяет высказывать предположение о том, что капсульное типирование на основе этих ферментов может быть более эффективным, чем фаготипирование.

Цель исследования - выделение и изучение капсулоспецифичных бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз, активных против высоковирулентных гипермукоидных штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

Задачи исследования

1. Создание коллекции штаммов *K. pneumoniae* и их характеристика по капсульным типам. Выявление среди штаммов коллекции гипермукоидных вариантов, высоковирулентных для лабораторных животных.

2. Создание коллекции бактериофагов, лизирующих гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*, оценка их литической активности и специфичности. Выявление капсулоспецифичных бактериофагов.

3. Молекулярно-генетический анализ капсулоспецифичных бактериофагов. Биоинформационный анализ полных нуклеотидных последовательностей фаговых геномов, выявление генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы.

4. Клонирование генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы и конструирование штаммов-продуцентов рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз. Изучение специфичности и механизма ферментативного действия рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз.

5. Оценка эффективности фагов и рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз на модели клебсиеллезной инфекции мышей (на примере K2-специфичного бактериофага KpV74 и рекомбинантной ПС-деполимеразы Dep_kpv74).

Научная новизна работы

На примере крупных стационаров г. Москвы показано, что среди госпитальных изолятов *K. pneumoniae* 12,6 % штаммов являются гипермукоидными. Исследованные ГМ-штаммы относятся к капсульным типам K1, K2 и K57.

Выделены и охарактеризованы бактериофаги, лизирующие гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57. Подробно изучены характеристики геномов выделенных бактериофагов. Бактериофаги, специфичные для *K. pneumoniae* капсульного типа K57, выделены и охарактеризованы впервые.

Впервые клонированы, выделены и охарактеризованы K2- и K57-специфичные ПС-деполимеразы, Der_kpv74 и Der_kpv79, соответственно. Установлен механизм действия ПС-деполимераз: оба фермента являются специфическими гликозидазами, катализирующими расщепление полисахаридов *K. pneumoniae* по β -глюкозидным и β -галактозидным связям, соответственно. Проведенные исследования показали, что ПС-деполимераза Der_kpv74 обладает «антивирулентной» активностью и обеспечивает терапевтический эффект при лечении инфекций, вызванных гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae* у мышей (продемонстрировано на двух инфекционных моделях).

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в получении данных об обнаружении гипермукоидных высоковирулентных штаммов *K. pneumoniae* в России. Выявленные штаммы охарактеризованы по капсульным типам и степени вирулентности для лабораторных животных. Благодаря данным дополнительных исследований, выполненных А.И. Лев с соавт. (2018), можно утверждать, что для некоторых штаммов с ГМ-фенотипом свойственна высокая степень резистентности к антибактериальным препаратам, что делает исследуемые штаммы потенциально опасными, а вызываемые ими инфекции затруднительными для лечения. Сведения о присутствии гипермукоидных штаммов в стационарах г. Москвы дают основание для разработки комплексных мероприятий, препятствующих распространению ГМ-штаммов с высоким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk» депонированы 17 бактериофагов, специфически лизирующих бактерии вида *K. pneumoniae*. В базу данных DDBJ/EMBL/GenBank депонированы полные нуклеотидные последовательности геномов 13 бактериофагов. На основании проанализированных и аннотированных последовательностей геномов определено таксономическое положение бактериофагов. Исследование рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз показало, что они могут быть использованы для капсулотипирования штаммов *K. pneumoniae*, а также, что более важно, для разработки средств лечения инфекций, вызванных ГМ-штаммами, в том числе устойчивыми к антибактериальным препаратам.

Данные, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в отделении нейрореанимации ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ для капсулотипирования клинических штаммов *K. pneumoniae* на основании ПЦР-детекции генов капсулообразования и использования капсулоспецифичных бактериофагов и рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз (Акт внедрения результатов диссертационной работы от 23.07.2018). Материалы диссертации использованы в учебной программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенности» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка № 78 от 26.07.2018 г).

Методология и методы исследования

Для достижения поставленной цели и задач диссертационной работы использовали широкий спектр методов. В исследовании использовали микробиологические, биологические, биохимические, молекулярно-генетические и биоинформатические методы.

Штаммы бактерий и бактериофагов. Рабочая коллекция включала в себя 183 штамма *K. pneumoniae*, выделенные от больных, госпитализированных в стационары различного профиля (ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ и ГБУ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы»), 32 штамма из коллекции отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ, а также три референс-штамма, полученные из Американской коллекции типовых культур (ATCC). В ходе исследования из различного материала (дренажные трубки, перевязочные материалы, канализационные и сточные воды) выделены 18 бактериофагов, лизирующих бактерии вида *K. pneumoniae*.

Микробиологические методы. Для культивирования бактериальных штаммов использовали плотные и жидкие питательные среды. Условия инкубации: температура 37 °С, 18-24 ч. Хранение культур осуществляли в 40 %-м растворе глицерина при температуре минус 20 °С. Видовую идентификацию бактерий проводили с помощью бактериологического анализатора Vitek-2 (Biomérieux, Франция) и масс-спектрометра Microflex MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Признак гипермукоидности штаммов *K. pneumoniae* определяли с помощью стринг-теста как описано у Fang с соавт. (2004). Титр бактериофагов определяли методом агаровых слоев (метод Грация), показатель эффективности бляшкообразования – микрометодом, спектр литической активности – спот-тестом. Визуализацию капсулы клеток *K. pneumoniae* осуществляли с помощью окраски по Бурри-Гинсу.

Биологические методы. Вирулентность штаммов *K. pneumoniae* для животных оценивали на модели внутрибрюшинного заражения белых аутбредных мышей; показатель LD₅₀ рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева (Ашмарин, 1962). Изучение лечебно-профилактической эффективности бактериофага KpV74 проводили на модели *K. pneumoniae*-инфекции мягких тканей бедра у мышей, как описано у А.И. Борзилова с соавт. (2017). Изучение лечебно-профилактической эффективности рекомбинантной ПС-деполимеразы Dep_kpv74 проводили на двух моделях – модели инфекции мягких тканей бедра и острого сепсиса у мышей.

Биохимические методы.

Капсульные полисахариды *K. pneumoniae* выделяли по методике, описанной Bales et al. (2013). Состав капсульных полисахаридов, а также продуктов их расщепления рекомбинантными фаговыми ПС-деполимеразами определяли в лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН с использованием газовой (хроматограф Маэстро 7820, Интерлаб, Россия) и гель-фильтрационной хроматографии (колонка с гелем Fractogel TSK-HW 40 (S), Merck, Германия). Синтез рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз контролировали методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и оценкой активности на газоне чувствительных бактериальных клеток, инактивированных в парах хлороформа. Для очистки рекомбинантных белков использовали металл-хелатную аффинную хроматографию на сорбенте Iminodiacetic acid Sepharose (Sigma-Aldrich, США).

Молекулярно-генетические методы.

Капсульный тип *K. pneumoniae* определяли методом ПЦР с праймерами на гены *cps*-кластера (*wzx* и *wzy*) капсульных типов K1, K2, K5, K20, K54 и K57, разработанными Fang с соавт. (2007). Для рестрикционного анализа ДНК бактериофагов использовали эндонуклеазы рестрикции EcoRV и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США). Клонирование генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы, проводили в системе «вектор-хозяин» pET22b/*E. coli* BL21 (DE3). Плазмидную ДНК бактерий выделяли коммерческим набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Полногеномное секвенирование фаговой ДНК проводили на генетическом анализаторе Ion Torrent PGM (Life Technologies, США) с использованием геномных библиотек, подготовленных с помощью набора реагентов «Ion Plus Fragment Library Kit» (Life Technologies, США).

Биоинформационные методы. Для редактирования нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов использовали программы DNASTAR™ (Madison, США) и Vector NTI™ (Carlsbad, США). Анализ и аннотацию геномов проводили с помощью программных ресурсов BLAST (Altschul et al., 2005), GeneMark™ (Lukashin et al., 1998), RAST (Aziz et al., 2008) и Prodigal (Hyatt et al., 2010). Таксономическое положение бактериофагов определяли, используя алгоритм попарного выравнивания BLAST, а также алгоритм megablast. Филогенетическое дерево, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей ДНК- и РНК-полимеразы бактериофагов, конструировали с помощью программы MEGA, версия 7.0 (Kumar et al., 2016), алгоритм Neighbor-Joining (Saitou, 1987). Сравнение геномов исследуемых вирусов проводили с помощью программы Easyfig (Sullivan et al., 2011). Для поиска генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы, использовали интерактивный биоинформатический сервер Института Макса Планка HHpred (Soding et al., 2005) и ресурс Европейского института биоинформатики InterProScan (Jones et al., 2014).

Положения, выносимые на защиту

1. Среди *K. pneumoniae*, циркулирующих в крупных лечебных учреждениях г. Москвы, 12,6 % изолятов являются гипермукоидными и принадлежат к капсульным типам K1, K2 и K57.
2. Выделенные в ходе проведенных исследований бактериофаги обладают высокой специфичностью по отношению к гипермукоидным штаммам *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57.
3. Рекомбинантные фаговые ПС-деполимеразы обладают более выраженной специфичностью по сравнению с нативными фагами.
4. Рекомбинантные фаговые ПС-деполимеразы Dep_kpv74 и Dep_kpv79 классифицированы как специфические гликозидазы, катализирующие расщепление полисахаридов *K. pneumoniae* по β-глюкозидным и β-галактозидным связям, соответственно.
5. Рекомбинантная фаговая ПС-деполимераза Dep_kpv74 обладает «антивирулентным» потенциалом и оказывает терапевтический эффект, способствующий выживаемости мышей, инфицированных высоковирулентным гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae*.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в рамках проекта № 15-15-00058

Российского научного фонда «Бактериофаги, перспективные для разработки лечебно-профилактических препаратов против госпитальных *Klebsiella pneumoniae*-инфекций: изучение литической активности, организации геномов, особенностей взаимодействия с бактериальной клеткой и биологической безопасности» 2015-2017 гг. Все результаты, представленные в работе, получены с использованием современных методов исследования, рекомендованных международным научным сообществом.

Результаты диссертационной работы были представлены на девяти всероссийских и международных конференциях: X Молодежная школа-конференция с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» (Москва, 27-30 октября 2015 г.); II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, 7-11 декабря 2015 г.); Российско-Китайская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии (XIX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 14-16 июня 2016 г.); III Научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Москва, 13-15 октября 2016 г.); II Национальный конгресс бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (Санкт-Петербург, 20-22 сентября 2016 г.); VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 1-3 ноября 2016 г.); Международная конференция, посвященная празднованию 100-летней годовщины исследований бактериофагов (Centennial Celebration of Bacteriophage Research) (Франция, Париж, 24-26 апреля 2017 г.); Российско-Китайский конгресс по медицинской микробиологии, эпидемиологии и клинической микологии (XX Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 14-16 июня 2017 г.); Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, посвященный памяти выдающегося микробиолога Н.П. Елинова (XXI Кашкинские чтения) (Санкт-Петербург, 6-8 июня 2018 г.). Диссертация обсуждена и одобрена на межлабораторном семинаре Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (протокол № 54 от 20 июля 2018 г.).

Личное участие автора в получении результатов

Совместно с руководителем, к.б.н. Воложанцевым Н.В., соискатель определил цель и задачи исследования, методику и дизайн экспериментов, а также подготовил материалы к публикации. Автором выделены и охарактеризованы литические бактериофаги, представленные в настоящем исследовании, проанализированы и аннотированы полные нуклеотидные последовательности их геномов, получены рекомбинантные генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы, изучена активность и специфичность рекомбинантных ПС-деполимераз. Отдельные разделы работы выполнены в сотрудничестве с к.м.н. Борзиловым А.И., к.б.н. Коробовой О.В., к.б.н. Комбаровым Т.И., к.б.н. Вережкиным В.В., к.б.н. Красильниковой В.М., м.н.с. Лев А.И., к.б.н. Мочаловым В.В. и н.с. Мякининой В.П. Секвенирование фаговой ДНК проведено сотрудниками отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ. Определение структуры капсульных полисахаридов *K. pneumoniae*, а также фрагментов их ферментативного расщепления проведено в лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии под руководством проф. Книреля Ю.А.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 18 научных работ, в том числе 5 статей в международных реферируемых научных журналах и 13 тезисов устных и стендовых сообщений в материалах международных и всероссийских научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Resultados и обсуждения, Заключение, Выводов, Практических рекомендаций и Списка источников литературы, который включает 24 работы отечественных и 241 работу зарубежных авторов. Работа содержит 26 рисунков и 13 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Характеристика штаммов *K. pneumoniae*

Выделение и исследование бактериофагов не представляется возможным без использования чувствительных бактериальных штаммов. Поэтому одной из задач исследования является создание и характеристика коллекции штаммов *K. pneumoniae*. В процессе работы сформировали коллекцию,

включающую 215 штаммов, подавляющее большинство которых выделили от больных, госпитализированных в крупные инфекционные стационары г. Москвы (n=183). Также в коллекцию включили 32 штамма из рабочей коллекции лаборатории молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН ГНЦ ПМБ.

Вследствие того, что одним из основных фенотипических признаков hvKp-штаммов *K. pneumoniae* является гипермукоидность, штаммы коллекции исследовали с помощью стринг-теста, позволяющего определить наличие/отсутствие признака. По итогам теста выявили 27 штаммов (12,6 % исследуемой коллекции), обладающих гипермукоидным фенотипом (рисунок 1).



Рисунок 1 – Сравнение штаммов *K. pneumoniae*: слева – негипермукоидный штамм, справа – штамм, обладающий ГМ-фенотипом (среда Эндо, HiMedia, Индия).

Так как один из основных механизмов формирования ГМ-фенотипа связан с наличием гена *rpmA* (регулятор мукоидного фенотипа), все ГМ-штаммы проанализировали на наличие этого гена с помощью полимеразной цепной реакции (Lev et al., 2018). В итоге, ген *rpmA* выявили в геноме 24 ГМ-штаммов. В геноме трех гипермукоидных штаммов ген *rpmA* не выявлен. Однако в одном из них был обнаружен ген *rpmA2* – аллельный вариант гена *rpmA*. Механизм формирования ГМ-фенотипа оставшихся *rpmA*-негативных штаммов остается неясным.

Известно, что среди гипервирулентных (гипермукоидных) штаммов *K. pneumoniae* преобладают штаммы капсульных типов K1 и K2, а также встречаются штаммы капсульных типов K5, K20, K54 и K57 (Fang et al., 2007). Для выявления таких штаммов в нашей коллекции использовали ПЦР-детекцию генов *wzx* и *wzy* отмеченных выше капсульных типов. В результате в исследуемой коллекции выявили 13 штаммов K1-, 34 штамма K2-, 3 штамма K20- и 26 штаммов K57-типа. Штаммы этих капсульных типов составляют 35 % исследуемой коллекции. Процентное распределение штаммов по капсульным типам в исследуемой коллекции представлено на рисунке 2.

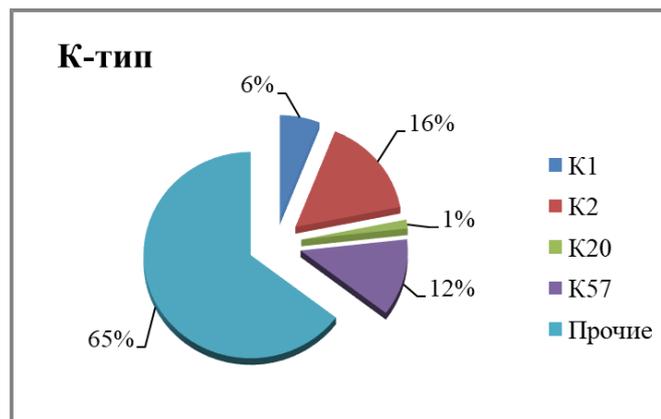


Рисунок 2 – Распределение штаммов *K. pneumoniae* по K-типам.

Гипермукоидные штаммы по капсульным типам распределились следующим образом: K1-типа – 11 штаммов (84,6 % от всех штаммов K1-типа), K2 – 8 штаммов (23,5 %), K20 – 1 штамм (33,3 %) и K57 – 7 штаммов (26,9 %) (рисунок 3). Примечательным является тот факт, что штаммы других K-типов не обладали гипермукоидным фенотипом. Эти сведения подтверждают данные зарубежных исследований, акцентирующих внимание на том, что именно среди штаммов указанных капсульных типов чаще всего встречаются гипермукоидные hvKp.

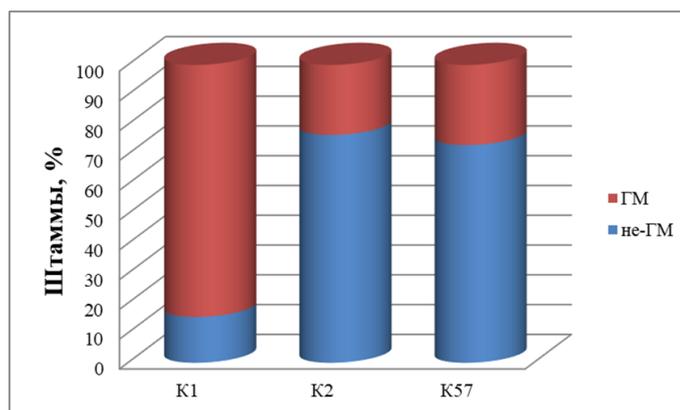


Рисунок 3 – Доля гипермукоидных вариантов среди штаммов капсульных типов K1, K2 и K57.

Согласно источникам литературы, одним из признаков hvKp-штаммов, отличающим их от классических вариантов, является способность вызывать инфекции у лабораторных животных. Для подтверждения вирулентных свойств штаммов с ГМ-фенотипом экспериментально определили показатель LD₅₀ для белых аутбредных мышей. По итогам проведенных экспериментов штаммы с ГМ-фенотипом разделили на три группы – высоковирулентные (LD₅₀ не превышает 100 КОЕ), умеренно-вирулентные (LD₅₀<10⁵ КОЕ) и слабовирулентные (LD₅₀>10⁶ КОЕ) (таблица 1).

Таблица 1 – Вирулентность гипермукоидных штаммов для лабораторных животных

Группа вирулентности	Количество штаммов капсульного типа				Всего
	K1	K2	K20	K57	
Высоковирулентные	5	4	1	0	10
Умеренновирулентные	6	4	0	0	10
Слабовирулентные	0	0	0	7	7

Как видно из данных, представленных в таблице 1, среди высоковирулентных штаммов, как и следовало ожидать, преобладают гипермукоидные штаммы капсульных типов K1 и K2. Также стоит упомянуть, что при оценке вирулентности 15 штаммов, не обладающих гипермукоидным фенотипом, во всех случаях показатель LD₅₀ был больше 10⁶ КОЕ.

Данные, представленные выше, подтверждают наличие ГМ-штаммов *K. pneumoniae* в крупных инфекционных стационарах г. Москвы, их доля среди клинических изолятов нашей коллекции составляет 12,6 %. Высокий уровень вирулентности обнаруженных ГМ-штаммов подтвержден исследованиями на аутбредных белых мышах. Опираясь на дополнительные сведения об устойчивости исследуемых штаммов к антибиотикам, наличию генов антибиотикорезистентности и вирулентности, отраженные в публикации Lev с соавт. (2018), можно утверждать, что среди высоковирулентных и умеренновирулентных ГМ-штаммов обнаруживаются варианты, совмещающие в себе широкий набор генов вирулентности и резистентности, причем, некоторые из них устойчивы к шести-семи классам антибактериальных веществ. Эти данные свидетельствуют о распространении среди исследуемых клинических изолятов *K. pneumoniae* hvKp-штаммов с ГМ-фенотипом, обладающих высокой степенью устойчивости к антибактериальным препаратам.

Общая характеристика бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*

Источниками для выделения бактериофагов, представленных в исследовании, служили разнообразные материалы, полученные из инфекционных стационаров (дренажные трубки, перевязочный материал и т.д.), а также объекты окружающей среды (канализационные и сточные воды). В качестве индикаторных штаммов на первом этапе отбора фагов использовали 40 штаммов *K. pneumoniae* из нашей коллекции, включая все гипермукоидные штаммы и ГМ-негативные штаммы разных капсульных типов. Определение спектра литической активности бактериофагов проводили на всей коллекции штаммов *K. pneumoniae*. Таким образом, в период с 2014 по 2016 год выделены 18 бактериофагов, лизирующих бактерии вида *K. pneumoniae* (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика литического спектра бактериофагов

Бактериофаг	Источник выделения	Штамм-хозяин	Спектр лизиса, %	Диапазон ЭБ*	№ ГКПМ-Оболенск
КрV135	Сточные воды, проба № 28 (г. Серпухов)	KPi261	7,4	0,000001-1	Ph-109
КрV289		KP9	5,1	0,0001-1	Ph-94
КрV41	Сточные воды, проба № 41 (г. Пущино)	KPi261	6,5	0,000001-1	Ph-108
КрV475	Клинические образцы, проба № 47 (НИИН им. Бурденко, г. Москва)	KPB1802	6,5	0,0001-1	Ph-111
КрV477		KPB463-13	18,1	0,000001-1	Ph-112
КрV48	Клинические образцы, проба № 48 (НИИН им. Бурденко, г. Москва)	KPB1515-1	8,3	1-1	Ph-121
КрV52	Сточные воды, проба № 52 (г. Серпухов)	KPi1627	2,7	0,0001-1	Ph-116
КрV522		KPB475	5,6	0,01-1	Ph-113
КрV523		KPi4891	5,6	0,01-1	Ph-118
КрV524		KPB1802	5,1	0,1-1	Ph-114
КрV71	Сточные воды, проба № 71 (г. Серпухов)	KPi261	6,04	0,000001-1	Ph-115
КрV74	Сточные воды, проба № 74 (г. Серпухов)	KPi1748	5,1	0,0001-1	Ph-139
КрV79	Сточные воды, проба № 79 (г. Серпухов)	KPi8289	8,8	0,00001-1	Ph-140
КрV762	Сточные воды, проба № 76 (г. Серпухов)	KPi1627	4,2	0,000001-1	Ph-141
КрV763		KPB71	8,8	0,001-1	Ph-142
КрV765		KPB475	6,04	0,000001-1	Ph-143
КрV766		KP9	9,8	0,000001-1	Ph-119
КрV767		KPi4891	4,7	0,01-1	Ph-120

Примечание: * ЭБ – эффективность бляшкообразования; показатель в интервале от 0,1 до 1 отражает высокую, от 0,001 до 0,01 – среднюю, 0,0001 и менее – низкую ЭБ.

Оценка литического спектра и специфичности бактериофагов на коллекции штаммов *K. pneumoniae* показала, что выделенные фаги лизируют от 2,7 до 18,1 % штаммов с различной эффективностью бляшкообразования. Дополнительные параметры литической активности (время адсорбции, латентный период, выход фага в расчете на бактериальную клетку) определены для бактериофагов КрV41, КрV71, КрV135, КрV52, КрV79, КрV74 и КрV289: время адсорбции 90 % фаговых частиц – от 1 (КрV74) до 6 минут (КрV79), латентный период – от 10 (КрV74) до 22 минут (КрV71), выход фаговых частиц на 1 бактериальную клетку – от 40 (КрV71) до 130 (КрV289).

Стоит отметить, что общей особенностью морфологии негативных колоний всех выделенных бактериофагов является образование ореола вокруг прозрачной зоны лизиса, косвенно указывающее на наличие растворимого фермента, предположительно деполимеризующего капсульный полисахарид *K. pneumoniae* (рисунок 4).



Рисунок 4 – Негативные колонии бактериофагов КрV79 (А), КрV767 (Б), КрV762 (В).

Все выделенные и исследованные бактериофаги паспортизованы и депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», что делает их доступными для других исследователей (таблица 2).

Применение метода полиморфизма длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) позволило убедиться в уникальности каждого бактериофага, а также дифференцировать между собой фаги, обладающие идентичным спектром литической активности.

Для более подробной характеристики определили полную нуклеотидную последовательность генома 13 бактериофагов. При биоинформационном анализе в геномах бактериофагов выявили предполагаемые гены, необходимые для репликации и транскрипции ДНК, упаковки ДНК в капсид, а также гены, кодирующие структурные белки капсида, хвостового комплекса и литические ферменты (рисунок 5). Следует отметить, что в ходе анализа последовательностей фаговых геномов не выявили известных генов вирулентности, резистентности к антибиотикам или генов, кодирующих белки, обладающие токсическими свойствами. Этот факт позволяет рекомендовать исследуемые бактериофаги для применения в лечебно-профилактических целях ввиду наличия их всесторонней характеристики и отсутствия негативных качеств. Аннотированные геномы бактериофагов депонировали в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank.

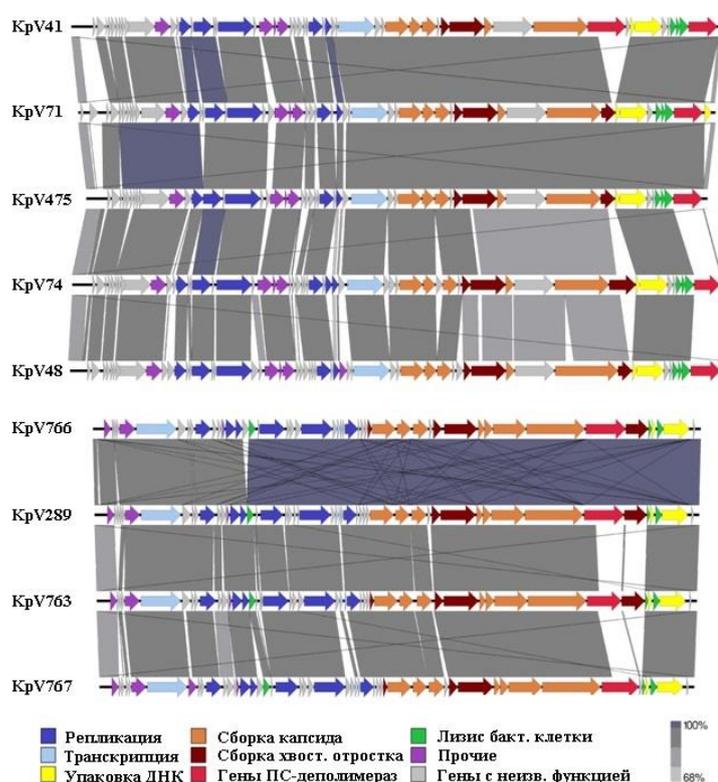


Рисунок 5 – Сравнение последовательностей генома подовирусов с помощью программы Easyfig.

Известно, что последовательности некоторых основных генов и их продуктов (например, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, терминазы, основного белка капсида) могут быть использованы для определения таксономического положения бактериофагов (Noai et al., 2016). На основании гомологии с аминокислотными последовательностями ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы выделенных бактериофагов и бактериофагов известных таксономических групп из базы данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI) установили, что девять бактериофагов относятся к семейству Podoviridae (рисунок 6), три – к семейству Myoviridae и один - к Siphoviridae. Для уточнения таксономического положения исследуемых бактериофагов сравнивали геномы внутри семейства. Так, с помощью алгоритмов попарного выравнивания BLAST и megablast выявили среди подовирусов две группы фагов с высокой гомологией в пределах каждой из них. Бактериофаги KpV41, KpV48, KpV71, KpV74 и KpV475 показали высокую степень идентичности с бактериофагами рода *Kp34virus*, в то время как остальные подовирусы (KpV289, KpV763, KpV766 и KpV767) расположились среди фагов рода *Kp32virus* на одной ветви с известными клебсиеллезными фагами K11, K30 и KP32.

Таким образом, согласно геномной структуре, гомологии последовательностей и филогенетическим данным, подовирусы KpV763, KpV766 и KpV767 классифицированы как представители рода *Kp32virus*, а бактериофаги KpV41, KpV48, KpV71, KpV74 и KpV475 отнесены к роду *Kp34virus* (таблица 3).

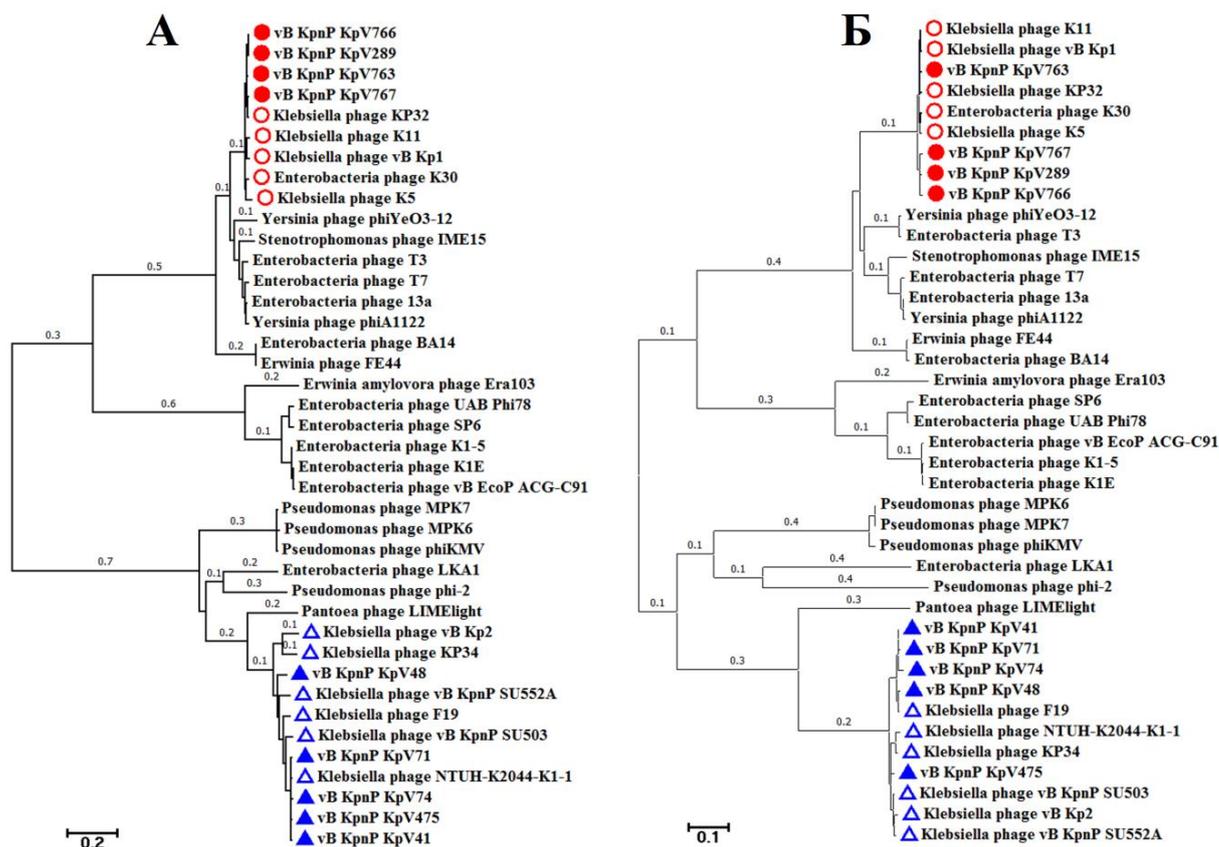


Рисунок 6 – Филогенетическое дерево, основанное на аминокислотных последовательностях ДНК- (А) и РНК-полимеразы (Б) бактериофагов семейства Podoviridae, подсемейства Autographivirinae. Кругами обозначены фаги рода *Kp32virus*, треугольниками – фаги рода *Kp34virus*. Значки бактериофагов, представленных в исследовании – закрашены.

Аналогичное сравнение геномных последовательностей миовирусов показало, что KpV52 и KpV79 являются близкородственными и, в то же время, существенно отличаются от бактериофага KpV477, отнесенного к подсемейству Tevenvirinae и роду *Jd18virus* (таблица 3). Фаги KpV52 и KpV79 не удалось классифицировать до рода в связи с отсутствием в базе данных GenBank достаточного количества гомологичных фаговых геномов. Использование алгоритма megablast позволило отнести единственный сифовирус KpV522 к подсемейству Tunavirinae, род *Kp36virus* (таблица 3).

Таблица 3 – Таксономическое положение бактериофагов

Название	Таксономическое положение		
	Семейство	Подсемейство	Род
KpV41	Podoviridae	Autographivirinae	<i>Kp34virus</i>
KpV475			
KpV48			
KpV71			
KpV74			<i>Kp32virus</i>
KpV289			
KpV763			
KpV766			
KpV767	Myoviridae	не определено	не определен
KpV52			
KpV79			
KpV477	Siphoviridae	Tevenvirinae	<i>Jd18virus</i>
KpV522		Tunavirinae	<i>Kp36virus</i>

Капсулоспецифичные бактериофаги

Как было отмечено выше, исследуемые бактериофаги лизируют достаточно узкий круг бактериальных штаммов (при тестировании на суммарной коллекции штаммов *K. pneumoniae*) (таблица 2). Узкий спектр литической активности выделенных бактериофагов может указывать на высокую степень специфичности. При изучении спектра литического действия фагов, а также при изучении характеристик лизируемых штаммов обнаружили бактериофаги, инфицирующие штаммы конкретных капсульных типов – K1, K2 и K57, то есть капсулоспецифичные бактериофаги (таблица 4).

Таблица 4 – Литический спектр капсулоспецифичных бактериофагов

Бактериофаг	К-тип	% лизиса штаммов К-типа	Количество лизируемых штаммов других К-типов
КрV41	K1	92,3	1 (K57), 1 (K62)
КрV71	K1	92,3	1 (K62)
КрV135	K1	92,3	2 (K57), 1 (K62)
КрV475	K1	92,3	1 (K57), 1 (K62)
КрV522	K1	84,6	1 (ND)
КрV524	K1	92,3	–
КрV765	K1	92,3	1 (K2)
КрV52	K2	17,6	–
КрV74	K2	29,4	1 (K13)
КрV762	K2	23,5	1 (ND)*
КрV763	K2	44,1	3 (ND), 1 (K13)
КрV79	K57	73,0	–
КрV523	K57	50,0	–
КрV767	K57	38,5	–

*ND – капсульный тип штамма не дифференцирован.

K1-специфичные фаги. Бактериофаги данной группы лизируют от 84,6 до 92,3 % штаммов K1-типа. Бактериофаги КрV41, КрV71, КрV135, КрV475, КрV524 не лизируют лишь один штамм K1-типа из нашей коллекции – КРВ463-13. При анализе состава капсульных полисахаридов данного штамма оказалось, что моносахаридный состав его капсульного полисахарида несколько отличается от состава капсульных полисахаридов другого штамма K1-типа – КРi261, лизируемого всеми K1-специфичными фагами. Это позволяет предположить, что отличие в составе полисахаридов штамма КРВ-463-13 является причиной отсутствия лизиса указанными бактериофагами. Что касается лизиса штаммов других капсульных типов – возможно, это объясняется уникальностью капсульных полисахаридов данных штаммов.

K2-специфичные фаги. Процент лизиса штаммов K2-типа колеблется от 17 до 29 %. Лизис единственного штамма капсульного типа K13 бактериофагами КрV74 и КрV763 объясним, так как известно, что штаммы K2- и K13-типов обладают перекрестной сероспецифичностью и имеют сходную структуру капсульных полисахаридов (Pieroni et al., 1994).

K57-специфичные фаги. Фаги данной группы лизируют от 38,5 % (КрV767) до 73 % (КрV79) штаммов капсульного типа K57 и не активны по отношению к *K. pneumoniae* других капсульных типов.

В итоге, по крайней мере восемь капсулоспецифичных бактериофагов (K1- и K57-специфичные фаги) лизируют не менее 70 % штаммов определенного для них капсульного типа (таблица 4). Эти данные предполагают потенциальную возможность использования капсулоспецифичных фагов в качестве типизирующей панели для штаммов K1- и K57-типов.

При оценке специфичности действия бактериофагов обнаружили интересный эффект – бактериофаги могут не образовывать полноценные негативные колонии, но при нанесении капли фаголизата (с высоким титром фага) на бактериальном газоне формируется мутное пятно. Этот эффект, очевидно, вызван фаговыми ПС-деполимеразам. Например, K2-специфичный бактериофаг КрV74 лизирует лишь 29,4 % штаммов K2-типа, но за счет эффекта «мутного пятна» дополнительно удалось распознать 55,8 % штаммов K2-типа, не лизируемых фагом (таблица 5).

Таблица 5 –Характеристика активности капсулоспецифичных фагов на газоне чувствительных штаммов *K. pneumoniae*

Бактериофаг	К-тип	Формирование НК, % штаммов	Формирование мутного пятна, % штаммов	Общий % распознанных штаммов К-типа
КрV522	К1	84,6	15,4	100
КрV524	К1	92,3	7,7	100
КрV765	К1	92,3	7,7	100
КрV52	К2	17,6	58,8	76,4
КрV74	К2	29,4	55,8	85,2
КрV762	К2	23,5	64,7	88,2
КрV763	К2	44,1	20,5	64,6
КрV79	К57	73,0	19,2	92,2
КрV523	К57	50,0	34,6	84,6
КрV767	К57	38,5	46,2	84,7

Таким образом, изучение особенностей капсулоспецифичных бактериофагов и их ПС-деполимераз представляется перспективным направлением в связи с возможностью их использования для капсулотипирования клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Рекомбинантные фаговые полисахарид-деполимеразы

В свете того, что капсула является одним из основных факторов вирулентности *K. pneumoniae*, актуальным является поиск и изучение механизма действия ПС-деполимераз капсулоспецифичных фагов. Так как за полисахарид-деполимеразную активность ответственны структуры, чаще всего расположенные в пределах хвостового отростка, мы проанализировали аминокислотные последовательности белков хвостовых структур капсулоспецифичных фагов, а также некоторых гипотетических протеинов на наличие структурной гомологии с полисахарид-деградирующими ферментами в белковых базах данных (таблица 6).

В результате проведенного анализа в геномах К1-специфичных (КрV41, КрV475, КрV71), К2-специфичных (КрV52, КрV74, КрV763) и К57-специфичных фагов (КрV79 и КрV767) были обнаружены гены, кодирующие белки с предполагаемым доменом полисахарид-деполимеразы. В близкородственных подовирусах КрV41 и КрV475 идентифицировали белки, содержащие по два мотива ПС-деполимеразы, а у бактериофага КрV41 выявили два вероятных белка с ПС-деполимеразным доменом (рисунок 5). Интересные результаты получили при анализе фагов КрV763 и КрV767, имеющих разную специфичность (К2 и К57, соответственно). Эти вирусы были выделены из одного образца сточных вод, по данным филогенетического анализа они являются представителями рода *Kp32virus* подсемейства *Autographivirinae* семейства *Podoviridae* и имеют высокую степень гомологии ДНК, за исключением области кодирования белков, содержащих мотивы ПС-деполимераз (рисунок 5). Выделение из одной экологической ниши высоко гомологичных фагов, кодирующих различные полисахарид-деградирующие ферменты, указывает на высокие адаптационные свойства бактериофагов, которые позволяют им расширять диапазон хозяев и распространяться в новую среду.

По данным, представленным в таблице 6, можно отметить, что аминокислотные последовательности выявленных белков имеют сходство с такими ферментами как пектат-лиазы (КФ 4.2.2.2), пектин-лиазы (КФ 4.2.2.10) и гликозид-гидролазы (КФ 3.2.1).

Для клонирования и экспрессии предполагаемых генов, кодирующих ПС-деполимеразы (Dep), использовали плазмидный вектор рЕТ22b(+), позволяющий секретировать белковый продукт в периплазматическое пространство клеток-продуцентов (*E.coli BL21* (DE3)). Для всех бактериофагов разработали праймеры для клонирования полноразмерных генов, а для клонирования генов, кодирующих ПС-деполимеразы бактериофагов КрV763 и КрV767, дополнительно разработали пары праймеров (таблица 2.2) для получения ампликона без N-концевого домена (рядом исследований показано, что N-концевой домен не является необходимым для правильной сборки и ферментативной активности деполимеразы). Сборку рекомбинантного вектора проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции *NcoI* и *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, США). Таким образом клонировали полноразмерные гены *kpv71_52*, *kpv52_42*, *kpv74_56*, *kpv79_42*, кодирующие предполагаемые ПС-деполимеразы фагов КрV71, КрV52, КрV74 и КрV79, соответственно, а также гены *kpv763_43* и *kpv767_46*, с делецией области кодирования N-терминального домена ПС-деполимераз бактериофагов КрV763 и КрV767, соответственно.

Таблица 6 – Анализ генов, предположительно кодирующих ПС-деполимеразы

Флаг	Ген (Protein ID, NCBI)	Размер белка, А.о.	Координаты домена, А.о.	Семейство	Анализ
KpV41	kpv41_55 (ALO80745.1)	651	35-406	Polygalacturonase; Glyco hydro 28	HHpred
			16-357 358-643	Pectin lyase fold	InterPro
	kpv41_46 (ALO80736.1)	858	1-141 356-579	Phage T7 tail fiber protein Pectate lyase 3	HHpred
KpV475	kpv475_51 (ANO57720.1)	651	87-405	Polygalacturonase; Glyco hydro 28	HHpred
			358-643 39-357	Pectin lyase fold	InterPro
KpV71	kpv71_52 (AMQ66478.1)	651	87-456	Glyco hydro 28	HHpred
			358-472 6-353	Pectin lyase fold	InterPro
KpV74	kpv74_56 (APZ82768.1)	577	85-303	Pectate lyase 3	HHpred
			423-572	Galactose-binding domain	InterPro
KpV52	kpv52_42 (AOZ65386.1)	668	76-448	Tailspike protein	HHpred
			515-668	Hyaluronate lyase	
			190-403	Pectin lyase fold	InterPro
			513-665	Galactose-binding-like domain	
KpV763	kpv763_43 (AOT28172.1)	777	1-152	Phage T7 tail fiber protein	HHpred
			295-525	Pectate lyase 3	
KpV79	kpv79_42 (ATI16495.1)	721	143-519	Pectate lyase 3	HHpred
			173-567	Pectin lyase fold	InterPro
KpV767	kpv767_46 (AOZ65519.1)	843	1-157	Phage T7 tail fiber protein	HHpred
			298-594	Polygalacturonase; Glyco hydro 28	
			298-835	Pectin lyase-like	InterPro

Активность рекомбинантных деполимераз определяли на газонах бактериальных культур (спот-тест), а также на экстрактах капсульных полисахаридов. Обладающие ферментативной активностью рекомбинантные ПС-деполимеразы оставляли мутное пятно в месте нанесения на газон чувствительной бактериальной культуры, инактивированной в парах хлороформа (рисунок 7, А). Для дополнительного подтверждения активности проводили микроскопию окрашенных по Бурри-Гинсу мазков из зоны нанесения рекомбинантной ПС-деполимеразы, сравнивая их с мазками культуры, не обработанной ПС-деполимеразой. Данные, представленные на рисунке 7 (Б, В), демонстрируют существенное уменьшение капсульного материала у клеток, находившихся в зоне действия фермента.

Активные ПС-деполимеразы также снижали вязкость растворов в воде капсульных полисахаридов чувствительных штаммов. Таким образом установили, что ферментативной активностью обладают ПС-деполимеразы Dep_kpv71, Dep_kpv74, Dep_kpv79 и Dep_kpv767del. Ферменты Dep_kpv52 и Dep_kpv763del не проявляли полисахарид-деградирующей активности ни на газонах чувствительных бактериальных штаммов, ни на их капсульных полисахаридах.

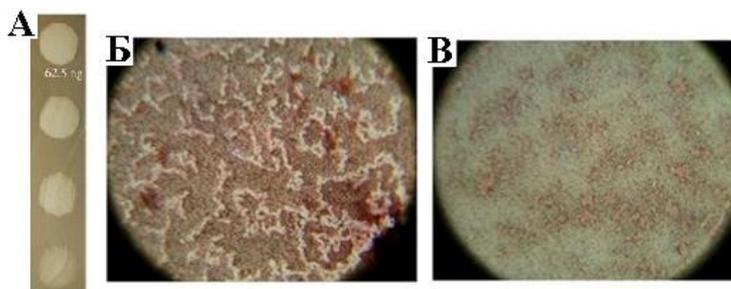


Рисунок 7 – Активность рекомбинантной ПС-деполимеразы K2-специфичного фага КрV74. (А) – спот-тест – мутные зоны в месте нанесения ПС-деполимеразы Dep_kpv74 (сверху-вниз: двукратные разведения препарата) на газоне *K. pneumoniae* KPi1627 (K2-тип); (Б) – клетки *K. pneumoniae* KPi1627 из бактериального газона, не обработанного ПС-деполимеразой (световой микроскоп, окраска тушью) – неокрашенные зоны вокруг малиновых клеток свидетельствуют о наличии полисахаридной капсулы; (В) – клетки *K. pneumoniae* KPi1627 из пятна на бактериальном газоне, образованном при нанесении Dep_kpv74 (световой микроскоп, окраска тушью) – капсула не выявлена.

Для оценки специфичности рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз хроматографически очищенные ферменты тестировали на культурах штаммов *K. pneumoniae* разных капсульных типов. В таблице 6 представлены результаты сравнительного анализа, которые подтверждают предположение о более высоком уровне специфичности рекомбинантных ПС-деполимераз по сравнению с нативными бактериофагами.

Таблица 6 – Сравнение степени специфичности бактериофагов и рекомбинантных ПС-деполимераз.

Штамм	ГМ	К-тип	Dep_kpv71	КрV71	Dep_kpv74	КрV74	Dep_kpv79	КрV79
КРВ1103	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ1493-1	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ1802	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ2580	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ475	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ594	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРi1683	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРi261	+	K1	+	+	-	-	-	-
КРS73	+	K1	+	+	-	-	-	-
КР13-5	-	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ470	-	K1	+	+	-	-	-	-
КРВ463-13	+	K1	-	-	-	-	-	-
КРВ1759	-	K62	-	+	-	-	-	-
КРВ4010	+	K2	-	-	+	+	-	-
КРВ463-16	+	K2	-	-	+	+	-	-
КРi1627	+	K2	-	-	+	+	-	-
КРВ492-16	+	K2	-	-	+	+	-	-
КРi6208	+	K2	-	-	+	+	-	-
КРВ1102	-	K2	-	-	+	-/+	-	-
КРВ1294	-	K2	-	-	+	-/+	-	-
КРВ1956	-	K2	-	-	+	-/+	-	-
КРВ38	-	K2	-	-	-	-	-	-
КР5021	-	K13	-	-	+	+	-	-
КРВ811	+	K57	-	-	-	-	+	-/+
КРВ612-1	+	K57	-	-	-	-	+	+
КРВ757	+	K57	-	-	-	-	+	+
КРi8289	+	K57	-	-	-	-	+	+
КРВ690	+	K57	-	-	-	-	+	+
КРВ697-1	-	K57	-	-	-	-	+	+
КРВ697-2	-	K57	-	-	-	-	+	-
КРВ1106	-	K57	-	-	-	-	+	-

Условные обозначения: «+» – образование негативных колоний (фаг) или ферментативная активность (ПС-деполимераза), «-/+» – образование мутного пятна, «-» – отсутствие эффекта.

Для определения механизма ферментативного действия рекомбинантных ПС-деполимераз мы проанализировали продукты, полученные при ферментативном расщеплении капсульных полисахаридов K2- и K57-типов препаратами Der_kpv74 и Der_kpv79, соответственно. При ферментативном расщеплении капсульного полисахарида K2-типа (выделен из штамма KPi1627) рекомбинантной ПС-деполимеразой Der_kpv74 были получены два олигосахарида – мономер и димер тетрасахаридного повторяющегося звена полисахарида (рисунок 8).

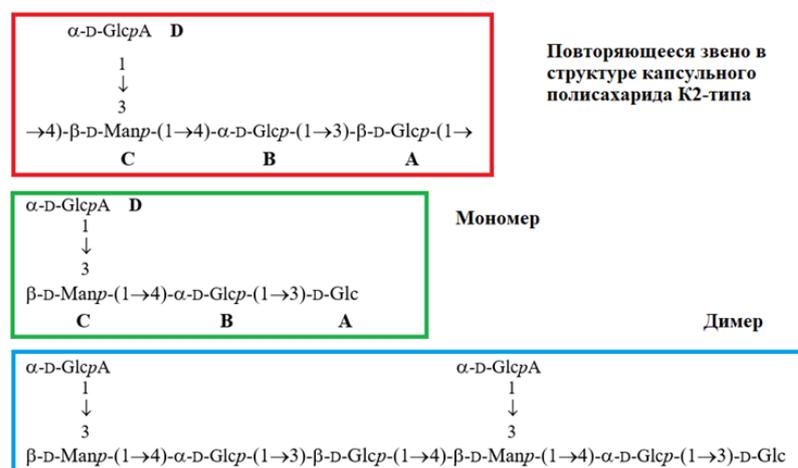


Рисунок 8 – Структура капсульного полисахарида штамма KPi1627 и олигосахарида, полученные при ферментативном расщеплении полисахарида рекомбинантной ПС-деполимеразой Der_kpv74.

Проведенный анализ показал, что рекомбинантная ПС-деполимераза Der_kpv74 расщепляет b-D-Glcp-(1→4)-D-ManpA (A→C)-связь капсульного полисахарида K2-типа.

В свою очередь, ферментативное расщепление капсульного полисахарида K57-типа (выделен из штамма KPi8289) рекомбинантной ПС-деполимеразой Der_kpv79 показало, что также, как при действии Der_kpv74, образуются мономер и димер тетрасахаридного повторяющегося звена полисахарида, но расщепление происходит по b-D-Galp-(1→3)-D-GalpA (A→C)-связи капсульного полисахарида K57-типа (рисунок 9).

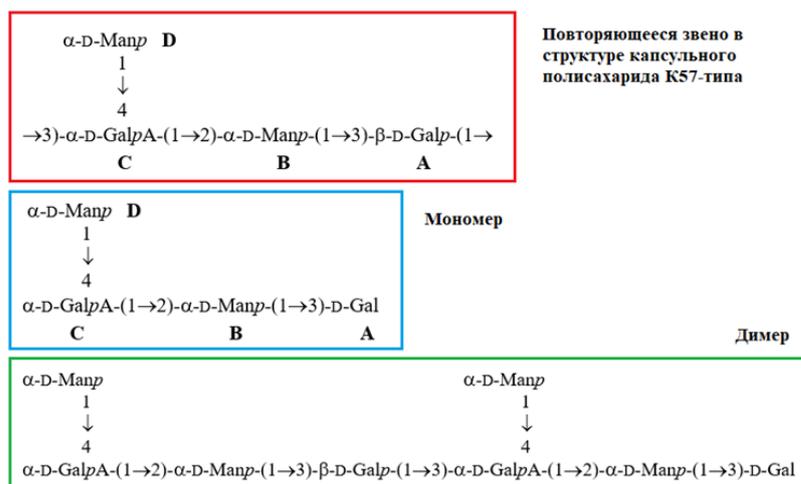


Рисунок 9 – Структура капсульного полисахарида штамма KPi8289 и олигосахарида, полученные при ферментативном расщеплении полисахарида рекомбинантной ПС-деполимеразой Der_kpv79.

Таким образом, на основании полученных данных, можно сделать вывод, что рекомбинантные белки Der_Kpv74 и Der_Kpv79 являются специфическими гликозидазами, катализирующими расщепление полисахаридов *K. pneumoniae* по β-глюкозидным и β-галактозидным связям, соответственно.

Перспектива практического использования капсулоспецифичных бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз

Достаточно высокий уровень специфичности бактериофагов, лизирующих бактерии определенных капсульных типов, позволяет использовать их как средство направленной борьбы с клинически значимыми штаммами *K. pneumoniae*. Капсулоспецифичные бактериофаги можно использовать как моносредства (например, фаг или смесь фагов, лизирующих только штаммы одного капсульного типа) – таким образом осуществляется таргетная терапия, позволяющая лизировать конкретный патоген известного капсульного типа.

В качестве примера исследовали предполагаемый лечебно-профилактический потенциал K2-специфичного бактериофага КрV74. Для этого моделировали *K. pneumoniae*-инфекцию мягких тканей бедра у мышей (рисунок 10).

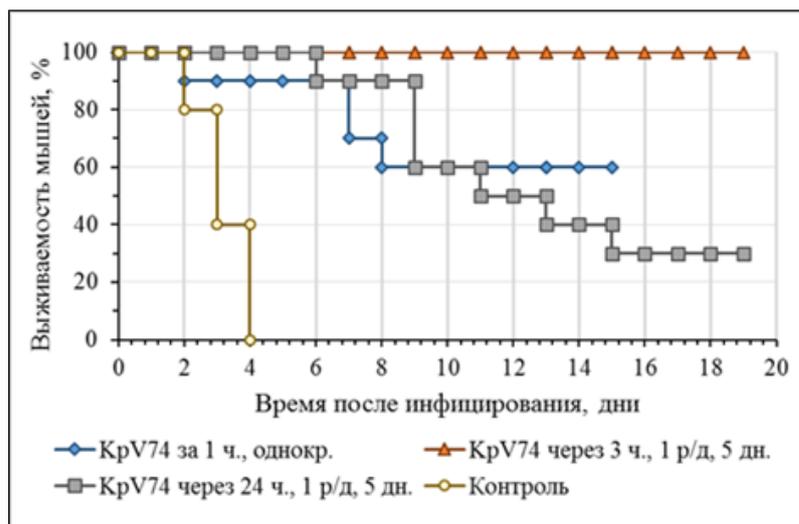


Рисунок 10 – Эффективность бактериофага КрV74 при лечении и профилактике инфекции мягких тканей бедра, вызванных вирулентным гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae* KPi1627 (инфицирующая доза 100 LD₅₀) у мышей.

Полученные результаты показали, что наилучший терапевтический эффект был достигнут при раннем начале лечения (через 3 часа после инфицирования, 1 раз в день в течение 5 суток): все мыши (n=10) через две недели после окончания курса фаготерапии были живы, тогда как все мыши контрольной группы погибли на 2-4 сутки после инфицирования. При более поздней фаготерапии (через 24 часа) выживаемость составила 30 %, а в режиме профилактики (введение бактериофага за 1 час перед инфицированием) – 60 %. У выживших мышей в течение двух недель после курса фаготерапии отсутствовали общие и местные признаки инфекционного процесса. Бактериологический анализ органов и тканей выживших животных из этих групп показал, что они не являются носителями *K. pneumoniae*.

Другой вариант использования – смесь бактериофагов, лизирующих бактерии K1-, K2- и K57-типов. К этой смеси могут быть добавлены фаги, обладающие широким спектром литического действия. Терапия подобным коктейлем может существенно ускорить элиминацию возбудителя в случае невозможности быстрого определения капсульного типа бактериального штамма. Для оценки эффективности антибактериального действия фагового коктейля использовали бактериофаги КрV71 (K1-специфичный), КрV74 (K2-специфичный), КрV79 (K57-специфичный), КрV477 (без выраженной K-специфичности, наиболее широкий круг хозяев среди всех фагов коллекции) и КрV289 (без выраженной K-специфичности, лизирует некоторые гипермукоидные штаммы, в том числе штамм капсульного типа K20). Эффективность данного коктейля оценивали *in vitro* на гипермукоидных штаммах K1-, K2-, K20- и K57-типа. Проведенные эксперименты продемонстрировали литическую активность коктейля фагов по отношению ко всем тестируемым штаммам *K. pneumoniae* (рисунок 11).

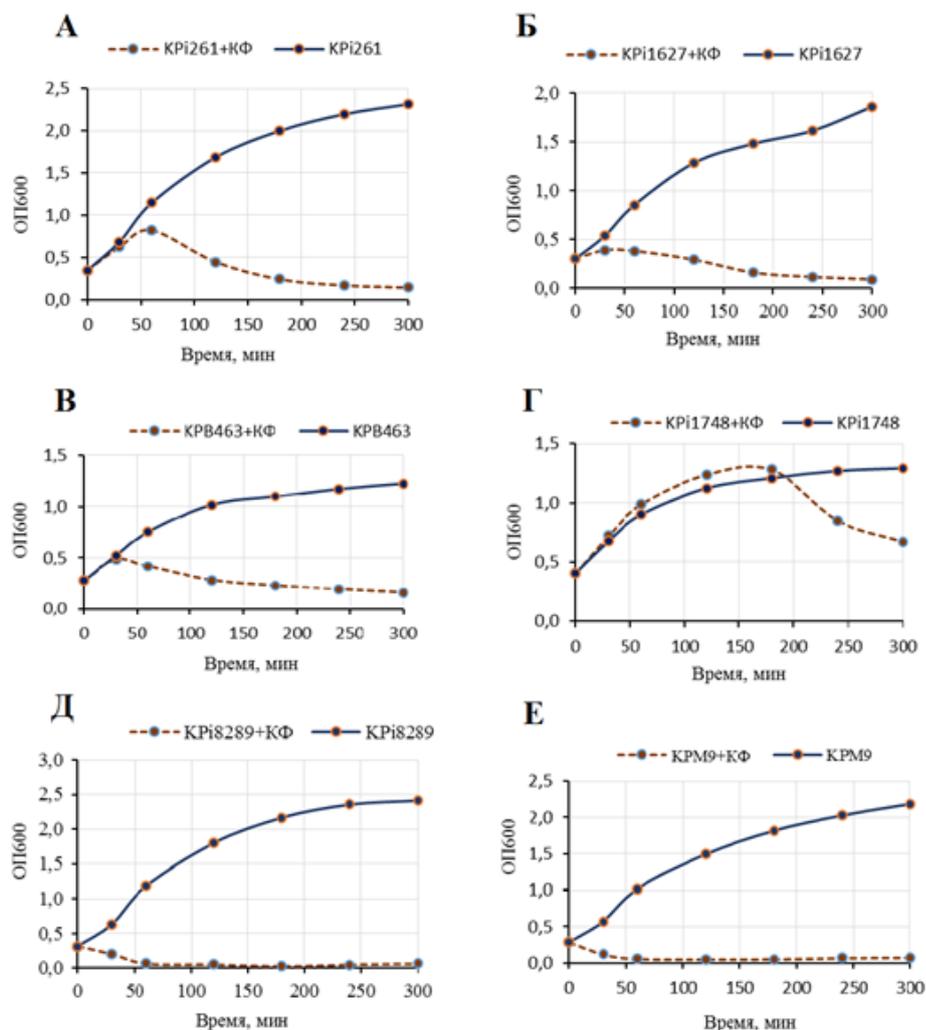


Рисунок 11 – Ингибирование роста бактерий *K. pneumoniae* разных штаммов коктейлем бактериофагов. А – штамм KPi261 (K1); Б – штамм KPi1627 (K2); В – штамм KPB463-13 (K1); Г – штамм KPi1748 (K2); Д – штамм KPi8289 (K57); Е – штамм KPM9 (K20). КФ – коктейль бактериофагов KpV71, KpV52, KpV74, KpV79, KpV477 и KpV289 (в концентрации 10^8 БОЕ/мл каждый). На каждом графике: сплошные кривые - культура *K. pneumoniae* без фагов, пунктирные кривые – то же с добавлением коктейля фагов.

Практическое применение рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз имеет, по крайней мере, два направления. В представленных выше экспериментах (таблица 6) было показано, что рекомбинантные ПС-деполимеразы имеют более высокий уровень специфичности, по сравнению с бактериофагами, что делает их пригодными для быстрой идентификации капсульного типа штаммов *K. pneumoniae*. Например, ПС-деполимераза Der_kpv79 активна по отношению к большему количеству штаммов K57-типа, чем бактериофаг KpV79, причем, и фаг, и рекомбинантный фермент не активны по отношению к *K. pneumoniae* других капсульных типов. Бактериофаг KpV71 лизирует преимущественно штаммы *K. pneumoniae* капсульного типа K1 и один штамм типа K62. В то же время, рекомбинантная ПС-деполимераза этого фага активна только по отношению к *K. pneumoniae* K1-типа, но не K62. Следует также отметить, что при постановке спот-теста активность рекомбинантных ПС-деполимераз проявляется уже через 15 минут вне зависимости от состояния бактериального газона (растущие или инактивированные хлороформом клетки). Полученные данные открывают перспективы разработки панели для типирования клинически значимых штаммов *K. pneumoniae*. Использование ПС-деполимераз, расщепляющих капсульные полисахариды K1-, K2- и K57-типов позволит быстро и эффективно выявлять наиболее вирулентные клинические изоляты *K. pneumoniae*. Кроме того, предполагается, что благодаря влиянию на основные факторы вирулентности, ферменты, подобные ПС-деполимеразам, могут найти применение в качестве терапевтических средств. Эффективность лечебно-профилактического действия K2-специфичной рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv74 подтверждена на двух

экспериментальных моделях – острого сепсиса у мышей (рисунок 12) и инфекции мягких тканей бедра (рисунок 13).

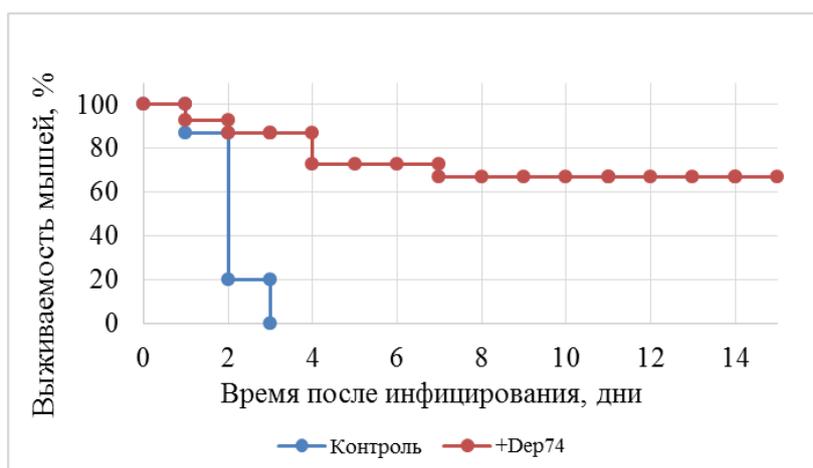


Рисунок 12 – Эффективность рекомбинантной ПС-деполимеразы Dep_kpv74 на модели острого *K. pneumoniae*-сепсиса у мышей.

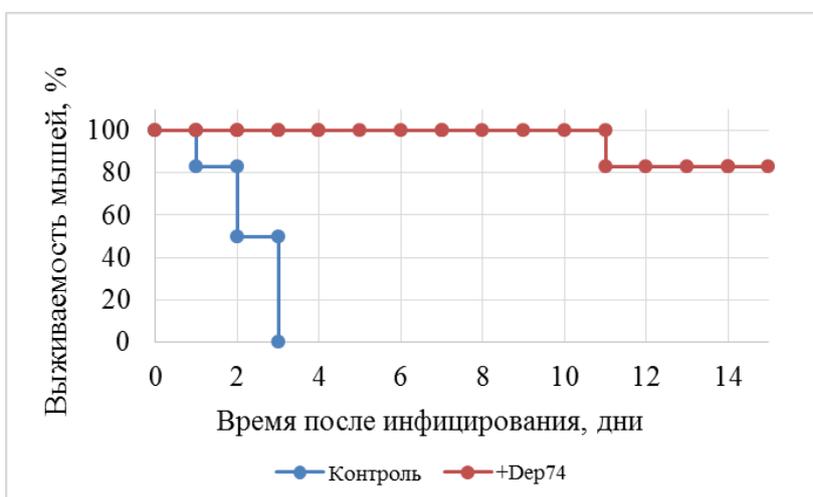


Рисунок 13 – Эффективность рекомбинантной ПС-деполимеразы Dep_kpv74 на модели *K. pneumoniae*-инфекции мягких тканей бедра у мышей.

По итогам экспериментов, в контрольных группах (без обработки Dep_kpv74) все животные погибли на 2-3 сутки (во всех случаях из крови и паренхиматозных органов выделили культуру инфицирующего штамма). В экспериментальной группе модели острого сепсиса погибла треть мышей (выживаемость более 65%). В эксперименте на модели инфекции мягких тканей бедра выживаемость мышей составила более 80% (пала одна мышь из шести, но культура инфицирующего штамма при исследовании крови и отпечатков паренхиматозных органов не была выделена). Следует отметить, что при вскрытии выживших и умерщвлённых через 15 суток животных каких-либо патологий в органах и тканях не обнаружили. Кроме того, культура *K. pneumoniae* ни у одной из мышей выделена не была, что указывает на полную санацию организма от патогена.

Тот факт, что фаговые ПС-деполимеразы проявляют полисахарид-деградирующую активность, не означает, что они обладают бактерицидным действием. При обработке бактериальной культуры рекомбинантной ПС-деполимеразой гибели клеток не происходит и их титр не снижается (показано в экспериментах на агаровой и бульонной культуре *K. pneumoniae*). Следует предположить, что полная эрадикация возбудителя из организма инфицированных мышей является следствием разрушения рекомбинантной ПС-деполимеразой полисахаридной капсулы *K. pneumoniae*, что делает бактерии менее патогенными и более уязвимыми для иммунной системы макроорганизма. Возможность использования фаговых ПС-деполимераз в качестве терапевтического инструмента, благодаря их «антивирулентному» действию, рассматривается в одной из последних работ наших зарубежных коллег (Majkowska-Skrobek et al., 2016).

ВЫВОДЫ

1. В созданной и исследованной коллекции штаммов *K. pneumoniae* обнаружено 27 (12,6 %) штаммов с гипермукоидным фенотипом, принадлежащих к капсульным типам K1, K2, K20 и K57. Из них 9 штаммов K1 и K2 типа являются высоковирулентными для лабораторных мышей.

2. Создана коллекция бактериофагов, лизирующих клинические штаммы *K. pneumoniae*, в т.ч. с гипермукоидным фенотипом. Бактериофаги охарактеризованы по литическому спектру действия и эффективности бляшкообразования. Выявлены три группы капсулоспецифичных фагов, лизирующих гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57.

3. Установлена полная нуклеотидная последовательность генома 13 бактериофагов. В геномах капсулоспецифичных бактериофагов выявлены гены, кодирующие полисахарид-деполимеризующие ферменты (ПС-деполимеразы).

4. Клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* гены, кодирующие ПС-деполимеразы бактериофагов KpV71, KpV52, KpV74, KpV79, KpV763 и KpV767. Установлено, что рекомбинантные ПС-деполимеразы Der_kpv71, Der_kpv74, Der_kpv79 обладают ферментативной активностью и проявляют более выраженную специфичность по сравнению с нативными фагами.

5. Установлено, что рекомбинантные ПС-деполимеразы Der_kpv74 и Der_kpv79 являются специфическими гликозидазами, катализирующими расщепление капсульных полисахаридов штаммов *K. pneumoniae* K2- и K57-типа по β -глюкозидным и β -галактозидным связям, соответственно.

6. Показано, что рекомбинантная ПС-деполимераза Der_kpv74 обладает «антивирулентным» потенциалом и способствует выживанию 65 % и 80 % мышей, инфицированных высоковирулентным гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae*, в моделях острого сепсиса и инфекции мягких тканей бедра, соответственно.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Ввиду широкого распространения гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae* рекомендуется совершенствование мер эпидемиологического мониторинга для своевременного выявления подобных изолятов. Необходимыми являются постановка стринг-теста (выявление признака гипермукоидности), определение капсульного типа, а также определение степени вирулентности штаммов для лабораторных животных.

2. Бактериофаги, представленные в диссертационном исследовании, рекомендуется рассматривать в качестве кандидатов для дальнейших исследований, направленных на разработку лечебно-профилактических средств для терапии инфекций, вызванных как классическими, так и гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*, устойчивыми к действию широкого ряда антибактериальных средств.

3. Рекомбинантные фаговые полисахарид-деполимеразы, полученные в представленном исследовании, рекомендуется использовать для определения капсульного типа штаммов *K. pneumoniae* по причине высокой степени их специфичности по сравнению с нативными бактериофагами.

4. Рекомбинантные фаговые полисахарид-деполимеразы рекомендуется рассматривать в качестве потенциального вспомогательного средства для применения в комплексной терапии инфекций, вызванных гипермукоидными штаммами *K. pneumoniae*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах:

1. Volozhantsev, N.V. Complete genome sequence of novel T7-like virus vB_KpnP_KpV289 with lytic activity against *Klebsiella pneumoniae* / N.V. Volozhantsev, V.P. Myakinina, A.V. Popova, A.A. Kislichkina, **E.V. Komisarova**, A.I. Knyazeva, V.M. Krasilnikova, N.K. Fursova, E.A. Svetoch // Archives of Virology. - 2016. – Vol. 161. – P. 499-501.
2. Kislichkina, A.A. Genome sequencing and comparative analysis of three hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Russia / A.A. Kislichkina, A.I. Lev, **E.V. Komisarova**, N.K. Fursova, V.P. Myakinina, T.N. Mukhina, A.A. Bogun, N.V. Volozhantsev // Pathogens and Disease. – 2017. – Vol. 75. – No. 4. – P. ftx024.
3. **Komisarova, E.V.** Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Bacteriophage vB_KpnM_KpV477 / E.V. Komisarova, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, A.G. Bogun, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // Genome Announcements. - 2017. – Vol. 5. – No.37. – P. e00694-17.

4. **Solovieva, E.V.** Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types / E.V. Solovieva, V.P. Myakinina, A.A. Kislichkina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin, V.V. Mochalov, A.I. Lev, N.K. Fursova, N.V. Volozhantsev // *Virus Research*. – 2018. – Vol. 243. – P. 10-18.
5. Lev, A.I. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2012-2016 that differ by antibiotic resistance genes and virulence genes profiles / A.I. Lev, E.I. Astashkin, A.A. Kislichkina, **E.V. Solovieva**, T.I. Kombarova, O.V. Korobova, O.N. Ershova, I.A. Alexandrova, V.E. Malikov, A.G. Bogun, A.I. Borzilov, N.V. Volozhantsev, E.A. Svetoch, N.K. Fursova // *Pathogens and Global Health*. – 2018. – Vol. 30. – P. 1-10.

Тезисы всероссийских и международных научных конференций:

1. Князева, А.И. *Klebsiella pneumoniae*: характеристика вирулентности и антибиотикорезистентности госпитальных штаммов, выделенных в Москве в 2013-2014 годах / А.И. Князева, Е.И. Асташкин, Н.Н. Карцев, **Е.В. Комисарова**, В.П. Мякина, Т.И. Комбарова, Н.В. Воложанцев, Э.А. Светоч, Н.К. Фурсова // Сборник тезисов X Молодежной школы–конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» - 2015 г.
2. **Комисарова, Е.В.** Выделение и характеристика бактериофагов, активных против гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* / Е. В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, А.И. Князева, Е.А. Денисенко, Н.В. Воложанцев // Сборник тезисов X Молодежной школы–конференции с международным участием «Актуальные аспекты современной микробиологии» - 2015 г.
3. **Комисарова, Е.В.** Выделение и характеристика бактериофагов специфичных для бактерий *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа K-1 / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, А.И. Князева, В.В. Веревкин, Н.В. Воложанцев // II Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов»: сборник тезисов / под редакцией д.б.н. Т.А. Решетиловой. Тула: Изд-во ТулГУ. – 2015. – С.15.
4. Воложанцев, Н.В. Сравнительный геномный анализ бактериофагов, инфицирующих высоковирулентные гипермукоидные штаммы *Klebsiella pneumoniae* / Н.В. Воложанцев, **Е.В. Комисарова**, В.В. Веревкин, В.М. Красильникова, А.А. Кисличкина, В.П. Мякина, А.Г. Богун, Э.А. Светоч // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Том 18. – № 2. – С.51.
5. **Комисарова, Е.В.** Геномный анализ бактериофагов, лизирующих высоковирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* капсульных типов K1 и K2 / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, В.В. Веревкин, А.А. Кисличкина, Н.В. Воложанцев // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы третьей научно-практической конференции с международным участием. – Москва: Медицинское маркетинговое агентство. – 2016. – С. 74.
6. Воложанцев, Н.В. Выделение и молекулярно-генетический анализ бактериофагов для идентификации патогенных эшерихий и клебсиелл / Н.В. Воложанцев, В.П. Мякина, В.В. Веревкин, **Е.В. Комисарова**, В.М. Красильникова, Е.А. Денисенко, А.А. Кисличкина, Э.А. Светоч // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Том 6. – №3. – С. 245.
7. Воложанцев, Н.В. Роль бактериофагов в решении проблемы устойчивости *Klebsiella pneumoniae* к антибиотикам / Н.В. Воложанцев, А.И. Борзилов, **Е.В. Комисарова**, В.П. Мякина, В.В. Веревкин, В.М. Красильникова, А.А. Кисличкина, О.В. Коробова, Т.И. Комбарова, Э.А. Светоч // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Том 19. – № 2. – С.48.
8. **Комисарова, Е.В.** Новые T7- и ФКМV-подобные вирусы, инфицирующие высоковирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* (выделение, геномный анализ и идентификация генов полисахарид-деполимераз) / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.В. Веревкин, В.М. Красильникова, А.А. Кисличкина, Н.В. Воложанцев // Проблемы медицинской микологии. – 2017. – Том 19. – № 2. – С.85.
9. **Komisarova, E.V.** Isolation and genome analysis of bacteriophages infecting hypermucoviscous highly virulent strains of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 serotypes / E.V. Komisarova, V.P. Myakinina, V.M. Krasilnikova, V.V. Verevkin, A.A. Kislichkina, N.V. Volozhantsev // Сборник тезисов «Centennial Celebration of Bacteriophage Research», P. 138. Institute Pasteur, Paris, France. April 24-26, 2017.

10. Воложанцев, Н.В. Специфичность и антибактериальный потенциал полисахарид-деполимераз бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*/ Н. В. Воложанцев, **Е.В. Соловьева**, А.И. Борзилов, В.П. Мякина, В.В. Веревкин, В.М. Красильникова, О.В. Коробова, Т.И. Комбарова // Проблемы медицинской микологии. –2018. – Т. 20. – №2. –С. 59.
11. **Komisarova E.V.** "Genome analysis of bacteriophages lytic for hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular types". Третья научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности». Москва 13–15 октября 2016 г. - стендовый доклад.
12. **Соловьева Е.В.**, Мякина В.П, Красильникова В.М., Веревкин В.В., Кисличкина А.А., Воложанцев Н.В. Фаговые полисахарид-деполимеразы, специфичные для бактерий *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа К2. Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, посвященный памяти выдающегося микробиолога Н.П. Елинова (XXI Кашкинские чтения). Санкт-Петербург 6-8 июня 2018 г. – стендовый доклад.
13. Воложанцев Н.В., **Соловьева Е.В.**, Борзилов А.И., Мякина В.П., Веревкин В.В., Красильникова В.М, Коробова О.В., Комбарова Т.И. Специфичность и антибактериальный потенциал полисахарид-деполимераз бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*. Всероссийский конгресс по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии, посвященный памяти выдающегося микробиолога Н.П. Елинова (XXI Кашкинские чтения). Санкт-Петербург 6-8 июня 2018 г. – стендовый доклад.

Примечание: Комисарова, Komisarova – фамилия Соловьевой Е.В. до 2 августа 2017 года.

Выражаю искреннюю благодарность:

моему научному руководителю к.б.н. Воложанцеву Н.В.
за оказанную помощь при выполнении диссертационной работы;
сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ Мякининой В.П., к.б.н. Красильниковой В.М.,
к.б.н. Веревкину В.В., Лев А.И., к.м.н. Борзилову А.И., к.б.н. Кисличкиной А.А., к.б.н. Комбаров Т.И.
и к.б.н. Коробовой О.В. за содействие в проведении экспериментальных исследований;
Государственному научному центру прикладной микробиологии и биотехнологии в лице академика
РАН, д.м.н., профессора Дятлова И.А. за предоставленную возможность проведения необходимых
экспериментов для выполнения представленной работы.