

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»

На правах рукописи

СОЛОВЬЕВА
Екатерина Владимировна

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

Специальность:
03.02.03 – микробиология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н. Н.В. Воложанцев

Оболенск – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Эпидемиология инфекций, вызываемых <i>K. pneumoniae</i>	13
1.2 Гипервирулентные штаммы <i>K. pneumoniae</i> (hvKp): появление и распространение.....	15
1.2.1 Факторы, ассоциированные с вирулентностью hvKp-штаммов.....	16
1.2.2 Роль капсулы в патогенезе инфекций, вызванных hvKp-штаммами.....	19
1.2.3 Связь типа капсульного полисахарида и тяжести инфекций.....	21
1.2.4 Гиперпродукция капсульных полисахаридов.....	22
1.2.5 Антимикробная устойчивость hvKp-штаммов.....	25
1.3 Бактериофаги – общая характеристика.....	26
1.3.1 Бактериофаги порядка Caudovirales.....	29
1.3.2 Роль хвостового отростка в инициации адсорбции хвостатых бактериофагов.....	31
1.3.3 Фаговые полисахарид-деполимеразы.....	33
1.3.4 Практическое применение бактериофагов и фаговых ферментов для контроля бактериальных инфекций.....	35
1.3.5 Перспективы практического использования бактериофагов и фаговых полисахарид-деполимераз для контроля инфекций, вызываемых бактериями вида <i>K. pneumoniae</i>	38
1.4 Заключение по обзору литературы.....	41
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
2.1 Методы исследования штаммов <i>K. pneumoniae</i>	43
2.1.1 Штаммы бактерий.....	43
2.1.2 Среды для культивирования и хранения бактериальных штаммов.....	43
2.1.3 Стринг-тест.....	43
2.1.4 Определение вирулентности <i>K. pneumoniae</i> для лабораторных животных.....	44
2.1.5 Определение капсульного типа штаммов <i>K. pneumoniae</i>	44
2.1.6 Выделение, очистка и изучение состава капсульных полисахаридов гипермукоидных штаммов <i>K. pneumoniae</i>	46
2.2 Методы исследования бактериофагов.....	47
2.2.1 Выделение, концентрирование и очистка бактериофагов.....	47
2.2.2 Определение титра бактериофагов методом агаровых слоев (метод Грация).....	47

2.2.3 Оценка литической активности бактериофагов.....	48
2.2.4 Определение параметров адсорбции бактериофагов на бактериальных клетках.....	48
2.2.5 Выделение и рестрикционный анализ фаговой ДНК.....	49
2.2.6 Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов.....	49
2.2.7 Биоинформационный анализ фаговых геномов.....	49
2.2.8 Оценка эффективности антибактериального действия фагового коктейля на гипермукоидные штаммы разных капсульных типов <i>in vitro</i>	50
2.2.9 Оценка эффективности фагов на модели клебсиеллезной инфекции мышей.....	50
2.3 Методы изучения фаговых полисахарид-деполимераз.....	51
2.3.1 Клонирование генов, кодирующих фаговые полисахарид-деполимеразы.....	51
2.3.2 Выделение рекомбинантных белков.....	54
2.3.3 Изучение активности и специфичности рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз.....	55
2.3.4 Изучение механизма действия рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз.....	55
2.3.5 Оценка эффективности рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз на модели клебсиеллезной инфекции мышей.....	56
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	57
3.1 Характеристика штаммов <i>K. pneumoniae</i>	57
3.2 Выделение и характеристика бактериофагов, лизирующих <i>K. pneumoniae</i>	60
3.3 Исследования геномов бактериофагов.....	66
3.4 Капсулоспецифичные бактериофаги.....	70
3.5 Клонирование генов фаговых полисахарид-деполимераз.....	72
3.6 Активность и специфичность рекомбинантных полисахарид-деполимераз.....	76
3.7 Перспектива практического использования капсулоспецифичных бактериофагов и рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	84
ВЫВОДЫ.....	89
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	90
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	91
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ.....	94
СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	117

ВВЕДЕНИЕ

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 [68, 190]. *K. pneumoniae*, продуцирующая β-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС) и карбапенемазы, входит в группу ESKAPE-патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*) – группу резистентных микроорганизмов, способных крайне эффективно «избегать» действие различных антибактериальных средств [199]. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) рассматривает штаммы *K. pneumoniae*, несущие БЛРС и карбапенемазы, как возбудителей заболеваний первой категории приоритетности для научных разработок в области создания новых антибактериальных препаратов [250]. 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 [249].

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 [115, 215]. 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 [91, 158, 259]. 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 *hνKp*-штаммов состоит не только в высоком уровне вирулентности. С момента появления гипервирулентных штаммов в больничной среде исследователи были озабочены проблемой возможного приобретения подобными штаммами детерминант антибиотикорезистентности, т.к. при интенсивном применении антибактериальных препаратов такое развитие событий вполне прогнозируемо. Тенденция приобретения *hνKp*-штаммами детерминант резистентности на данный момент четко прослеживается по данным зарубежных исследований: первые публикации подчеркивали низкий уровень антибиотикоустойчивости *hνKp*-штаммов, в то время как сейчас мы наблюдаем, как такие штаммы становятся всё более и более резистентными. Уже выделены и описаны *hνKp*-штаммы, обладающие БЛРС и карбапенемазами [38, 146, 212]. Фактически на наших глазах происходит формирование «суперпатогена», обладающего экстремальными характеристиками вирулентности и антибиотикорезистентности. Существование *hνKp*-штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам последней линии защиты, создает серьезные проблемы в условиях, когда обычная практика антимикробной терапии невозможна.

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. В научных публикациях по клинической, прикладной и фундаментальной микробиологии последних 10 лет наблюдается повышенный интерес к бактериофагам и их возможному применению для лечения и профилактики инфекционных заболеваний [34, 48]. Публикации успешных случаев применения бактериофагов вызывают интерес специалистов, часто приводящий к потоку запросов в «фаговые» лаборатории об оказании помощи при инфекциях, не поддающихся лечению антибиотиками.

Исследование бактериофагов на современном научном уровне способствует обнаружению дополнительных средств для борьбы с патогенными бактериями. Одним из актуальных направлений исследований является изучение различных фаговых ферментов, участвующих в стадии адсорбции литических фагов на бактериальных клетках. Как известно, в основе адсорбционного процесса лежит распознавание фагом специфических рецепторов, расположенных на поверхности бактериальной клетки. Некоторые бактерии синтезируют различные вещества, которые позволяют им экранировать структуры клеточной стенки, делая адсорбцию 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 [143]. 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

Большое количество публикаций, представленных в международных базах данных, отражает повышенный интерес научного сообщества к hvKp-штаммам. 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 [131].

Эффективность клебсиеллезных бактериофагов при лечении различных инфекций продемонстрирована российскими исследователями еще в 80-х годах прошлого века [3, 4, 7, 8]. Польскими исследователями также была показана эффективность клебсиеллезных бактериофагов при лечении септических и кожных инфекций [69, 219]. Современные исследования эффективности бактериофагов для лечения инфекций проводятся на модельных животных. Активно ведутся исследования бактериофагов, лизирующих мультирезистентные штаммы *K. pneumoniae* [55, 130, 242], а также фагов, эффективных для борьбы с биопленками, сформированными *K. pneumoniae* [44, 122, 240, 241]. Особенно актуальными являются исследования бактериофагов, лизирующих карбапенем-устойчивые штаммы *K. pneumoniae* [81].

На данный момент опубликованы результаты всего лишь нескольких работ, связанных с изучением бактериофагов, лизирующих гипермукоидные hvKp-штаммы [111, 118, 150]. 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 [86, 256]. Имеется ряд исследований литических бактериофагов *K. pneumoniae* и их ферментов с ПС-деградирующей активностью [111, 114, 150]. Тем не менее,

информация о разнообразии и специфичности ПС-деполимераз фагов *Klebsiella* всё ещё ограничена малым количеством исследований. В 2016 г. D.P. Pires с соавт. провели анализ последовательности геномов 143 бактериофагов, инфицирующих бактерии 24 родов, и обнаружили в общей сложности 160 белков, предположительно являющимися ПС-деполимеразы. В этой работе упоминается только один ген, кодирующий ПС-деполимеразу клебсиеллезного бактериофага [188].

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 и задачи исследования

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

Для достижения заявленной цели были сформулированы следующие задачи:

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 КрV74 и рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv74).

Научная новизна работы

На примере крупных стационаров г. Москвы показано, что среди госпитальных изолятов *K. pneumoniae* 12,6 % штаммов являются гипермукоидными. Эти данные подтверждают сведения зарубежных исследователей, указывающих долю hvKp-штаммов среди клинических изолятов в пределах 10-15 %. Исследованные ГМ-штаммы относятся к капсульным типам K1, K2 и K57.

Выделены бактериофаги, лизирующие гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57. Это первая работа, описывающая группы капсулоспецифичных бактериофагов, лизирующих бактерии *K. pneumoniae*. Подробно изучены литические характеристики выделенных бактериофагов, а также свойства их генома. 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. До недавнего времени сообщения о присутствии гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* среди клинических изолятов в инфекционных стационарах страны отсутствовали. Выявленные штаммы охарактеризованы по капсульным типам и степени вирулентности для лабораторных животных. Благодаря данным дополнительных исследований, выполненных А.И. Лев и 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 [144]. Сведения о присутствии гипермукоидных штаммов в стационарах г. Москвы дают основу для разработки комплексных мероприятий, препятствующих распространению ГМ-штаммов с высоким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск» депонированы 17 бактериофагов, специфически лизирующих бактерии вида *K. pneumoniae*. В базу данных DDBJ/EMBL/GenBank депонированы полные нуклеотидные последовательности геномов 13 исследуемых бактериофагов. На основании проанализированных и аннотированных последовательностей геномов определено таксономическое положение бактериофагов. Бактериофаги, изученные в данном исследовании, являются основой для создания комплексного препарата для борьбы с инфекциями, вызванными гипермукоидными штаммами *K. pneumoniae* с высоким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам.

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.

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 г.). Материалы диссертации использованы в учебной программе дополнительного профессионального образования «Бактериология. Основы биологической безопасности и практика работ с микроорганизмами I-IV групп патогенность» при ФБУН ГНЦ ПМБ (Справка № 78 от 26.07.2018 г.).

Методология и методы исследования

Для достижения поставленных целей и задач исследования использовали широкий спектр методов. Для создания коллекции штаммов *K. pneumoniae* и лизирующих их бактериофагов задействовали различные микробиологические методы. Для определения степени вирулентности гипермукоидных штаммов, а также для оценки лечебно-профилактического действия бактериофагов и рекомбинантных ПС-деполимераз использовали биологические методы. Определение капсульных типов штаммов, секвенирование генома бактериофагов и клонирование генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы, выполнили с

помощью молекулярно-генетических методов. С помощью биоинформатических методов провели анализ последовательностей генома бактериофагов. Выделение, определение состава капсульных полисахаридов *K. pneumoniae*, а также продуктов их расщепления рекомбинантными фаговыми ПС-деполимеразами осуществляли с помощью биохимических методов.

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.).

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. и к.б.н. Комбаровым Т.И. (эксперименты на животных), к.б.н. Вережкиным В.В. (выделение капсульных полисахаридов), к.б.н. Красильниковой В.М., к.б.н. Мочаловым В.В. (выделение и очистка рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз) и Мякининой В.П. (определение спектра активности бактериофагов и рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз). Детекция генов вирулентности и резистентности *K. pneumoniae* проведена Лев А.И. Секвенирование фаговой ДНК проведено сотрудниками отдела коллекционных культур ФБУН ГНЦ ПМБ. Определение структуры капсульных полисахаридов *K. pneumoniae* и фрагментов ферментативного

расщепления полисахаридов проведено в лаборатории химии углеводов Института органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук (ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН) 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, Результатов и обсуждения, Заключения, Выводов, Практических рекомендаций, Списка сокращений и Списка источников литературы, который включает 24 работы отечественных и 241 работу зарубежных авторов. Работа содержит 26 рисунков и 13 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология инфекций, вызываемых *K. pneumoniae*

В 1882 году немецкий микробиолог Карл Фридендер получил чистую культуру бактерий, выделенную из легких пациента, скончавшегося от пневмонии. Выделенная культура была обозначена им как «Friedländer's bacillus» (палочка Фридендера) [96]. Название *Klebsiella* было предложено итальянским ботаником и систематиком Витторе Тревисаном в 1885 году в честь немецкого бактериолога Эдвина Клебса [231], а уже в 1887 году палочка Фридендера была переименована в *Klebsiella pneumoniae* [232]. «Определитель бактерий Берджи» характеризует бактерии вида *K. pneumoniae* как грамотрицательные прямые палочки ($0,3-1,0 \times 0,6-6,0$ мкм), располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками [45]. Эти бактерии являются факультативными анаэробами, неподвижны, не образуют спор; имеют выраженную капсулу, благодаря которой устойчивы к воздействию окружающей среды и могут долго сохраняться в почве, воде и на предметах в помещениях [19].

Бактерии вида *K. pneumoniae* принадлежат к числу убиквитарных микроорганизмов. Окружающая среда является одним из наиболее обширных резервуаров их обитания – *K. pneumoniae* обитает в почве, растениях и воде [95, 187]. Второй крупный резервуар – поверхность слизистых оболочек млекопитающих. *K. pneumoniae* часто ассоциируется с маститом крупного рогатого скота [22] и случаями серьезных инфекций других животных – собак [155], кошек [22], лошадей [88], свиней [265], нечеловекообразных обезьян [189] и птиц [196]. Также существуют данные об обнаружении *K. pneumoniae* в насекомых [84].

В организме человека *K. pneumoniae* присутствует как сапрофит носоглотки и желудочно-кишечного тракта, обнаруживается на слизистых мочеполовой системы и кожных покровах [1, 13]. Современные исследования свидетельствуют о различии в географическом распространении здоровых бактерионосителей *K. pneumoniae*. Например, при обследовании 1174 здоровых корейцев в возрасте старше 16 лет, *K. pneumoniae* была обнаружена в образцах стула у 21,1 % исследованных [67], в то время как, при исследовании в рамках проекта «Микробиом человека» Национального Института Здоровья (США) среди 242 здоровых волонтеров *K. pneumoniae* была идентифицирована только лишь в 3,8 % ректальных образцов [71].

K. pneumoniae – этиологический агент ряда инфекций человека, как госпитальных, так и внебольничных (таблица 1.1). Факторами риска возникновения *K. pneumoniae*-инфекций являются: критический возраст (младенческий или пожилой), врожденные или приобретенные

формы иммунодефицита, алкоголизм, сахарный диабет, хронические сердечные, почечные, легочные и неопластические заболевания [233].

Таблица 1.1 – Основные инфекции, вызываемые *K. pneumoniae*

Тип инфекции		Ссылки
Госпитальные	Пневмония (в т.ч. вентилятор-ассоциированная)	[138, 197]
	Инфекции мочеполового тракта	[78, 156]
	Катетер-ассоциированные инфекции	[78, 138]
	Хирургические инфекции	[32, 138]
	Менингит	[75, 134]
	Бактериемия	[21, 64]
Внебольничные	Пневмония	[133, 233]
	Инфекции мочеполового тракта	[139, 156]
	Абсцесс печени	[37, 66, 157]
	Бактериемия	[190, 194]

В последние годы принято условно делить штаммы *K. pneumoniae* на «классические» (сКр, classical *K. pneumoniae*) и «гипервирулентные» (hvКр, hypervirulent *K. pneumoniae*). Большинство *K. pneumoniae*-инфекций обусловлено сКр-штаммами, обычно проявляющими себя как оппортунистические патогены с низким уровнем вирулентности. В доантибиотическую эру большинство сКр-штаммов обладали только природной устойчивостью к пенициллину и карбенициллину [45], однако широкое применение антибактериальных препаратов впоследствии привело к проблеме множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) штаммов *K. pneumoniae*, вызывающих трудноизлечимые госпитальные инфекции [10, 20]. Как представитель группы ESKAPE-патогенов [199], *K. pneumoniae*, продуцирующая БЛРС и карбапенемазы, представляет серьезную угрозу для мирового здравоохранения. Карбапенем-устойчивая *K. pneumoniae* резистентна к широкому ряду антибактериальных препаратов, способна быстро распространяться в условиях стационара и за его пределами [203]. По данным исследователей, *K. pneumoniae*, обладающая карбапенемазной активностью, выявляется во всех регионах мира и в т.ч. на территории Российской Федерации [11, 100].

Другая относительно «молодая» проблема, связанная с *K. pneumoniae* – появление hvКр-штаммов, вызывающих серьезные внебольничные, инвазивные инфекции не только у диабетиков и иммунокомпрометированных лиц, но и у здоровых людей [145, 157, 179, 215, 224].

1.2 Гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* (hvKp): появление и распространение

В период с 1982 по 1986 гг. группа тайваньских исследователей описала семь случаев гнойного абсцесса печени, осложненного эндофтальмитом. Четверо пациентов страдали сахарным диабетом, остальные не имели в анамнезе каких-либо серьезных заболеваний. В ходе бактериологического исследования культур крови, аспиратов печени и отделяемого конъюнктивы выяснилось, что этиологическим агентом была *K. pneumoniae* [157]. В течение последних десятилетий было зарегистрировано более тысячи подобных случаев в таких странах Азиатско-Тихоокеанского региона, как Китай [263], Япония [258], Сингапур [257], Таиланд [217], Южная Корея [66] и, особенно, Тайвань [133, 234]. Благодаря проведенным исследованиям специалистами было сформировано понятие нового клинического синдрома – *K. pneumoniae*-ассоциированного абсцесса печени [91, 129]. Данный синдром характеризуется гнойной инфекцией печени, склонной к диссеминированному распространению на другие органы и ткани. Заболевание отличается молниеносным течением, в качестве осложнения чаще всего развивается эндофтальмит – тяжелая гнойная инфекция, сопровождающаяся воспалительным процессом в полости глаза и приводящая к слепоте или потере глазного яблока [147]. Среди прочих возможных осложнений описаны случаи остеомиелита, абсцессов мягких тканей, мозга, пиомиозита и бактериемии [91, 129, 145]. Штаммы *K. pneumoniae*, выявленные при данном синдроме, разительно отличались от классических и были обозначены как «гипервирулентные» (hvKp). Примечателен тот факт, что hvKp-штаммы вызывают первичные абсцессы печени не только у пациентов с отягощенным анамнезом (заболевания печени, сахарный диабет), но и у здоровых людей [145, 215, 224]. На данный момент, абсцесс печени, вызванный *K. pneumoniae*, считается эндемическим заболеванием на Тайване, а частота заболеваний, вызванных hvKp-штаммами в странах Азиатско-Тихоокеанского региона, продолжает увеличиваться. Одним из возможных объяснений того, что внебольничные абсцессы печени, вызванные *K. pneumoniae* стали частыми среди лиц без тяжелых заболеваний гепатобилиарного тракта, особенно в Азиатско-Тихоокеанском регионе, является более высокий уровень носительства *K. pneumoniae* капсульного типа K1 среди местного населения. В ранее упомянутом корейском исследовании [67], 21,1 % здоровых взрослых являлись носителями *K. pneumoniae*, среди которых 23 % составляли штаммы K1-типа. Исследование этих авторов также показало, что экологические факторы в регионе Юго-Восточной Азии играют роль в колонизации желудочно-кишечного тракта штаммами *K. pneumoniae*. Кроме принадлежности к азиатской этнической группе, некоторые эпидемиологические исследования показали более высокий уровень заболеваемости в возрастной категории 55-60 лет и

преобладание лиц мужского пола среди пациентов [218]. Сахарный диабет также был идентифицирован как фактор риска развития КП-АП-синдрома [215].

Что касается западных стран, то ранее *K. pneumoniae* являлась довольно редкой причиной абсцесса печени среди грамотрицательных бактерий: упоминается лишь восемь случаев абсцесса печени, причиной которых оказалась палочка Фридлиндера в период с 1934 по 1958 год. Во второй половине XX века среди бактериальных возбудителей абсцессов печени чаще всего фигурировали такие виды, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и *Proteus vulgaris* [213]. В 1978 году Goldman и Kowales описали нетипичный случай абсцесса печени, осложненного остеомиелитом у здорового взрослого мужчины в результате инфицирования *K. pneumoniae*, но из-за недостаточного количества данных невозможно утверждать, имеют ли hvKp-штаммы отношение к данному клиническому случаю [102].

С момента возникновения чрезвычайной ситуации в странах Азии случаи спорадических инфекций, аналогичных азиатским, зафиксированы во многих странах Северной Америки [169], Европы [37, 82], Южной Америки [76], Среднего Востока, Австралии [235, 239] и Африки [215, 218, 224].

Некоторые исследователи указывают на тот факт, что частота выделения hvKp-штаммов вне Азиатско-Тихоокеанского региона значительно ниже и большинство неазиатских случаев в основном связаны с поездками или миграцией [141]. Однако имеются данные о нескольких эпизодах инфекций у неазиатских пациентов без контактов с эндемичными регионами [215].

Стоит также отметить, что гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* обнаруживаются и среди животных. Например, в 2008 году Twenhafel с соавт. сообщили о мультисистемных абсцессах, вызванных hvKp-штаммом K2-типа у африканских зеленых обезьян (*Chlorocebus aethiops*), содержащихся в зоопарке [236]. Но большее беспокойство вызывает тот факт, что hvKp-штаммы обнаруживаются и среди животных, находящихся в дикой природе – имеются сообщения об инфекциях норок [123], макак-крабоедов [128], калифорнийских морских львов [210] и нечеловекообразных обезьян [35].

Тот факт, что животные, перечисленные выше, были обнаружены в дикой природе, повышает вероятность того, что hvKp-штаммы, инфицировавшие их, распространены в диких популяциях в избыточном количестве. Эти находки предполагают, что существует потенциальная угроза передачи таких штаммов людям.

1.2.1 Факторы, ассоциированные с вирулентностью hvKp-штаммов

Попытки идентифицировать признаки, отличающие гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* от классических, предпринимаются с момента появления hvKp-штаммов. На

данный момент основными признаками, достоверно коррелирующими с гипервирулентностью штаммов, являются: секреция сидерофоров аэробактина и сальмохелина [204], принадлежность к определенным капсульным типам (например, K1 и K2), избыточная продукция капсульных полисахаридов, приводящая к образованию так называемой «гиперкапсулы» [179], способность к утилизации алланотоина в качестве источника углерода и азота [65] и наличие транспортной системы переносчиков железа [112] (рисунок 1.1).

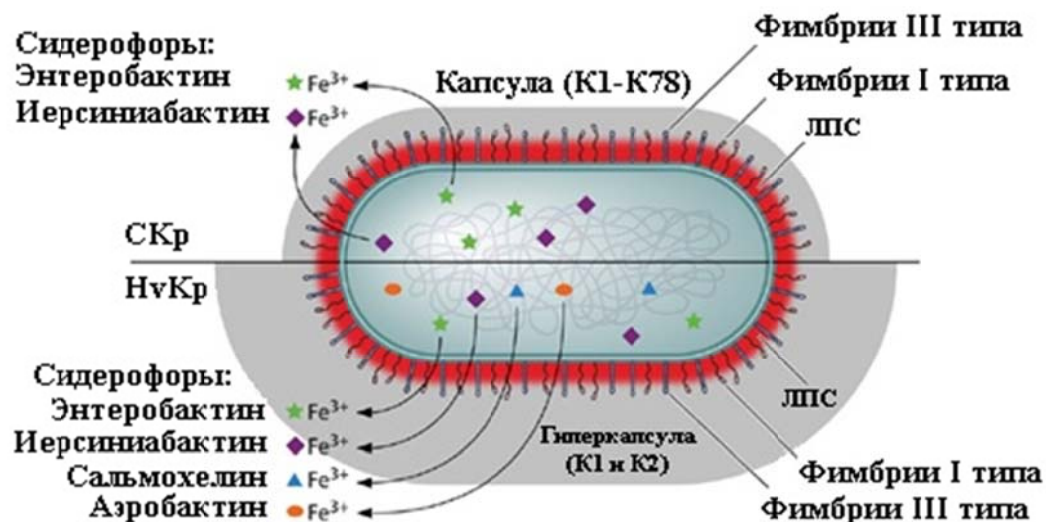


Рисунок 1.1 – Основные факторы вирулентности sKp-и hvKp-штаммов (Paczosa, 2016, с модификацией).

Некоторые признаки hvKp-штаммов обусловлены наличием большой плазмиды вирулентности pLVPK (рисунок 1.2). Эта плазида, содержащая более 200 тыс. пар нуклеотидов, кодирует аэробактин, сальмохелин, регулятор мукоидного фенотипа RmpA и белок-транспортер железа Kfu [224]. Исследования показывают, что у штаммов, утративших плазмиду pLVPK, наблюдается значительное снижение вирулентности [150], что подтверждает существенный вклад данной плазмиды в гипервирулентность *K. pneumoniae*.

Железо имеет значение для размножения практически всех бактерий в ходе формирования инфекционного процесса. Но концентрация свободных ионов железа в организме млекопитающих обычно низка, т. к. компоненты врожденной иммунной системы связывают их с целью ограничения роста ряда патогенов [53]. Например, белки-переносчики железа трансферрины выступают в качестве фактора защиты организма, ограничивая развитие бактериальной инфекции [171]. *K. pneumoniae* так же, как и множество других бактериальных патогенов, обладает определенными механизмами поглощения железа внутри организма хозяина, обеспечивающими её выживание и распространение во время инфекции.

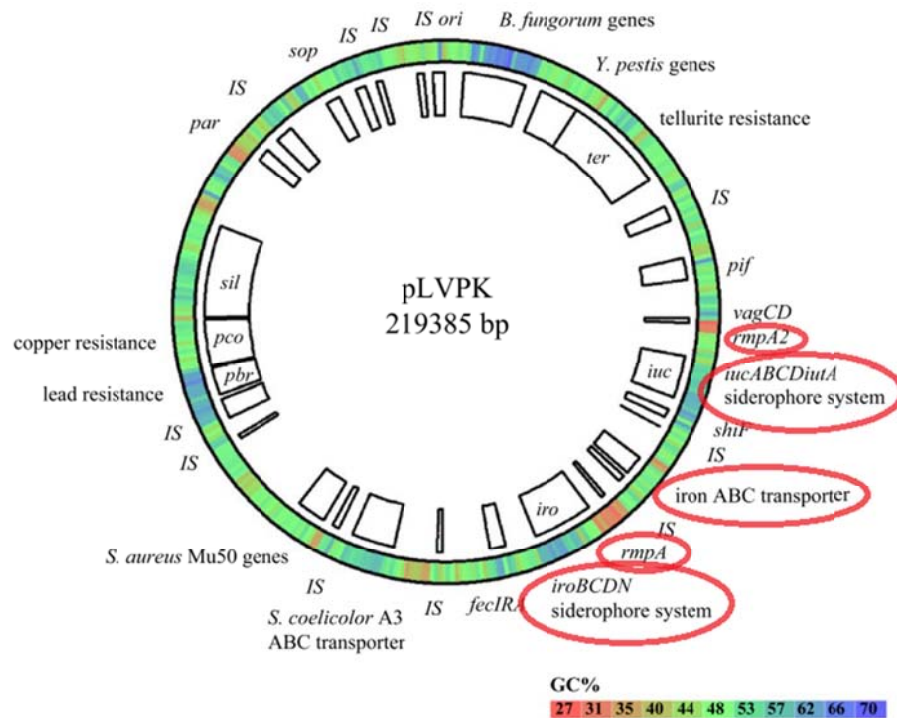


Рисунок 1.2 – Карта плазмиды pLVPK. Красным отмечены наиболее значимые гены вирулентности hvKp-штаммов: *rmpA*, *rmpA2* – гены регуляторов мукоидного фенотипа; *iucABCDiutA* siderophore system – кластер генов синтеза аэробактина; *iron ABC transporter* – ген транспортера железа *kfu*; *iroBCDN* siderophore system – кластер генов синтеза сальмохелина (Chen et al., 2004, с модификацией).

Основным механизмом, используемым *K. pneumoniae*, является связывание железа посредством секреции сидерофоров – молекул, обладающих бóльшим сродством к железу, по сравнению с транспортными белками макроорганизма [87]. *K. pneumoniae* способна к секреции четырех типов сидерофоров – энтеробактина (кластер генов *entABCDEF*), иерсиниабактина (гены высокопатогенного острова *Yersinia*), сальмохелина (кластер генов *iroBCDE*) и аэробактина (кластер генов *iucABCD*). Продукция сразу нескольких типов сидерофоров является показателем успешной колонизации разных тканей и/или избегание нейтрализации одного из сидерофоров защитными механизмами организма хозяина [171].

К секреции энтеробактина способно большинство штаммов *K. pneumoniae*, т. к. кластер генов *entABCDEF*, кодирующих его синтез, располагается на бактериальной хромосоме [195]. Продукция иерсиниабактина обеспечивается экспрессией генов, располагающихся на хромосомном «острове патогенности», очевидно, полученном микробом в результате горизонтального переноса генов [40]. Некоторые исследователи считают, что секреция иерсиниабактина также относится к факторам вирулентности hvKp-штаммов, т. к. 90 %

гипервирулентных клинических изолятов *K. pneumoniae* способны к его продукции, в то время как среди классических штаммов этот показатель достигает только 18 % (Hsieh et al., 2008).

За счет наличия плазмиды pLVPK hvKp-штаммы способны к секреции двух дополнительных типов сидерофоров – сальмохелина и аэробактина [112, 259]. Экспериментально доказано, что аэробактин может в сто раз повышать вирулентность штаммов для лабораторных мышей [175]. Исследования Russo с соавт. (2015) подтвердили, что среди всех типов сидерофоров именно аэробактин играет главную роль в росте и выживаемости hvKp-штаммов в асцитной жидкости и сыворотке крови, а также *in vivo* при моделировании инфекций у мышей [204]. Аэробактин редко встречается у классических штаммов, вызывающих, например, легочную инфекцию, в то же время он может быть преобладающим сидерофором у некоторых гипервирулентных штаммов *K. pneumoniae*, вызывающих инфекцию легких [204].

В исследовании Ma с соавт. (2005) было установлено, что ген *kfu*, кодирующий белок-транспортер трехвалентного железа, чаще встречается у высоковирулентных инвазивных клинических штаммов, вызывающих абсцессы печени, менингит или эндофтальмит [165]. Важная роль гена *kfu* в вирулентности была установлена позже в экспериментах *in vivo* при использовании hvKp-штамма с делецией гена [112]. Это подчеркивает потенциальную важность данного гена для развития инфекции, а также необходимость ионов железа для повышения уровня вирулентности *K. pneumoniae*.

Аллантоин используется многими микроорганизмами в качестве дополнительного источника углерода и азота [244]. При изучении клинических изолятов *K. pneumoniae* Chou с соавт. (2004) обнаружили, что транскрипция генов аллантаинового оперона повышена у гипервирулентных штаммов по сравнению с классическими [65]. Экспериментально показано, что делеция гена *allS* (активатор оперона) приводит к значительному снижению вирулентности hvKp-штаммов [65]. Исследователи предполагают, что аллантаин может использоваться hvKp-штаммами как единственный источник азота в аэробных условиях. Многие исследования также подтверждают, что аллантаиновый оперон широко представлен среди штаммов, ассоциированных с КП-АП-синдромом [70, 260].

1.2.2 Роль капсулы в патогенезе инфекций, вызванных hvKp-штаммами

Полисахаридная капсула (K-антиген) – первый фактор вирулентности, описанный для бактерий рода *Klebsiella* [77, 230]. В настоящее время капсула является одним из самых важных и наиболее изученных факторов вирулентности *K. pneumoniae* [74, 190]. Полисахаридная капсула позволяет бактериям выживать и распространяться внутри организма хозяина,

преодолевая защитные механизмы иммунной системы. По сравнению с бескапсульными штаммами, капсульные варианты *K. pneumoniae* реже фагоцитируются клетками врожденной иммунной системы, как в присутствии, так и в отсутствии опсоинов [85]. Предотвращение связывания бактерий иммунными клетками ограничивает процессы развития раннего воспаления и приводит к менее надежной индукции иммунного ответа [89]. Показано, что капсула способствует устойчивости бактерий против системы комплемента [90], блокирует бактерицидное действие β -дефензинов и подавляет их продукцию в эпителиальных клетках дыхательных путей [173]. В некоторых случаях капсула связывает противомикробные пептиды, вырабатываемые в процессе иммунного ответа хозяина, и предотвращает взаимодействие этих молекул с бактериальной клеткой [160]. Интересно, что в присутствии таких антимикробных пептидов, как лактоферрин и полимиксин Б, наблюдается повышение скорости секреции капсульного материала [159].

С химической точки зрения, капсула – это сложные кислые полисахариды, состоящие из повторяющихся звеньев четырех-шести сахаров, одним из которых часто является глюкуроновая кислота [73]. Основой синтеза капсулы *K. pneumoniae* является расположенный на хромосоме кластер генов *cps*, сходный с аналогичным кластером *E. coli* группы I [36]. 5'-область *cps*-кластера содержит группу, состоящую из шести консервативных генов - *galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* и *wzc*. Продукты генов *wza*, *wzb* и *wzc* вовлечены в контроль процессов полимеризации и транслокации компонентов капсулы от внутренней мембраны до поверхности клетки [248]. Продукт гена *wzi* представляет собой единственный компонент *cps*-кластера, который не является определяющим для процесса биосинтеза капсулы. Одной из функций этого белка является обеспечение контакта капсулы с наружной мембраной бактериальной клетки [248]. 3'-область *cps*-кластера состоит из генов, кодирующих глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (*gnd*) и уридиндифосфат-глюкозодегидрогеназу (*ugd*). Средняя область *cps*-кластера является более вариабельной и кодирует компоненты для Wzy-зависимой системы биосинтеза: ферменты для получения предшественников активированных моносахаридов, гликозилтрансферазы, а также интегральные белки внутренней мембраны - Wzy и Wzx [248]. Wzy-полимераза является основой для синтеза капсулы (делеция в гене *wzy* препятствует продукции полисахарида капсулы), она специфична для каждого из капсульных серотипов *K. pneumoniae* [180]. На рисунке 1.3 представлена общая схема синтеза и сборки капсульных полисахаридов *E. coli* группы I.

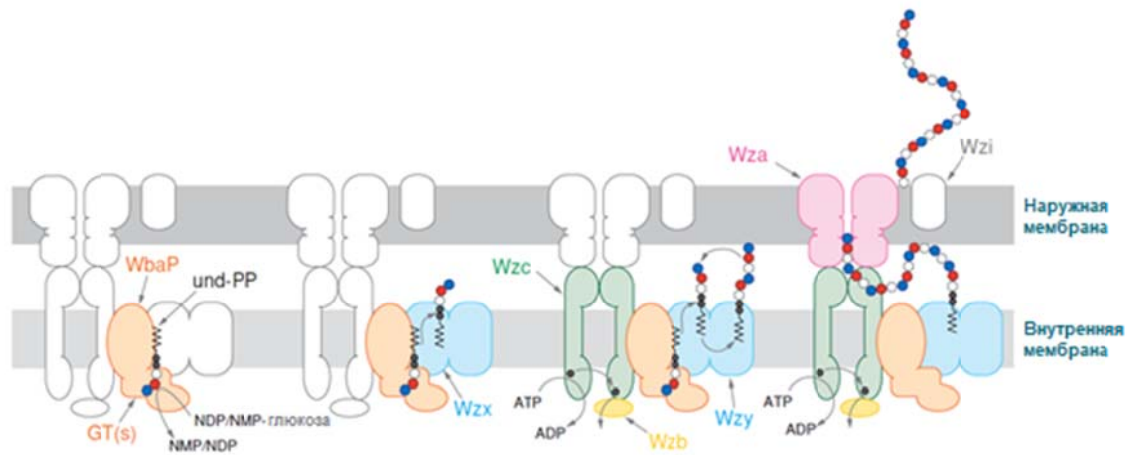


Рисунок 1.3 – Схема синтеза и сборки капсульных полисахаридов *E. coli* группы I (Whitfield, 2006, с модификацией).

Вариабельность гена *wzy* послужила основой для определения капсульного типа клинических изолятов *K. pneumoniae* методом ПЦР [234, 260]. В последнее время капсульный тип штаммов *K. pneumoniae* также определяют путем секвенирования генов *wzi* и *wzc*. Показано, что различные аллели данных генов ассоциированы со специфическими К-антигенами [49, 180].

1.2.3 Связь типа капсульного полисахарида и тяжести инфекций

Капсула, как у сКр-, так и у hvКр-штаммов, состоит из специфических полисахаридов, вклад в вирулентность которых коррелирует с типом моносахарида, присутствующего в повторяющемся звене [73]. К настоящему моменту выявлен 81 капсульный тип *K. pneumoniae* - 77 типов установлены в период с 1926 по 1977 гг. серологическими методами [178] и 4 новых типа (KN1 - KN4) охарактеризованы в течение последних лет с помощью молекулярного генотипирования [114, 180, 181].

Исследователями отмечено существование связи между типом капсульного полисахарида, продуцируемого патогенным штаммом *K. pneumoniae*, и тяжестью инфекционного процесса. Штаммы *K. pneumoniae*, выделенные при внебольничных инфекциях дыхательных путей, обычно относятся к капсульным типам К1–К6, тогда как госпитальные штаммы часто принадлежат к типам К2, К21, К55, К10 или К24. Другие К-типы (К17, К25, К22, К43, К3, К33) встречаются реже [74, 91]. Основываясь на частоте встречаемости штаммов разных К-типов, выделяемых от пациентов, и результатах экспериментов на мышах, можно утверждать, что штаммы К1- и К2-типов, как правило, более вирулентные, чем штаммы других

капсульных типов [190, 259]. Причем, капсульный тип К1 преобладает в Азии, а К2 чаще выделяется в Америке и европейских странах [190].

Существует несколько возможных причин более высокой вирулентности штаммов К1- и К2-типа по сравнению со штаммами других капсульных типов. Одна из причин эффективного выживания в тканях штаммов капсульных типов К1 и К2 состоит в том, что они способны снижать способность нейтрофилов к продукции реактивных форм кислорода [206]. Другой причиной является более высокий уровень устойчивости штаммов К1- и К2-типа к фагоцитозу альвеолярными макрофагами и нейтрофилами по сравнению с другими штаммами [140, 149]. Несостоятельность фагоцитоза таких штаммов может быть частично обусловлена наличием сиаловой кислоты в составе капсульных полисахаридов, что позволяет им мимикрировать и уклоняться от атак иммунных клеток [140]. Кроме того, в составе полисахаридной капсулы К1- и К2-штаммов отсутствуют специфические повторяющиеся остатки маннозы, благодаря чему такие штаммы могут предотвращать лектинофагоцитоз и последующую выработку провоспалительных цитокинов, привлекающих нейтрофилы и моноциты [207]. Примечательно, что многие исследования указывают на то, что капсульные полисахариды К1- и К2-типа чаще всего выявляются у hvKp-штаммов [57, 179], но встречаются и среди sKp-штаммов. В исследовании Struve с соавт. (2015), характеризующем 30 hvKp-штаммов, было установлено, что практически все они принадлежали к капсульному типу К1 (93 %), в то время как остальные штаммы относились к К2-типу [224]. Аналогичные данные получены в серии более ранних исследований [82, 235]. В дополнение к капсульным типам К1 и К2, среди hvKp-штаммов также обнаруживаются штаммы таких типов как К5, К16, К20, К28, К54, К57, К63 и КN1 [60, 91, 105, 121, 142, 158, 261]. В целом, большое количество исследований показывает, что наличие капсульных полисахаридов К1- и К2-типа частично отвечает за гипервирулентность hvKp-штаммов, а комбинация с другими факторами вирулентности (гипермукоидность и/или сидерофоры) может дополнительно усилить вирулентность *K. pneumoniae*.

1.2.4 Гиперпродукция капсульных полисахаридов

Большинство hvKp-штаммов фенотипически проявляют такое свойство как «гипермукоидность». Гипермукоидный (ГМ) фенотип считается одним из основных маркеров hvKp-штаммов, предполагается, что он может повышать инвазивные свойства микроба [90]. ГМ-фенотип обычно выявляется с помощью «стринг-теста» - тест является положительным тогда, когда нить длиной более 5 мм тянется за бактериологической петлей от колонии бактериальной культуры, выращенной на плотной питательной среде (рисунок 1.4) [90].

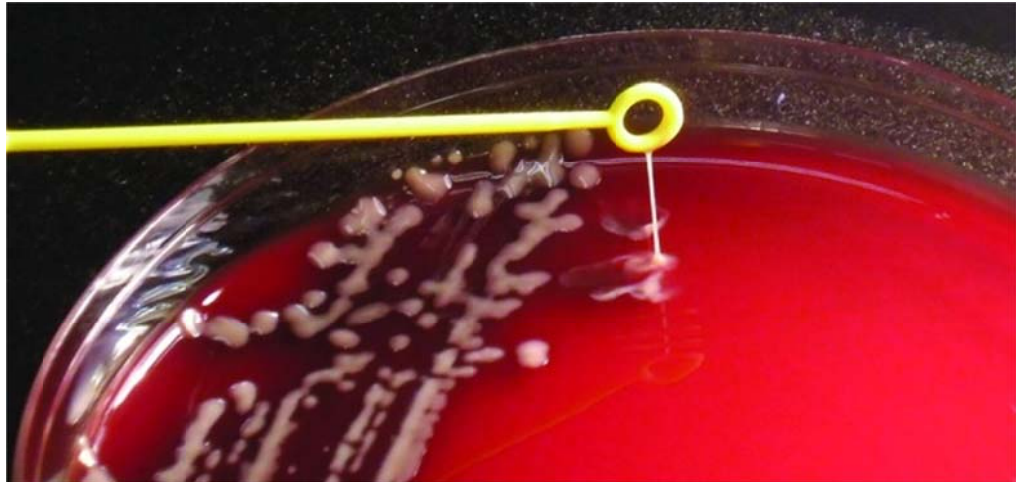


Рисунок 1.4 – Стринг-тест (Shon et al., 2013).

ГМ-фенотип формируется за счет увеличения количества капсульного полисахарида. Известно несколько механизмов, благодаря которым некоторые штаммы *K. pneumoniae* продуцируют капсульный материал выше базального уровня: экспрессия двух плазмидных транскрипционных регуляторов мукоидного фенотипа – *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A) и *rmpA2*; экспрессия хромосомной копии гена *rmpA*; экспрессия регуляторных генов *rcsA* и *rcsB* (продукты генов *rcsA* и *rcsB* осуществляют положительную регуляцию *cps*-кластера на уровне транскрипции, что приводит к гиперпродукции капсульного материала) [36, 137]. Следует отметить, что для проявления ГМ-фенотипа не обязательно наличие всех перечисленных генов [115, 137]. Фактически, от 55 до 100 % hvKp-штаммов экспрессируют, по меньшей мере, одну копию гена *rmpA* или *rmpA2*, в то время как, только 7-20 % сKp-штаммов содержат эти гены [115, 145]. Синтез капсулы также может быть усилен в ответ на внешние сигналы. Например, возрастание концентрации глюкозы приводит к повышению продукции капсульных полисахаридов независимо от наличия гена *rmpA*, в то время как относительно высокие концентрации внеклеточного железа приводят к снижению производства капсульного материала [179]. Следует отметить, что у некоторых штаммов механизмы, лежащие в основе формирования ГМ-фенотипа, все еще остаются неизвестными [185].

В некоторых исследованиях отмечается важная роль гена *magA* (mucoviscosity-associated gene A) в формировании ГМ-фенотипа. Этот ген первоначально был обнаружен Fang et al. в 2002 году. Посредством сайт-специфического мутагенеза его идентифицировали как ген, ответственный за образование гиперкапсулы [90]. Однако последующие исследования показали, что ген *magA* – это аллель гена *wzy*, кодирующего полисахарид-полимеразу, специфичную для *K. pneumoniae* капсульного типа K1. Ген *magA* был переименован в *wzy_K1*, а

затем данная номенклатура была принята по отношению ко всем остальным К-типам (*wzy_K2*, *wzy_K3* и т. д.).

Многочисленные исследования, проведенные в Китае (эндемичный район распространения *hνKp*-штаммов) указывают на тот факт, что чаще всего признак гипермукоидности встречается среди *hνKp*-штаммов капсульных типов К1 и К2 [132, 263]. Например, Guo с соавт. (2017) отмечают, что среди гипермукоидных клинических изолятов *K. pneumoniae*, связанных с различными типами инвазивных инфекций, 42,9 % относились к типу К2 и 23,8 % - к типу К1 [105]. Исследование Jung и соавт. (2013) также показало, что 78 % гипермукоидных изолятов *K. pneumoniae* у пациентов с бактериемией имели капсульный тип К1 или К2 [125].

Заслуживает внимание предположение, что сочетание гиперкапсулы и аэробактина повышает инвазивность *hνKp*-штаммов К1- и К2-типа. На модели абсцесса печени мыши показано, что штаммы К1- и К2-типа, у которых отсутствовала гиперкапсула и аэробактин, были авирулентными [259]. С другой стороны, в некоторых работах предполагается, что именно наличие капсульных типов К1 и К2, а не гиперкапсула, отвечает за повышенную вирулентность, поскольку типичные инкапсулированные К1- и К2-штаммы не были менее вирулентными, чем К1- и К2-штаммы с ГМ-фенотипом [149]. Гораздо реже *hνKp*-штаммы с гипермукоидным фенотипом обнаруживаются среди штаммов не-К1 и не-К2 капсульных типов: К5, К16, К57, К63 [140, 255], К20 [91], К54 [121].

Следует отметить, что некоторые данные свидетельствуют о существовании штаммов *K. pneumoniae*, являющихся гипервирулентными, но не гипермукоидными [151]. В связи с этим фактом некоторые исследователи указывают на то, что гипермукоидность и гипервирулентность представляют собой два разных фенотипа, которые нельзя использовать синонимично [57], однако консенсус по этому вопросу все еще не достигнут. Исследование Lin и соавт. (2011) показало, что негипермукоидные *hνKp*-штаммы были более вирулентными для мышей с искусственно смоделированным сахарным диабетом, по сравнению с гипермукоидными штаммами, что указывает на то, что ГМ-фенотип сам по себе не является единственно определяющим фактором для вирулентности *K. pneumoniae* у диабетического хозяина [151]. В то же время, отмеченные выше сообщения о гипермукоидных *hνKp*-штаммах, способных вызывать инфекцию у практически здоровых людей, могут указывать на то, что гиперкапсула является дополнительным свойством, позволяющим преодолевать защитные барьеры здорового организма.

Так или иначе, следует признать, что гипермукоидность является одним из самых важных факторов, способствующих вирулентности *K. pneumoniae in vivo* [115, 215]. Гиперкапсула усиливает резистентность к целому ряду механизмов гуморальной защиты,

включая действие системы комплемента, β -дефензина и антимикробных пептидов [90]. Несмотря на то, что капсула обычно не является основной защитой против системы комплемента у классических штаммов, hvKp-штаммы *K. pneumoniae* с ГМ-фенотипом менее чувствительны к действию системы комплемента [190]. Кроме того, наличие гиперкапсулы коррелирует с высокой степенью устойчивости к фагоцитозу нейтрофилами и макрофагами человека [90, 149, 190]. В исследовании Lin и соавт. (2010) было показано, что гипермукоидные hvKp-штаммы K1-типа, вызывающие абсцессы печени, противодействовали опосредованному нейтрофилами внутриклеточному киллингу, что способствовало распространению и формированию абсцессов в других органах и тканях [152]. В работе Wang с соавт. (2017) приводятся данные о способности *K. pneumoniae* индуцировать нетоз – программируемую гибель нейтрофилов, сопровождающуюся выбросом внеклеточной «ловушки». Индуцировать нетоз могут и гипермукоидные hvKp-, и cKp-штаммы, однако, как оказалось, нейтрофильные ловушки более эффективно захватывают cKp-штаммы, чем гипермукоидные hvKp [245]. Таким образом, представленные результаты показывают, что гипермукоидные hvKp-штаммы эффективно сопротивляются как внутриклеточному, так и внеклеточному уничтожению нейтрофилами.

1.2.5 Антимикробная устойчивость hvKp-штаммов

Большинство исследований, описывающих случаи инфицирования hvKp-штаммами, акцентируют внимание на высокой степени чувствительности данных патогенов к антибактериальным препаратам [215]. При изучении геномов гипервирулентных и множественноустойчивых клебсиелл было выдвинуто предположение о том, что потенциалы этих групп никогда не будут объединены [109]. Но еще в 2014 году Li с соавт. предположили, что увеличение частоты выделения hvKp-штаммов в госпитальной среде приведет к приобретению ими факторов антимикробной устойчивости [146]. Результаты исследований Bialek-Davenet и соавт. (2014) показали, что мрачная перспектива появления штаммов *K. pneumoniae*, сочетающих повышенную вирулентность и множественную резистентность, становится реальностью. В геномах двух hvKp-штаммов, выделенных на Мадагаскаре (2007 г.) и во Вьетнаме (2008 г.), были обнаружены гены, кодирующие устойчивость к нескольким классам антибактериальных веществ (β -лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам). Эти результаты показали, что горизонтальный перенос генов антибиотикорезистентности между «классическими» МЛУ *K. pneumoniae* и hvKp-штаммами вполне возможен [47]. Сообщалось также о появлении β -лактамаз расширенного спектра и β -лактамазы AmpC в арсенале

гипервирулентных *K. pneumoniae*, выделенных в Корее [63, 214], Франции [228] и Индонезии [62].

Определенную обеспокоенность вызывает появление в геномах hvKp-штаммов генов, кодирующих карбапенемазы. Фактически hvKp-штаммы с ГМ-фенотипом, продуцирующие БЛРС и карбапенемазы, уже были зарегистрированы в Китае, Индии, Бразилии и Аргентине [38, 146, 212, 262]. Gu с соавт. (2018) при описании госпитальной вспышки, вызванной устойчивым к карбапенемам hvKp-штаммом, показали, что изолят приобрел pLVPK-подобную плазмиду, содержащую несколько факторов вирулентности, включая гены *rtxA2*, *iucABCD* и *iutA* [104]. Необходимо отметить тот факт, что все описанные в литературе карбапенем-резистентные hvKp-штаммы были выделены от пациентов, длительно находящихся в госпитале и имеющих серьезные заболевания (например, миелоидная лейкемия). По-видимому, следует признать, что наряду с МЛУ-штаммами *K. pneumoniae* существует группа госпитальных hvKp-штаммов с множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Все это указывает на необходимость надзора за устойчивыми к карбапенемам hvKp-штаммами и осуществление более строгих мер контроля для предотвращения распространения этих штаммов в госпитальной и внебольничной среде.

1.3 Бактериофаги – общая характеристика

Бактериофаги (фаги) представляют собой вирусы, инфицирующие бактерии. Фаги являются не только самой многочисленной и разнообразной группой вирусов, но и одними из наиболее распространенных биологических частиц на Земле. Фаги убиквитарны в окружающей среде и в изобилии обнаруживаются там, где существуют развитые бактериальные сообщества. Примерами таких ниш могут служить океан, почва, очистные сооружения, горячие источники и живые организмы [193, 222]. В начале XX века бактериофаги были независимо открыты двумя исследователями – Фредериком Твортом [237] и Феликсом Д'Эреллем [80].

Таксономическая система классификации бактериофагов утверждена и регулярно обновляется Подкомитетом по вирусам бактерий и архей Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV). Основой для первой схемы классификации послужили два критерия – морфология фаговой частицы и тип нуклеиновой кислоты (рисунок 1.5) [54]. Однако, данные критерии позволяли классифицировать бактериофаг лишь до семейства; дальнейшая классификация до подсемейства и рода была весьма затруднительна.

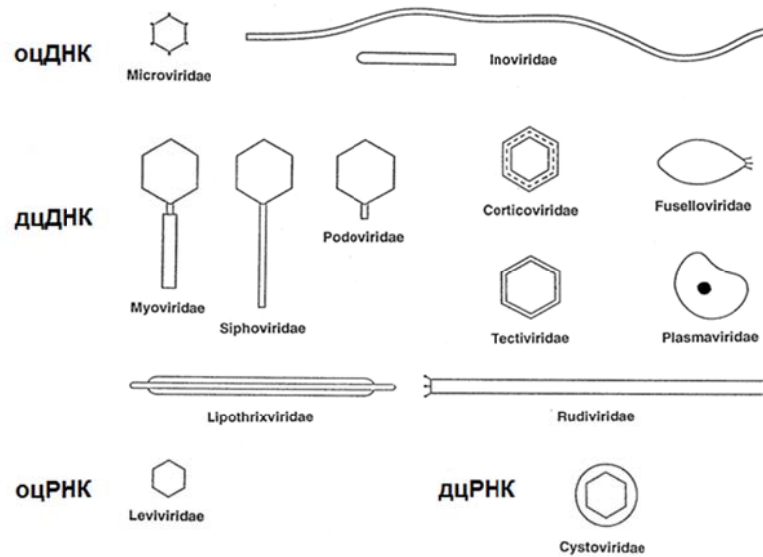


Рисунок 1.5 – Схематическое изображение основных семейств бактериофагов (Calendar, 2006, с модификацией).

С появлением технологий секвенирования ДНК нового поколения все более очевидным стал тот факт, что существующая система классификации фагов, не отражающая геномных и протеомных данных, нуждается в пересмотре. Увеличение количества данных о последовательностях фаговых геномов привело к появлению ряда потенциальных схем классификации, таких как Phage Proteomic Tree [201], кластеры фаговых сетей [148] и прочих систем, не всегда совместимых с правилами, изложенными в кодексе ICTV. Тем не менее, начиная с 8-го отчета ICTV (2005 год), геномные и протеомные методы используются для классификации фагов на виды, рода и подсемейства [30]. По данным на 2015 год бактериофаги разделены на 14 подсемейств, 204 рода и 873 вида [243].

Бактериофаги, как и прочие вирусы, являются самореплицирующимися облигатными паразитами. При нахождении во внеклеточной среде они обычно биохимически инертны. Эти вирусы представляют собой частицы, содержащие нуклеиновую кислоту (ДНК, либо РНК), которая кодирует информацию, необходимую для их репликации. Вирусные геномы являются либо кольцевыми, либо линейными, одно- или двухцепочечными. Размер генома фагов варьирует от ~3,3 тыс. нуклеотидов (оцРНК фагов *E. coli*) [97] до почти 500 тыс. п.н. (бактериофаг G, инфицирующий *Bacillus megaterium*) [107].

Одной из самых ярких особенностей генома бактериофагов является «мозаичная» структура, обусловленная горизонтальным переносом генов [184]. По сути, каждый фаговый геном можно рассматривать как уникальное сочетание модулей, которыми фаги могут обмениваться внутри популяции. Размер модулей и уровень их конверсии сильно отличается среди фагов с различной морфологией, размером и кругом хозяев [108]. Геномный мозаицизм

варьируется в зависимости от хозяина, образа жизни и генетического строения фагов. Число фаговых геномов, доступных для сравнительного анализа, постоянно растет, и степень их мозаичности становится все более очевидной и поразительной. Популяция фагов представляет собой обширный резервуар неисследованного генетического разнообразия, поскольку большинство генов (до 80 %), содержащихся в фаговых геномах, кодирует гипотетические протеины, функции которых не известны. Мозаичная структура генома фагов обеспечивает высокий уровень их адаптивности и, как следствие, эволюционный успех. В естественных местах обитания фаги и бактерии находятся в постоянной «гонке вооружений», выражающейся в непрерывных циклах коэволюции. Бактериальные клетки обладают множеством различных систем защиты от фаговой инфекции [83, 136]. В свою очередь, фаги способны противостоять данным механизмам устойчивости за счет пластичности генома и высокой скорости воспроизведения [170, 264].

Каждый фаг специфичен для конкретного бактериального хозяина и может иметь узкий или широкий диапазон хозяев в зависимости от его способности к инфицированию. Клетка-хозяин обеспечивает ферментативный аппарат для репликации фагов и их размножения путем заражения наиболее активных (экспоненциально растущих) бактерий [200]. Жизненный цикл фага может проходить по двум направлениям: литическому и лизогенному (рисунок 1.6).

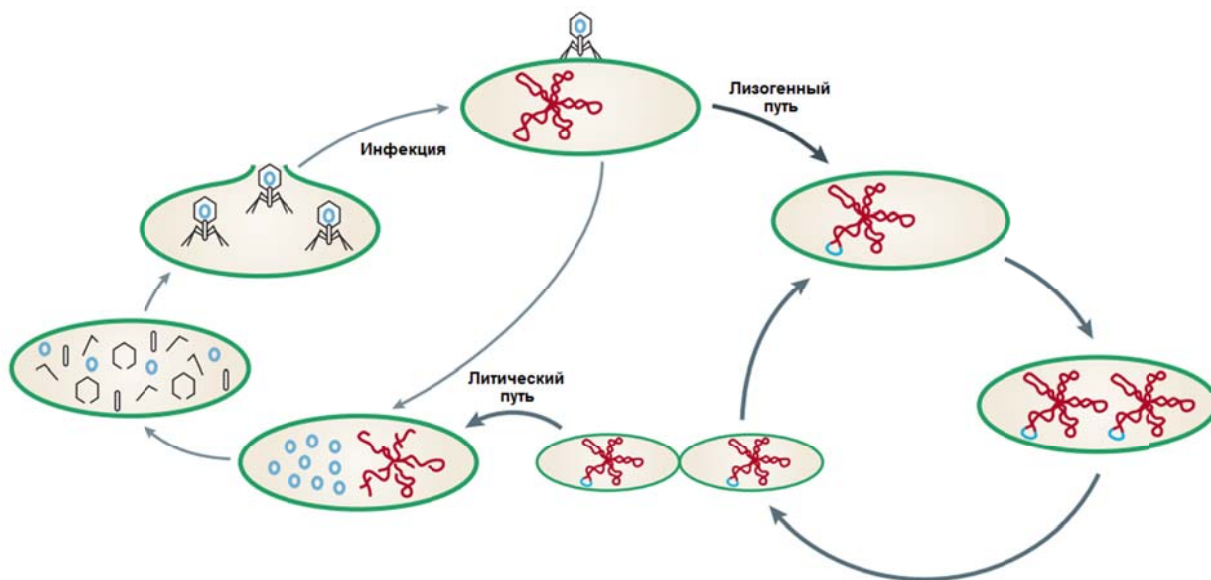


Рисунок 1.6 – Схематическое изображение жизненного цикла бактериофага (Reyes et al., 2012, с модификацией).

При реализации литического пути фаг вводит собственную нуклеиновую кислоту в клетку и размножается путем подчинения ее репликативного аппарата. После этапа сборки вирусных частиц фаговое потомство разрушает клетку, обеспечивая себе выход в окружающую

среду. Лизогенный путь подразумевает интеграцию и дальнейшую репликацию фагового генетического материала в составе бактериального генома. При таком варианте бактериофаг может либо неограниченное время находиться в геноме бактерии и передаваться при делении клетки следующему поколению, либо выщепляться из генома и размножаться по литическому пути [46].

Различные сценарии взаимодействия между фагом и бактериальной клеткой играют важную роль в биогеохимических циклах, регуляции структур микробных сообществ и управлении микробными популяциями. Например, заражение бактериальной клетки лизогенным фагом может способствовать увеличению микробного разнообразия в результате горизонтального переноса генов [247]. Литическая фаговая инфекция приводит к лизису клетки-хозяина и, как следствие, обеспечивает контроль популяции клеток [183]. Бактериальный дебрис, образующийся в результате лизиса, поступает в пищевую сеть и биогеохимические циклы, в результате чего происходит рециркуляция питательных веществ в экосистеме [247].

1.3.1 Бактериофаги порядка Caudovirales

Среди всех вирусов бактерий фаги порядка Caudovirales (от лат. cauda — хвост) являются самыми распространенными [247]. Считается, что хвостатые фаги возникли в раннюю докембрийскую эру и, скорее всего, эволюционировали от общего предка [27]. По различным оценкам, количество отдельных вирионов хвостатых фагов на Земле составляет более 10^{30} [253]. В водных экосистемах, где доминируют бактерии, подавляющее большинство наблюдаемых вирусоподобных частиц напоминает хвостатые фаги [253]. По данным Askermann и Prangishvili (2012), более 90 % из 6200 фагов, исследованных с помощью электронной микроскопии, представляют собой фаги порядка Caudovirales [26]. В настоящее время каудовирусы являются наиболее изученными вирусами бактерий – среди всех секвенированных фаговых геномов более 95 % представлено геномами хвостатых фагов. Эти фаги инфицируют бактерии более 130 родов, среди которых преобладают представители Actinobacteria, Bacteroidetes, Cyanobacteria, Firmicutes и Proteobacteria [168].

Хвостатые фаги чрезвычайно разнообразны, но, тем не менее, объединены двумя характерными чертами: все они имеют хвостовые отростки (за что и называются «хвостатыми») и используют общий механизм упаковки ДНК в капсид [58]. На основании морфологии хвостового отростка представители порядка Caudovirales подразделяются на три семейства – Myoviridae (длинный сокращающийся хвост), Siphoviridae (длинный несокращающийся хвост) и Podoviridae (короткий несокращающийся хвост) (рисунок 1.7). В 2017 году Подкомитет по вирусам бактерий и архей ICTV анонсировал появление нового семейства хвостатых

бактериофагов, сформированное на основании анализа данных полногеномного секвенирования бактериофагов и названное в честь Ханса-Вольфганга Аккерманна – *Ackermannviridae* [31].

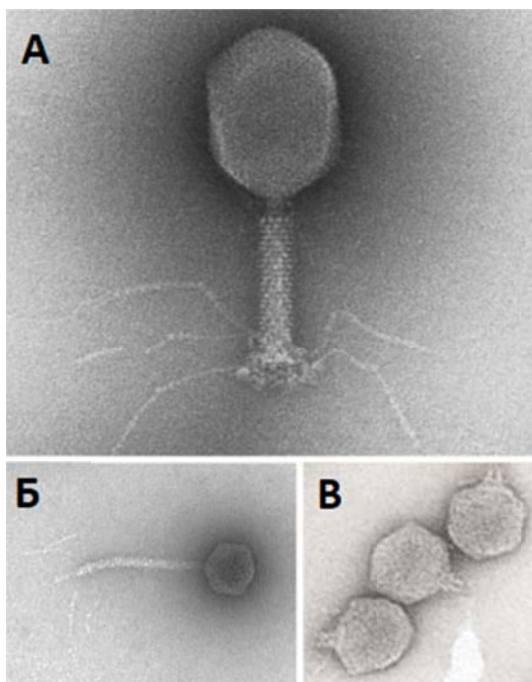


Рисунок 1.7 – Представители семейств порядка Caudovirales: А – бактериофаг T4, Myoviridae; Б – бактериофаг λ , Siphoviridae; В – бактериофаг T7, Podoviridae (R. Duda/ University of Pittsburgh; P. Serwer/ The University of Texas Health Science Center at San Antonio).

Геном бактериофагов порядка Caudovirales представлен одной несегментированной линейной молекулой дцДНК, которая иногда может приобретать кольцевую форму. Также в двухцепочечной структуре могут встречаться одноцепочечные промежутки. Геном может содержать от 12 до 500 тыс. п. н., кодирующих структурные, регуляторные и ферментативные белки (Brüssow, 2002). Геном упакован в изометрический икосаэдрический капсид, к одной из вершин которого прикреплен хвостовой отросток (рисунок 1.8) [94].

С резким увеличением числа охарактеризованных хвостатых фагов становится все более очевидным, что порядок Caudovirales больше не способен объединять огромное генетическое разнообразие данной вирусной группы [120] и должен быть надлежащим образом реорганизован. Проблемы таксономии порядка Caudovirales побудили ICTV изучить возможность введения дополнительных таксономических уровней. Первоначальные идеи и планы были представлены на конференции Европейской организации молекулярной биологии (European Molecular Biology Organization, EMBO) 2016 года «Вирусы микробов IV» (Ливерпуль, Великобритания).

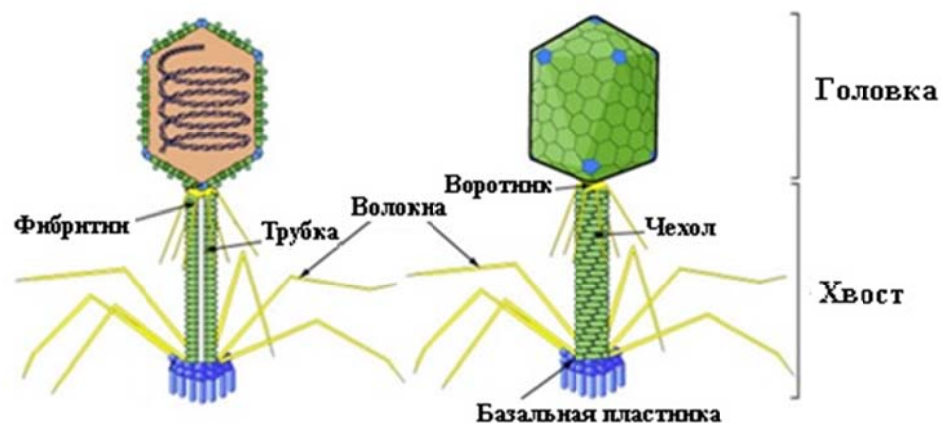


Рисунок 1.8 – Структура типичного представителя порядка Caudovirales, бактериофага T4 (Hulo et al., 2011, с модификацией).

В настоящее время Подкомитет по бактериальным и архейным вирусам изучает согласованность порядка Caudovirales на примере группы разнообразных фагов, которые в настоящее время классифицированы как представители подсемейства Spounavirinae [43].

1.3.2 Роль хвостового отростка в инициации адсорбции хвостатых бактериофагов

Взаимодействие литического бактериофага и бактериальной клетки является многостадийным процессом: сначала происходит адсорбция бактериофага на поверхности бактериальной клетки, затем введение нуклеиновой кислоты фага в клетку, внутриклеточный синтез компонентов фага и его сборка, и, наконец, лизис бактериальной клетки с высвобождением новых фаговых частиц.

Хвостовые отростки являются высокоспецифичными системами для распознавания клетки-хозяина и используются фагами для прикрепления к поверхности бактерии. Структурный состав хвостового отростка может варьировать от единичного хвостового шипа до более сложного комплекса, включающего базальную пластинку с дополнительными элементами в виде хвостовых волокон (tail-fiber) и хвостовых шипов (tail-spike) [94]. Гены, кодирующие структурные элементы хвостового отростка, являются наиболее вариабельной частью фагового генома [108]. Хвостовые белки фагов разнообразны и способны распознавать почти каждый компонент поверхности клетки хозяина, включая белки, полисахариды и липополисахариды (ЛПС) [153].

Процесс адсорбции бактериофага на поверхности бактериальной клетки включает два этапа: обратимое и необратимое связывание. Следует уточнить, что молекулярные механизмы обоих этапов могут существенно различаться для различных систем «фаг-бактериальная

клетка», а также варьировать среди представителей различных таксономических групп фагов и их бактериальных хозяев. Способность бактериофага инфицировать ограниченный круг хозяев продиктована спецификой адсорбционного процесса, зависящего от природы и структурных особенностей рецепторов на поверхности бактериальной клетки. Важную роль играет локализация, количество и плотность рецепторов на различных участках клеточной поверхности. Природа рецепторов различна для разных представителей таксономических групп бактерий и в основном определяется составом клеточной стенки и поверхностными структурами [18].

Как известно, структура внешней мембраны грамотрицательных бактерий значительно отличается от внешней мембраны грамположительных вариантов. Два основных отличия – высокая проницаемость за счет большого количества интегральных белков, формирующих каналы (более 20 тысяч на клетку) [177], и наличие внешнего липополисахаридного слоя. Белки, локализованные на мембране бактериальной клетки, а также различные участки ЛПС могут служить в качестве рецепторов для бактериофагов. В большинстве случаев фаги требуют наличия двух типов рецепторов [18]. Некоторые бактерии экранируют рецепторы за счет синтеза углеводных барьеров, прилегающих к клетке – капсульных полисахаридов (КПС) или слизистых экстраклеточных полисахаридов (ЭПС) [209]. КПС и ЭПС отличаются огромным разнообразием в своем составе не только среди бактерий одного рода, но и внутри вида. Кроме того, их состав может варьировать в зависимости от условий культивирования бактерий [143]. Капсула обычно играет роль в качестве первичного рецептора на начальном этапе присоединения бактериофага (стадия обратимой адсорбции), в то время как белки и ЛПС чаще всего обеспечивают необратимую адсорбцию бактериофага. Необратимое связывание с рецепторами в конечном итоге приводит к вводу фаговой ДНК в бактериальную клетку [143].

Для преодоления углеводного барьера бактерий фаги выделяют полисахарид-деградирующие ферменты, которые распознают, связывают и расщепляют полисахаридные соединения, обеспечивая доступ к первоначально недоступному рецептору клеточной поверхности бактерий [143]. Визуально это проявляется как особенность морфологии негативных колоний (НК) бактериофагов, лизирующих инкапсулированные штаммы бактерий – вокруг НК образуется ореол (halo), увеличивающийся в диаметре при инкубации, в то время как размер НК остается постоянным. Этот морфологический признак, формирующийся за счет действия фаговых ПС-деполимераз, впервые был описан V. Sertic в 1929 году [211]. S. Humphries (1948) первым выделил подобный фермент при работе с клебсиеллезным бактериофагом MA8 [117].

1.3.3 Фаговые полисахарид-деполимеразы

В результате тесной коэволюции системы «бактериофаг – бактериальная клетка» сформировалось большое разнообразие полисахаридных компонентов клеточных стенок бактерий. Это подразумевает наличие у фагов такого же разнообразия структурных элементов, обеспечивающих первичное взаимодействие с бактериальной клеткой. Именно в генах фагов, кодирующих рецептор-связывающие белки (в т.ч. ПС-деполимеразы) наблюдается наивысший уровень разнообразия и мозаичности, что отражает влияние интенсивного вертикального и горизонтального переноса генов на эволюцию этих структур [56].

Несмотря на большое разнообразие ферментативной специфичности, ПС-деполимеразы имеют общие структурные особенности. Они являются фибриллярными белками с параллельной β -складчатой топологией [246] и, как правило, образуют удлиненные гомотримеры, по форме напоминающие шип. Такая конфигурация позволяет расширить активный сайт для распознавания и связывания рецепторов, скрытых в поверхностных полисахаридах (рисунок 1.9). Однако существуют исключения - эндосиалидаза, кодируемая сифофагом *E. coli 63D*, охарактеризована как гомотетрамер [166].

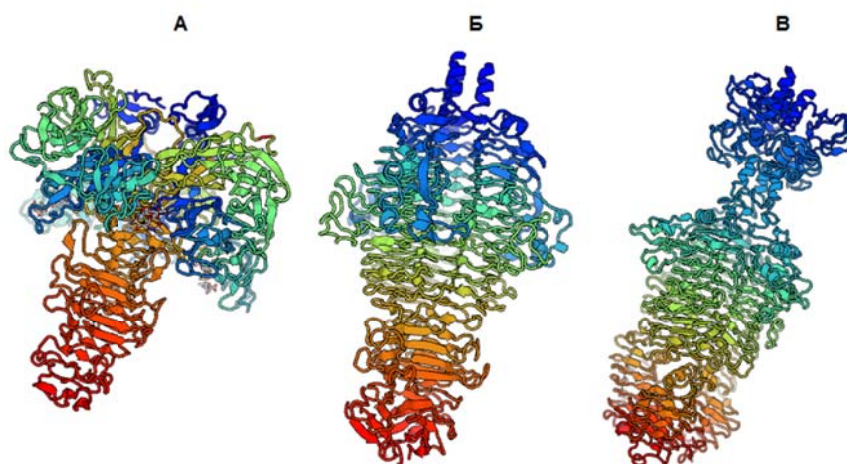


Рисунок 1.9 – Примеры структурной организации фаговых деполимераз: А – сиалидаза бактериофага *Escherichia K1-dep(4)* (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/D2XJ95>), Б – хвостовой шип бактериофага *Salmonella vB_SenM-2* (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/A0A1X9I991>), В – хвостовой шип бактериофага *Escherichia CBA120* (<https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/G3M189>).

Сложная β -складчатая структура определяет специфичность и стабильность ПС-деполимераз. Высокий уровень стабильности соответствует жестким внешним условиям,

которые эти белки должны выдерживать в различных средах, чтобы противостоять денатурирующим агентам [167, 256].

Общая архитектура ПС-деполимераз включает три домена: N-концевой, центральный и C-концевой. Небольшой N-концевой домен обеспечивает присоединение ПС-деполимеразы к хвостовым структурам бактериофага. Рядом исследований показано, что N-домен не требуется для правильной сборки и ферментативной активности ПС-деполимеразы [225]. Крупный центральный домен является ключевым для распознавания бактериальной клетки, а также обладает ферментативной активностью. C-концевой домен ответственен за тримеризацию белка и, в основном, работает как внутримолекулярный шаперон. Многие исследователи считают, что C-домен ответственен также за распознавание клеточного рецептора [246, 256]. N-концевой, а также C-концевой домены ПС-деполимераз консервативны среди фагов, принадлежащих к одной и той же группе, в то время как специфичный для клетки-хозяина центральный домен является переменным, обеспечивая тем самым изменение диапазона хозяев или адаптацию к новой среде [225].

подавляющее большинство фаговых ПС-деполимераз входит в состав структурных компонентов фаговой частицы - в основном это белки хвостового аппарата [188], реже – белки волокнистых структур коннектора, соединяющего хвостовой отросток и капсид [106]. Связанные с вирионами ПС-деполимеразы необходимы на этапе первичного взаимодействия фагов с бактериальными клетками, окруженными КПС и/или ЭПС. Некоторые ПС-деполимеразы являются растворимыми белками [188] и, по-видимому, проявляют активность только в непосредственной близости от бактерий, зараженных фагом (например, обеспечивая более глубокое проникновение фага в биопленки) [25].

Согласно механизму действия, фаговые ПС-деполимеразы разделены на два основных класса – гидролазы (КФ 3) и лиазы (КФ 4). Оба класса ферментов расщепляют полисахариды на растворимые олигосахариды, что приводит к разрушению углеводного барьера бактериальной клетки. Большинство гидролаз принадлежит к группе О-гликозил-гидролаз, которые используют молекулу воды для расщепления О-гликозидных связей в молекулах полисахаридов. Эта группа объединяет сиалидазы (нейраминидазы) [114], рамнозидазы [42], леваназы, ксиланазы и декстраназы [188]. ПС-деполимеразы, принадлежащие к классу лиаз, расщепляют гликозидную связь по механизму β -элиминации с сопутствующим образованием двойной связи без использования молекулы воды. Эта группа объединяет гиалуронидазы [154], пектат/пектин-лиазы [167], альгинат-лиазы [101] и специфическую К5-лиазу [229].

1.3.4 Практическое применение бактериофагов и фаговых ферментов для контроля бактериальных инфекций

Благодаря энтузиазму Феликса Д'Эрелля, бактериофаги практически сразу после обнаружения стали использоваться в терапевтических целях. Это представлялось логичным в контексте «пре-антибиотической эры». В первых опытах Д'Эрелля, проведенных на самом себе, бактериофаги показали себя как весьма перспективное средство для борьбы с инфекционными заболеваниями. Первая фаготерапия людей была предпринята Д'Эреллем в 1919 году [79], а первый отчет о клиническом применении бактериофагов был опубликован в 1921 году [52]. Но, несмотря на многообещающие успехи первых испытаний бактериофагов, плохой контроль исследований и противоречащие результаты породили в научном сообществе разногласия относительно эффективности фаготерапии в отношении бактериальных инфекций [226]. Исследования проводились по схемам, не соответствующим принятым на сегодня протоколам клинических испытаний, а также не были должным образом документированы и описаны в научной литературе. С появлением антибиотиков интерес к фагам на Западе был утрачен [251], исследования по фаготерапии, проводимые западными специалистами, были приостановлены. Тем не менее, в Советском союзе и некоторых странах Восточной Европы исследования по фаготерапии не прекращались [12, 15, 17, 126].

Антибиотики, безусловно, способствовали значительному успеху в лечении инфекционных заболеваний и улучшении здоровья человека, но к концу XX века «золотая эра» открытия новых антибактериальных веществ закончилась, и современные исследователи сосредоточились на модификации существующих препаратов [176]. Появление множественно устойчивых бактерий сделало большинство антимикробных препаратов малоэффективными. Возникшая ситуация усугубляется в связи с бесконтрольным потреблением антибиотиков, особенно в странах БРИКС (Бразилия, Россия, Индия, Китай, ЮАР) [238]. Эти проблемы способствовали возрождению интереса к изучению бактериофагов и возможности их использования в качестве антибактериальных препаратов [192]. В многочисленных исследованиях было подтверждено, что бактериофаги обладают противомикробным потенциалом в отношении МЛУ-бактерий как *in vitro* [98, 216], так и *in vivo* [99, 254].

В контексте оценки положительных и отрицательных сторон применения бактериофагов в терапии инфекционных заболеваний самым противоречивым свойством фагов является высокая степень специфичности к определенным видам или штаммам бактерий. С одной стороны, это свойство обеспечивает положительный эффект фаготерапии – бактериофаги, в отличие от антибиотиков, меньше воздействуют на нормофлору [161]. С другой стороны, оно же является лимитирующим фактором – один тип фага не может инфицировать все штаммы

бактерий в пределах вида. Поэтому для элиминации широкого спектра бактерий требуются “коктейли” из нескольких типов фагов. Одним из очевидных минусов фаготерапии является одновременный массивный лизис бактерий и высвобождение их компонентов, который может привести к нежелательным иммунным реакциям [103]. Не стоит также забывать о том, что бактерии постоянно вырабатывают механизмы резистентности к инфицированию фагами [83, 136] – преодоление этого ограничения возможно благодаря целенаправленной генетической модификации бактериофагов [163]. Постоянный рост баз данных нуклеотидных последовательностей фаговых геномов, исследования структурных особенностей фагов, а также исследования взаимодействия фагов и бактерий способствуют созданию модифицированных фагов и их компонентов [42, 107]. Следует упомянуть, что такие свойства бактериофагов, как самовоспроизводимость, относительная легкость и быстрота процесса их производства являются несомненными преимуществами по сравнению с антибактериальными препаратами [161]. Однако ввиду высокого разнообразия структуры, жизненного цикла и способа организации генома фагов, серьезной проблемой представляется получение одобрения регуляторных органов для применения препаратов бактериофагов в клинической практике [72, 161].

Тем не менее, медицинские продукты на основе фагов постепенно получают все большее признание. В рамках проекта «PhagoBurn» семь медицинских центров Франции, Бельгии и Швейцарии проводят клинические испытания, призванные оценить эффективность местного применения специализированного коктейля бактериофагов для профилактики и терапии инфекций, вызванных *E. coli* и *P. aeruginosa* у пациентов с ожогами. При применении данного коктейля не было выявлено никаких побочных эффектов или осложнений [202]. Также не было обнаружено побочных эффектов приема фага T4 в исследовании по оценке безопасности фаговой терапии, описанном Bruttin и Brüssow (2005), в котором 15 здоровых волонтеров принимали фаг перорально [51]. Об испытаниях собственных оригинальных коктейлей фагов для лечения широкого спектра заболеваний сообщает ряд американских фирм (Intralytix, Enbiotix, AmpliPhi), однако ни одно из исследований ещё не завершено [162, 252].

Самое масштабное на сегодня производство бактериофагов для применения в медицине располагается в Российской Федерации. Широкий спектр фаговых препаратов выпускает АО «НПО Микроген» (<http://www.bacteriofag.ru/>). Терапевтические бактериофаги производятся также в Международном центре фаготерапии имени Г. Элиавы (Тбилиси, Грузия), где расположено не только промышленное производство, но и клиника с обширной коллекцией бактериофагов (<http://www.eliava-institute.org/>). В рамках программы медицинского туризма с этим центром сотрудничают клиники стран Европы и США. В Центре фаготерапии при Институте иммунологии и экспериментальной терапии Польской академии наук препараты

бактериофагов разрабатываются для экспериментального клинического применения (<https://www.iitd.pan.wroc.pl/en/OTF/>).

Достижения в области молекулярной биологии, лучшее понимание биологии и генетики бактериофагов позволило раскрыть их потенциал не только при лечении инфекционных заболеваний человека, но и в других областях клинической и эпидемиологической деятельности. Бактериофаги используются для детекции и типирования бактерий [92], дезинфекции медицинских изделий, контроля инфекций животных и растений [29], обеззараживания пищевых продуктов [221]. Разработаны несколько препаратов на основе природных фагов, одобренных для обеззараживания пищевых продуктов — это такие препараты, как ListShield, EcoShield и SalmoFresh (компания Intralytix, США). Они созданы для контроля соответствующих патогенных бактерий — *Listeria monocytogenes*, *E. coli O157:H7* и *Salmonella enterica* в продуктах питания или на объектах пищевой промышленности (<http://www.intralytix.com/index.php?page=prod>). Препарат AgriPhage от компании OmniLytics (США) выявляет наличие *Xanthomonas campestris* и *Pseudomonas syringae* на овощах (<http://www.omnilytics.com/>). Препарат Listex P100 от компании Microeos (Нидерланды) снижает обсемененность пищевых продуктов листериями [172].

Относительно недавно в качестве самостоятельных антимикробных препаратов предложены различные фаговые ферменты [93, 181]. Например, фаговые эндолизины – ферменты, необходимые для расщепления клеточной стенки бактерий. Эндолизины успешно прошли испытания на различных моделях животных, показав ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками при лечении экспериментальных инфекций, вызываемых грамположительными бактериями, устойчивыми к антимикробным препаратам [93]. Другая перспективная группа фаговых ферментов – ПС-деполимеразы с их уникальной способностью специфически распознавать и расщеплять КПС и ЭПС бактерий. Большинство этих белков, в отличие от фаговых эндолизинов, не обладают бактерицидной активностью, но, тем не менее, рассматриваются как потенциальное средство для снижения вирулентных свойств бактерий [167]. Потеря или нарушение поверхностных структур, используемых многими патогенами для повышения степени вирулентности, колонизации и формирования биопленки, делает бактерии менее вирулентными и/или чувствительными к антимикробным препаратам и к факторам защиты организма-хозяина (фагоцитоз или действие системы комплемента) [174, 181]. Терапевтическая эффективность рекомбинантных ПС-деполимераз, которые только модифицируют фенотип бактериальных клеток, не влияя на их жизнеспособность и скорость роста, была подтверждена на лабораторных моделях *in vivo* [174, 167, 181].

Богатый опыт применения бактериофагов в клинической практике, накопленный за последние сто лет, свидетельствует о перспективности фаговых медицинских технологий.

Дальнейшая работа специалистов из множества компаний, работающих сегодня в этой области, и применение методов синтетической биологии обязательно приведут к созданию препаратов с несравненно большей эффективностью по сравнению с современными фаговыми коктейлями.

1.3.5 Перспективы практического использования бактериофагов и фаговых полисахарид-деполимераз для контроля инфекций, вызываемых бактериями вида *K. pneumoniae*

Одним из самых ранних примеров применения бактериофагов для лечения *K. pneumoniae*-инфекций являются исследования польских и российских ученых [3, 4, 7, 8, 69, 219]. Российские исследователи показали, что препараты бактериофагов эффективны при лечении экспериментальных клебсиеллезных инфекций мышей. Впоследствии они использовали результаты своих доклинических исследований для оценки безопасности и эффективности фагов при лечении пациентов с инфекциями, вызванными бактериями рода *Klebsiella*. Сообщалось о высокой эффективности препарата фага (отмечены клинические улучшения с соответствующим бактериологическим клиренсом) при лечении клебсиеллезных инфекций и об отсутствии токсичности для пациентов [3, 4, 7]. Исследования по использованию бактериофагов против бактерий рода *Klebsiella* в Польше показали, что фаготерапия может быть успешно применена при лечении септических [219] и кожных инфекций [69], а также цереброспинального менингита [223], этиологическим агентом которых являлась *K. pneumoniae*.

Тот факт, что бактерии вида *K. pneumoniae* входят в группу ESKAPE-патогенов [199], обуславливает необходимость исследования возможности применения бактериофагов для лечения инфекций, вызванных МЛУ-штаммами данного вида. Vinodkumar с соавт. (2005) сообщают о выделении бактериофага с литической активностью против широкого спектра клинических МЛУ-изолятов *K. pneumoniae*. На модели мышинной инфекции, индуцированной одним из МЛУ-штаммов *K. pneumoniae*, было показано, что однократная инъекция бактериофага через 45 минут после бактериального заражения оказалась достаточной для спасения 100 % животных [242]. Keşik-Szeloch и соавт. (2013) сформировали коллекцию из 32 фагов, диапазон чувствительных хозяев которых характеризовался 254 клиническими штаммами *K. pneumoniae*, включая мультирезистентные изоляты, продуцирующие БЛРС [130]. Исследование Jamal и соавт. (2015) показало, что бактериофаг Z ингибирует размножение резистентного к антибиотикам штамма *K. pneumoniae* в планктонной форме и приводит к снижению биомассы биопленки [122]. Сао и соавт. (2015) описывают бактериофаг 1513, выделенный с использованием резистентного клинического изолята *K. pneumoniae* в качестве хозяина. В модели сублетальной пневмонии у обработанных фагом мышей наблюдались более

низкие концентрации *K. pneumoniae* в легких по сравнению с необработанным контролем. Отмечается, что бактериофаг 1513 обладает высокой эффективностью как *in vitro*, так и *in vivo* и может быть использован в качестве альтернативы антибиотикотерапии пневмонии, вызванной устойчивыми *K. pneumoniae* [55]. D'Andrea и соавт. (2017) охарактеризовали литический фаг φBO1E, лизирующий карбапенем-устойчивые штаммы *K. pneumoniae*. На модели инфекции личинок *Galleria mellonella* было показано, что бактериофаг защищает личинки от гибели после инфицирования карбапенем-устойчивыми штаммами *K. pneumoniae*, включая резистентный к колистину штамм с гипермукоидным фенотипом [81]. Исследования индийских ученых показывают, что бактериофаги *K. pneumoniae* могут быть эффективно использованы для борьбы как с молодыми, так и зрелыми биопленками, образованными *K. pneumoniae*: например, применение фагов в сочетании с амоксициллином [44] или ципрофлоксацином [240, 241] приводит к успешному разрушению биопленки *K. pneumoniae* и снижению частоты образования устойчивых мутантов, которые легко развиваются при использовании фагов и антибиотиков по отдельности.

Чрезвычайно мало данных по исследованию бактериофагов, лизирующих гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*. Это можно объяснить с точки зрения целесообразности – гипермукоидные штаммы, выделенные в 80-90-х годах XX столетия отличались низким уровнем устойчивости к антибиотикам и достаточно эффективно устранялись правильно и своевременно подобранной антибиотикотерапией. Однако с появлением hvKp-штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам, исследования фагов, лизирующих такие штаммы, набирают обороты. Hung и соавт. (2011) первыми показали эффективность применения бактериофагов при лечении экспериментального абсцесса печени, вызванного ГМ-штаммом капсульного типа K2, у лабораторных мышей [118]. Далее, в 2014 году, Lin и соавт. описали бактериофаг NTUHK2044-K1-1, специфичный для штаммов K1-типа с гипермукоидным фенотипом, и показали его лечебно-профилактическую эффективность при лечении *K. pneumoniae*-инфекции у мышей [150]. Ещё один пример – бактериофаг KLPN1, лизирующий бактериальные штаммы K2-типа, содержащие ген *rmpA* [111].

В Российской Федерации в настоящее время существуют две компании, производящие препараты, в состав которых входят бактериофаги *K. pneumoniae*. АО «НПО «Микроген» производит три препарата, эффективность которых подтверждена лабораторными испытаниями [6, 9, 23, 24]. В НПЦ «МикроМир» разработаны препараты на основе гелей, содержащих бактериофаги, лизирующие различные виды бактерий. Шесть препаратов (из которых три предназначены для использования в ветеринарии) содержат бактериофаги, активные в отношении бактерий *K. pneumoniae* [14, 16]. Однако клебсиеллезные бактериофаги, входящие в состав этих препаратов, охарактеризованы на достаточно низком уровне – нет данных по

характеристике генома фагов и характеру взаимодействия фагов с бактериальной клеткой, что является крайне важным для применения таких препаратов в современной клинической практике.

Интенсивные исследования, проводимые в настоящее время различными группами, сосредоточены на перспективах применения ПС-деполимераз, выделяемых бактериофагами *Klebsiella* [127, 240, 241]. Hsu и соавт. (2013) сообщают об идентификации KN2-специфического фага и его ПС-деполимеразы, которая может быть использована для лечения инфекций *K. pneumoniae*, а также для капсульного типирования [114]. В исследовании Lin с соавт. (2014) был выделен и охарактеризован бактериофаг NTUH-K2044-K1-1, специфически лизирующий штаммы *K. pneumoniae* капсульного типа K1, а также клонирован ген, кодирующий ПС-деполимеразу. Авторы продемонстрировали возможность использования фага и рекомбинантной ПС-деполимеразы для диагностики и лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae* K1-типа [150]. Majkowska-Skrobek и соавт. (2016) идентифицировали и охарактеризовали ПС-деполимеразу бактериофага KP36. Они обнаружили, что ПС-деполимераза эффективна против нативной капсулы клинических штаммов *K. pneumoniae* K63-типа и снижает уровень смертности личинок *Galleria mellonella*, инфицированных *K. pneumoniae*. Исследователи идентифицируют данную ПС-деполимеразу как подходящее средство для разработки новых методов лечения инфекций, вызванных *K. pneumoniae* [167]. Hsieh и соавт. (2017) сообщают о выделении фаговых ПС-деполимераз, специфичных для капсульных типов K30/K69, K8 или K5 и о перспективе использования их для типирования и лечения инфекции *K. pneumoniae* [113]. Также сравнительно недавно Pan с соавт. (2017) описали бактериофаг ФК64–1, способный размножаться на широком спектре штаммов *Klebsiella* – представителях 10 капсульных типов и обладающим 11 типами ПС-деполимераз. Каждая из ПС-деполимераз имеет активность, специфичную для полисахаридов капсульных типов K1, K11, K21, K25, K30/K69, K35, K64, KN4 или KN5 [182].

Зарубежными исследователями показано, что применение сочетаний «бактериофаг, обладающий ПС-деполимеразной активностью/антибиотик» или «рекомбинантная фаговая ПС-деполимераза/антибиотик» эффективно подавляет клебсиеллезные инфекции [59, 240, 241]. Рекомбинантные ПС-деполимеразы также можно использовать в диагностических целях. Hsu и соавт. (2013) и Lin с соавт. (2014) высказывают предположение о том, что высокая специфичность ПС-деполимераз позволит сделать капсульное типирование штаммов *K. pneumoniae* более эффективным по сравнению с фаготипированием [114, 150].

1.4 Заключение по обзору литературы

K. pneumoniae – патоген с крайне интересной историей развития. Будучи достаточно тривиальным возбудителем оппортунистических инфекций у людей с иммуносупрессивными патологиями, данная бактерия демонстрирует, как нечто не столь значительное может приобретать серьезный масштаб. Первая проблема, приковавшая взгляд исследователей к *K. pneumoniae* – формирование множественноустойчивых штаммов под давлением среды, насыщенной антибактериальными препаратами. На данный момент проблема МЛУ-клебсиелл рассматривается на уровне ВОЗ, что придает ей особенно драматичный вид. Вторая проблема – формирование обособленного кластера гипервирулентных клебсиелл, способных вызывать серьезные инфекции у здоровых людей во внебольничной среде. Остается неясным, по каким причинам обычные условно-патогенные клебсиеллы с низким уровнем устойчивости к антибактериальным препаратам приобрели дополнительные факторы вирулентности (гиперкапсула, сидерофоры) и сформировали данный кластер. И если ранее подобные варианты обнаруживались преимущественно в странах Азиатско-Тихоокеанского региона, то на данный момент гипервирулентные штаммы обнаруживаются во всех частях мира. Одним из самых ярких отличий hvKp-штаммов является гиперкапсула, образующаяся в результате гиперпродукции капсульных полисахаридов – такие штаммы обычно называют «гипермукоидными». Более того, существует ещё один признак, связанный с капсульным материалом – чаще всего гипервирулентные штаммы принадлежат к капсульным типам K1/K2 (реже K5, K20, K54 и K57). Гиперкапсула играет весьма значительную роль в вирулентности hvKp-штаммов и может выступать в качестве мишени для разработки новых препаратов, обладающих бактерицидным или бактериостатическим потенциалом действия.

Публикации последних пяти лет указывают на возросшую частоту выделения множественноустойчивых гипервирулентных штаммов, имеющих ГМ-фенотип. Очевидно, что сформировался своеобразный суперпатоген, отличающийся экстремальной резистентностью и гипервирулентностью – инфекции, вызываемые подобного рода бактериями, являются потенциально опасными и трудно поддаются лечению.

В качестве альтернативы антибактериальным препаратам все чаще предлагаются бактериофаги – вирусы, инфицирующие бактерии. Бактериофаги имеют ряд преимуществ по сравнению с антибиотиками (например, узконаправленное действие), однако не лишены и недостатков. Несмотря на неоднозначный опыт прошлых лет, современные технологии позволяют эффективно реорганизовать классическую фаготерапию. Мы можем быстрее и эффективнее подбирать бактериофаги, можем характеризовать их с точки зрения генома – это

дает возможность избежать такие нежелательные компоненты фагового генома, как гены вирулентности или резистентности, а также гены, кодирующие образование токсинов.

Использование современных технологий позволяет более подробно исследовать возможности фаготерапии. Изучение тонкой структуры бактериофагов, механизмов их взаимодействия с бактериальной клеткой может открыть новые возможности в поиске альтернативных противомикробных агентов. Одно из наиболее актуальных направлений – изучение ферментов, используемых фагами в процессе адсорбции на поверхности бактериальной клетки. ПС-деполимеразы необходимы бактериофагу для того, чтобы разрушить полисахаридный слой, экранирующий рецепторы клеточной стенки бактерий, и инициировать адсорбцию. Бактериофаги, обладающие ПС-деполимеразами – идеальные кандидаты для борьбы с гипермукоидными гипервирулентными МЛУ-штаммами – эти ферменты эффективно расщепляют гиперкапсулу, снижая способность гипермукоидных штаммов к избеганию и укрыванию от действия защитных сил иммунной системы.

На данный момент исследований применения бактериофагов и фаговых ПС-деполимераз против ГМ-штаммов клебсиелл ещё очень мало. Мы надеемся, что наша работа внесет существенный вклад в понимание некоторых фактов взаимодействия бактериофагов с ГМ-штаммами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Методы исследования штаммов *K. pneumoniae*

2.1.1 Штаммы бактерий

В работе использовали 183 штамма *K. pneumoniae*, выделенные из клинического материала (раневого отделяемое, тканевые биоптаты, мокрота, плевральная жидкость, моча, кал, цереброспинальная жидкость, желчь, кровь, содержимое дренажей, внутривенных катетеров) 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) – ATCC13886 (K1-тип), ATCC43816 (K2-тип), ATCC12657 (K54-тип). Штаммы выделены в период с 2012 по 2016 гг. Предварительная видовая идентификация клинических штаммов была проведена в бактериологических лабораториях стационаров. Результаты предварительной идентификации подтверждали во ФБУН ГНЦ ПМБ с использованием бактериологического анализатора Vitek-2 (Biomireux, Франция) и масс-спектрометра Microflex MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия).

2.1.2 Среды для культивирования и хранения бактериальных штаммов

Для культивирования бактериальных штаммов использовали плотные и жидкие питательные среды: агар ГРМ-1 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и LB-бульон (Lugia-Bertani broth) (Amresco, США). Условия инкубации: температура 37 °С, 18-24 ч. Бактериальные культуры хранили в 40 %-м растворе глицерина при температуре минус 20 °С.

2.1.3 Стринг-тест

Гипермукоидные штаммы выявляли по методике, предложенной Fang с соавт. (2004) с использованием ночной культуры, выращенной на агаре ГРМ-1 с добавлением 5 % бараньих эритроцитов [90]. Тест считали положительным, если слизистый материал колонии тянулся за бактериологической петлей на расстояние более 5 мм от поверхности агара (рисунок 1.4).

2.1.4 Определение вирулентности *K. pneumoniae* для лабораторных животных

Для оценки вирулентности гипермукоидных штаммов использовали двухуровневую схему: 1) предварительный отбор вирулентных штаммов при внутрибрюшинном заражении мышей; 2) определение показателя полуметальной дозы (LD_{50}) вирулентных штаммов. Модельные животные - самки белых аутбредных мышей весом 18-22 г., полученные из питомника лабораторных животных «Столбовая» (ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА») и прошедшие карантинные мероприятия в виварии ФБУН ГНЦ ПМБ в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Содержание животных соответствовало международным нормам и требованиям.

Для инфицирования мышей использовали ночную культуру штаммов *K. pneumoniae*, выращенную на плотной питательной среде при температуре 37 °С. Доза бактериальной суспензии для заражения животных – 1×10^6 КОЕ/мышь. Объем вводимой бактериальной суспензии – 0,2 мл, внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными – 14 суток. Всех животных, павших до окончания срока наблюдения, исследовали на наличие бактерий *K. pneumoniae* методом отпечатков паренхиматозных органов (селезенка, печень) на плотной питательной среде ГРМ №1. Гибель животных после инфицирования (при наличии культуры *K. pneumoniae* в отпечатках с органов) свидетельствовала о вирулентности исследуемого штамма. Культуру считали авирулентной при условии отсутствия гибели животных после инфицирования.

Для штаммов, показавших себя вирулентными при предварительном отборе, определяли показатель LD_{50} . Для этого пять групп животных (по 6 мышей в каждой) инфицировали бактериальной суспензией в дозах 1×10^1 - 1×10^5 КОЕ/мышь. Объем вводимой суспензии – 0,5 мл, внутрибрюшинно. Период наблюдения за животными – 14 суток. Павшее животное, из селезенки и крови которого была выделена культура *K. pneumoniae*, считали погибшим от специфической клебсиеллезной инфекции. Показатель LD_{50} рассчитывали по методу Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева [2].

2.1.5 Определение капсульного типа штаммов *K. pneumoniae*

Капсульный тип *K. pneumoniae* определяли методом ПЦР с праймерами на гены *cps*-кластера (*wzx* и *wzy*). Для приготовления клеточных лизатов агаровую ночную культуру суспендировали в 100 мкл лизирующей смеси (0,25 % SDS; 0,05 М NaOH). Полученную суспензию прогревали при температуре 99 °С в твердотельном термостате, далее добавляли

900 мкл деионизованной воды и центрифугировали (19000×g, 2 мин, 4 °С). Супернатант отбирали в стерильную лабораторную посуду и использовали в качестве матрицы (1-2 мкл) для проведения полимеразной цепной реакции.

Так как по многочисленным данным литературы гипервирулентными (гипермукоидными) *K. pneumoniae* являются в основном штаммы капсульных типов K1 и K2, и, в меньшей степени, K5, K20, K54 и K57, для амплификации целевых генов использовали специфические праймеры, разработанные Fang с соавт. (2007) для обнаружения hvKp-штаммов именно этих K-типов (таблица 2.1) [91]. Праймеры синтезированы в НПК «Синтол». В качестве контрольных штаммов в исследовании использовали АТСС-штаммы.

Таблица 2.1 – Праймеры для определения капсульных типов hvKp-штаммов (Fang с соавт., 2007)

Ген	Праймеры	Олигонуклеотидная последовательность (5'→3')
wzx_K1	wzx_K1-F	gta-ggt-att-gca-agc-cat-gc
	wzx_K1-R	gcc-cag-gtt-aat-gaa-tcc-gt
wzy_K1	wzy_K1-F	ggt-gct-ctt-tac-ata-att-gc
	wzy_K1-R	gca-atg-gcc-att-tgc-gtt-ag
wzx_K2	wzx_K2-F	gga-gcc-att-tga-att-cgg-tg
	wzx_K2-R	tcc-cta-gca-ctg-gct-taa-gt
wzy_K2	wzy_K2-F	gga-tta-tga-cag-cct-ctc-ct
	wzy_K2-R	cga-ctt-ggt-ccc-aac-agt-tt
wzx_K5	wzx_K5-F	gcc-acc-tct-aag-cat-ata-gc
	wzx_K5-R	cgc-acc-agt-aat-tcc-aac-ag
wzy_K5	wzy_K5-F	cag-gga-act-cct-acg-cag-att-t
	wzy_K5-R	ggg-tga-taa-ggt-ata-gct-gac-ac
wzx_K20	wzx_K20-F	ccg-att-cgg-tca-act-agc-tt
	wzx_K20-R	gca-cct-cta-tga-act-ttc-ag
wzy_K20	wzy_K20-F	cgg-tgc-tac-agt-gca-tca-tt
	wzy_K20-R	gtt-ata-cga-tgc-tca-gtc-gc
wzx_K54	wzx_K54-F	cat-tag-ctc-agt-ggt-tgg-ct
	wzx_K54-R	gct-tga-caa-aca-cca-tag-cag
wzy_K54	wzy_K54-F	ggt-acc-tca-gag-cgt-tgc-at
	wzy_K54-R	cgg-act-taa-tag-cga-gca-aag
wzx_K57	wzx_K57-F	cga-caa-ata-tct-cct-gac-ga
	wzx_K57-R	cgc-gac-aaa-cat-aac-act-cg
wzy_K57	wzy_K57-F	ctc-agg-gct-aga-agt-gtc-at
	wzy_K57-R	cac-taa-ccc-aga-aag-tcg-ag

Условия амплификации ДНК: начальная денатурация (94 °С, 3 минуты), далее 30 циклов, состоящих из денатурации (температура 94 °С, 30 секунд), отжига праймеров (для праймеров на гены *wzx_K1*, *wzy_K1*, *wzx_K2*, *wzy_K2*, *wzx_K57*, *wzy_K57* отжиг при температуре

55 °С в течение 30 секунд, а для праймеров на гены *wzx_K5*, *wzy_K5*, *wzx_K20*, *wzy_K20*, *wzx_K54*, *wzy_K54* – 58 °С в течение 30 секунд) и элонгации (72 °С, 30 секунд), далее завершающая элонгация (72 °С, 3 минуты). Все полимеразные цепные реакции проводили в ДНК-амплификаторе GeneAmp® PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific, США).

ПЦР-продукты разделяли в 1,5 %-м агарозном геле при напряжении 80-90 V. Для приготовления геля и электрофоретического буфера использовали однократный трис-боратный буфер. Образцы ПЦР-продуктов смешивали с красителем «6×Orange LD DNA Loading Dye» (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. После завершения электрофореза гель окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 10 минут при активном покачивании и отмывали в дистиллированной воде. Визуализацию ПЦР-продуктов проводили с помощью гель-документирующей системы Molecular Imager Gel Doc XR System 170-8170 (Bio-Rad, США).

2.1.6 Выделение, очистка и изучение состава капсульных полисахаридов гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae*

Капсульные полисахариды *K. pneumoniae* выделяли по методике, описанной Bales с соавт. (2013) [41]. Бактериальную культуру выращивали на плотной питательной среде Brain Heart Infusion Agar (HiMedia, Индия) с добавлением глюкозы (0,5 мл/100 мл) при температуре 37 °С в течение 2-х суток. Выросшую биомассу собирали шпателем при добавлении 3-5 мл деионизованной воды, объем суспензии доводили до 10 мл стерильной водой. Затем для фиксации клеток и предотвращения лизиса суспензию смешивали с 60 мкл 36,5 %-го раствора формальдегида. Смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре на шейкере (100 об/мин), добавляли 1 мл 1 М NaOH, вновь инкубировали 3 часа на шейкере (100 об/мин) для экстракции капсульного полисахарида и центрифугировали при температуре 4 °С (16800×g, 1 час). Осадок фильтровали через мембраны с диаметром пор 0,22 мкм и диализовали против деионизованной воды. Белки и нуклеиновые кислоты преципитировали из смеси трихлоруксусной кислотой (20 % w/v) при инкубации в течение 30 минут на ледяной бане с последующим центрифугированием при температуре 4 °С (16800×g, 1 час). Для очистки полисахарида от липидных примесей к супернатанту добавляли 1,5 объема 95 %-го этанола, инкубировали сутки при температуре минус 20 °С и центрифугировали при температуре 4 °С (16800×g, 1 час) [41]. Осадок растворяли в деионизованной воде и хранили при температуре 4 °С.

Состав и структуру капсульных полисахаридов определяли в лаборатории химии углеводов ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН (под руководством проф. Ю.А. Книреля). Образец

капсульных полисахаридов (1 мг) гидролизовали 2 М трифторуксусной кислотой (120 °С, 2 часа). Полученные моносахариды анализировали с помощью газовой хроматографии на хроматографе Маэстро 7820 (Интерлаб, Россия), оснащенном колонкой НР-5 (0,32 мм × 30 м). Структуру полученных соединений определяли с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии ^1H и ^{13}C .

2.2 Методы исследования бактериофагов

2.2.1 Выделение, концентрирование и очистка бактериофагов

Для выделения бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*, исследовали различные образцы клинического материала (дренажные трубки, перевязочные материалы), смывы с госпитальных объектов, а также пробы из внебольничной среды (канализационные и сточные воды). Образцы выдерживали в SM-буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 5,8 г NaCl), пропускали через марлю для избавления от твердых частиц и центрифугировали в течение 30 минут при 7000×g. Супернатант фильтровали через мембраны с диаметром пор 1,20 и 0,45 мкм (Millipore, США) для удаления остаточного бактериального дебриса. Фильтраты концентрировали с помощью ультрацентрифугирования (4 °С, 85000×g, 2 часа). Полученный препарат тестировали на коллекции штаммов *K. pneumoniae*.

Чистую линию каждого бактериофага получали путем последовательного трехкратного пересева негативных колоний фага на газоне чувствительного штамма *K. pneumoniae*.

Для получения фаголизата ночную культуру штамма-хозяина *K. pneumoniae* засеивали в 200 мл LB-бульона, выращивали при температуре 37 °С на качалке (160 об/мин) до значения OD₆₀₀=0,3-0,4, затем добавляли бактериофаг (множественность инфицирования зависела от конкретного штамма бактериофага) и инкубировали до видимого лизиса жидкой культуры. Фаголизат стерилизовали добавлением хлороформа, центрифугировали, отбирали надосадочную фракцию и хранили при температуре 4 °С.

2.2.2 Определение титра бактериофагов методом агаровых слоев (метод Грациа)

В полужидкий агар (LB-бульон с добавлением 0,6 % агарозы) вносили 0,3 мл бульонной культуры *K. pneumoniae* (10⁸-10⁹ КОЕ/мл), добавляли необходимое разведение бактериофага, распределяли по поверхности основного слоя питательного агара и инкубировали в течение 18-24 часов при температуре 37 °С. Титр фага определяли по количеству негативных колоний на чашках, с пересчетом на конкретное разведение бактериофага.

2.2.3 Оценка литической активности бактериофагов

Спектр литической активности фагов определяли методом спот-тестирования, а также путем определения показателя эффективности бляшкообразования (ЭБ).

Спот-тест выполняли на основе метода агаровых слоев: 0,3 мл бульонной культуры *K. pneumoniae* (10^8 - 10^9 КОЕ/мл) смешивали с полужидким агаром (LB-бульон с добавлением 0,6 % агарозы) и распределяли по поверхности основного слоя питательного агара. После застывания слоя с полужидким агаром, на поверхность наносили по 10 мкл фаголизата с концентрацией не менее 10^8 БОЕ/мл и инкубировали при температуре 37 °С в течение 18-24 часов. При визуальном осмотре на чашках с чувствительными штаммами *K. pneumoniae* в местах нанесения капли фаголизата наблюдали образование прозрачного пятна лизиса (отсутствие роста бактериальной культуры).

Показатель эффективности бляшкообразования оценивали по отношению титра бактериофага на культуре гетерологичного штамма к титру фага на культуре штамма-хозяина. Титр фага определяли микрометодом: по 10 мкл 10-кратных серийных разведений фаголизата наносили на поверхность полужидкого агара, содержащего культуру тестируемого штамма. После инкубации при температуре 37 °С в течение 18-24 часов определяли титр фага на тестируемых штаммах и рассчитывали показатель ЭБ. Показатель в интервале от 0,1 до 1 отражал высокую, от 0,001 до 0,01 – среднюю, 0,0001 и менее – низкую эффективность бляшкообразования.

2.2.4 Определение параметров адсорбции бактериофагов на бактериальных клетках

Для определения времени адсорбции аликвоту ночной культуры тестируемого штамма *K. pneumoniae* разводили в свежем LB-бульоне и подращивали на термостатируемом орбитальном шейкере (37 °С, 160 об/мин) до экспоненциальной фазы роста. Далее добавляли бактериофаг (MOI=0,001) и инкубировали при температуре 37 °С на водяной бане. Отбор первой пробы (нулевая точка) производили сразу после добавления бактериофага к бактериальной культуре, остальные пробы отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 и 20 минут. Пробы немедленно вносили в смесь из SM-буфера и хлороформа, центрифугировали для осаждения хлороформа и бактериального дебриса, супернатант титровали для определения неадсорбированных или обратимо адсорбированных фагов. Количество фаговых частиц в каждой точке отбора определяли методом агаровых слоев.

2.2.5 Выделение и рестрикционный анализ фаговой ДНК

Фаголизаты объемом 3 мл (концентрация не менее 10^{10} - 10^{11} БОЕ/мл), обрабатывали ДНКазой и РНКазой (по 2 мкл каждого фермента) при комнатной температуре в течение 30 минут, далее добавляли 0,21 г NaCl, инкубировали 1 час на ледяной бане и центрифугировали ($11000 \times g$, 10 минут). Супернатант концентрировали путем добавления ПЭГ 8000 (до 10 % от объема смеси) и инкубировали 1 час на ледяной бане. Затем смесь центрифугировали ($11000 \times g$, 10 минут), осадок обрабатывали лизирующей смесью, содержащей 0,5 % SDS, 20 мМ ЭДТА и 50 мкг/мл протеиназы К (1,5 часа при температуре 37 °С, затем – 15 минут при 56 °С). ДНК последовательно очищали смесями фенол/хлороформ (1:1) и хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), центрифугировали и отбирали верхнюю фазу в чистый эппендорф. Полученный образец переосаждали этиловым спиртом.

Для рестрикционного анализа использовали эндонуклеазы рестрикции EcoRV и HindIII (Thermo Fisher Scientific, США). Указанные рестриктазы были выбраны опытным путем. Обработку проводили согласно протоколу, указанному в инструкции производителя. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили в 0,8 и 1,5 %-х агарозных гелях в трис-боратном буфере, в качестве маркера молекулярных масс использовали «GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США). Визуализацию полученных результатов проводили с использованием программы Quantity One (Bio-Rad, США).

2.2.6 Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов

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). Амплификацию фрагментов ДНК-библиотек проводили в эмульсионной ПЦР Ion One Touch (набор реагентов «Ion OneTouch 400 Template Kit», Life Technologies, США) с последующим обогащением сфер с помощью системы очистки «Ion OneTouch ES» и магнитных частиц «Dynabeads MyOne Streptavidin C1» (Life Technologies, США). Для сборки полученных при секвенировании фрагментов (ридов) в единые контиги использовали программу Newbler 2.9.

2.2.7 Биоинформационный анализ фаговых геномов

Редактирование нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов проводили с помощью пакета программ DNASTAR™ (Madison, США) и Vector NTI™ (Carlsbad, США).

Для анализа и аннотации геномов использовали программные ресурсы серверов BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [33], GeneMark™ [164], RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) [39] и Prodigal (Prokaryotic Dynamic Programming Genefinding Algorithm) [119].

Таксономическое положение бактериофагов определяли, используя алгоритм попарного выравнивания BLAST, а также алгоритм megablast. Филогенетическое дерево, основанное на аминокислотных последовательностях ДНК- и РНК-полимеразы бактериофагов, конструировали с помощью программы MEGA, версия 7.0 [135], алгоритм Neighbor-Joining [208]. Сравнение геномов исследуемых вирусов проводили с помощью программы Easyfig [227].

Для поиска генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы, использовали интерактивный биоинформатический сервер Института Макса Планка HHpred (Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison) [220] и ресурс Европейского института биоинформатики (The European Bioinformatics Institute, Великобритания) InterProScan [124].

2.2.8 Оценка эффективности антибактериального действия фагового коктейля на гипермукоидные штаммы разных капсульных типов *in vitro*

Ночную бульонную культуру смешивали со свежим LB-бульоном (1:10), подращивали при температуре 37 °С с аэрацией до логарифмической фазы роста, добавляли фаговый коктейль (титр каждого бактериофага – не менее 10⁸ БОЕ/мл) и инкубировали при температуре 37 °С с аэрацией. Через 30, 60 минут и далее каждый час отбирали пробы и регистрировали оптическую плотность на спектрофотометре. Для контроля измеряли оптическую плотность бульонной культуры без добавления коктейля фагов. Исходный титр бактериальной культуры определяли высевом последовательных разведений на чашки с питательной средой. Титр бактериофагов в смеси определяли высевом последовательных десятикратных разведений на газон чувствительной культуры в полужидком агаре.

2.2.9 Оценка эффективности фагов на модели клебсиеллезной инфекции мышей

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) [5]. Десять белых аутбредных мышей инфицировали внутримышечно (в левое бедро) культурой штамма *K. pneumoniae* KPi1627 в дозе 100 LD₅₀. Бактериофаг в дозе 100 млн. БОЕ/мышь вводили внутривентриально по трем схемам: (1) однократно за 1 час до инфицирования (т. н. «профилактика»); (2) через 3 часа после инфицирования, 1 раз в день в

течение 5 суток (раннее лечение); (3) то же через 24 часа после инфицирования (позднее лечение). Все павшие до окончания эксперимента животные были вскрыты и исследованы, выжившие мыши – эвтаназированы с последующим исследованием крови и паренхиматозных органов на наличие культуры *K. pneumoniae*.

2.3 Методы изучения фаговых полисахарид-деполимераз

2.3.1 Клонирование генов, кодирующих фаговые полисахарид-деполимеразы

Для клонирования генов фаговых ПС-деполимераз использовали систему «вектор-хозяин» рЕТ22b/*E. coli* BL21 (DE3). Плазмидный вектор рЕТ22b(+) (рисунок 2.1) рекомендован для экспрессии генов токсичных белков; особенностью данного вектора является обеспечение секреции рекомбинантного белка в периплазматическое пространство клеток-продуцентов.

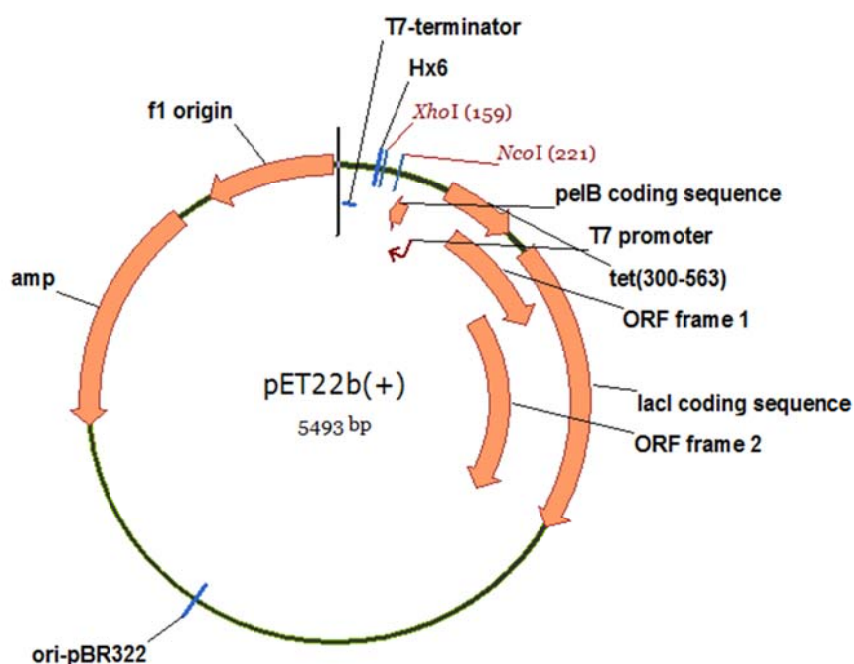


Рисунок 2.1 – Карта плазмиды рЕТ22b(+). Условные обозначения: *amp* – ген β-лактамазы, определяющий устойчивость трансформированных плазмидой клеток к ампициллину; Hx6 – гексагистициновая последовательность; *pelB* coding sequence – последовательность, кодирующая сигнальный пептид, ответственный за выход продукта в периплазматическое пространство; T7-promoter и T7-terminator – промотор и терминатор бактериофага T7; *lacI* coding sequence – кодирующая последовательность репрессора лактозного оперона; XhoI и NcoI – сайты рестрикции.

Локализация целевого белка в периплазматическом пространстве обеспечивается за счет присоединения сигнального пептида *pelB* (при нахождении в периплазматическом пространстве отщепляется пептидазой). Экспрессия белка находится под контролем T7-промотора, что позволяет получить большой выход целевого продукта. Для возможности селекции клеток-продуцентов целевого белка в плазмиде предусмотрен ген β -лактамазы, кодирующий устойчивость клеток к ампициллину. Также в плазмиду включена последовательность, кодирующая образование гексагистидинового участка, необходимого для афинной очистки целевого продукта.

С помощью программы Vector NTI™ (Carlsbad, США) были разработаны олигонуклеотидные праймеры, в состав которых были включены нуклеотидные последовательности сайтов эндонуклеаз рестрикции XhoI и NcoI (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Праймеры для клонирования

Фар	Ген	Праймеры, 5' → 3'	Ta, °C	Размер ампликона, п.н.
KpV71	Orf52	71_XhoI-F: cata ctcgag atacacctcccaggctacctg	62	1967
		71_NcoI-R: agt gccatgg cattaattagattagtagctc		
KpV52	Orf42	52_XhoI-F: gctg ctcgag attgatgatgaaattatcga	63	2040
		52_NcoI-R: tac accatgg atgataacttccggcaagt		
KpV74	Orf56	74_XhoI-F: att actcgag cacattgcacagcaagtacg	57	1734
		74_NcoI-R: gaat ccatgg cactagtagatttagtgagg		
KpV79	Orf42	79_XhoI-F: ct tactcgag gttaccataatactgcagagaa	63	2176
		79_NcoI(1)-R: tata ccatgg acattatcaaacgcgcagac		
KpV763	Orf43	763_XhoI-F: ttatgg ctcgag tttcgccctgaagc	63	2360
		763_NcoI(1)-R: ggaggtc ccatgg accaagacatta		
	Orf43_del	763_XhoI-F: ttatgg ctcgag tttcgccctgaagc	63	1475
		763_NcoI(2)-R: aatgt ccatgg cgttgataatctc		
KpV767	Orf46	767_XhoI-F: ttatgc ctcgag atacgtgatgcgagcctc	63	2542
		767_NcoI(1)-R: ggtc ccatgg accaagacattaaaacagtc		
	Orf46_del	767_XhoI-F: ttatgc ctcgag atacgtgatgcgagcctc	63	1786
		767_NcoI(2)-R: ct tccatgg caatgaccacagagtctag		

Примечание: жирным шрифтом выделены нуклеотиды сайтов рестрикции, введенные в олигонуклеотидный праймер для клонирования по соответствующим сайтам плазмидного вектора.

Праймеры конструировали таким образом, чтобы при амплификации целевого гена на N-конце рекомбинантного белка находилась сигнальная последовательность *pelB* (для обеспечения секреции белка в периплазму), а на C-конце – гексагистидиновая последовательность для аффинной очистки рекомбинантного белка. Праймеры были синтезированы в НПК «Синтол» (Россия). Амплификацию целевого гена проводили в ДНК-амплификаторе GeneAmp® PCR System 2700 (Thermo Fisher Scientific, США). Параметры амплификации: предварительная денатурация 94 °С – 5 минут, далее 30 циклов (денатурация 94 °С – 30 секунд, отжиг (см. «Та» для каждой пары праймеров в таблице 2.2) – 60 секунд, элонгация 72 °С – 30 секунд), заключительная элонгация 72 °С – 3 минуты.

Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли с помощью набора «Silica Bead DNA Gel Extraction Kit» (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР-продукты и ДНК плазмидного вектора обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XhoI* (Thermo Fisher Scientific, США) по протоколу, указанному в инструкции изготовителя, и лигировали ДНК-лигазой бактериофага T4 (Thermo Fisher Scientific, США). Результаты рестрикции и лигирования контролировали с помощью горизонтального электрофореза в 1 %-м агарозном геле. Полученными лигатами трансформировали компетентные клетки *E. coli DH5α* (штамм, используемый для отбора и накопления рекомбинантных плазмид). Селекцию колоний проводили по признаку устойчивости к ампициллину. Колонии, в которых с помощью ПЦР было выявлено наличие вставки целевого гена, культивировали в LB-бульоне с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при температуре 37 °С и постоянной аэрации в течении 18-24 часов. Из полученной бульонной культуры с помощью набора «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» (Thermo Fisher Scientific, США) выделяли рекомбинантную плазмиду. Правильность полученных конструкций подтверждали секвенированием по Сэнгеру на капиллярном секвенаторе ABI PRISM 3500 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для обеспечения экспрессии целевого гена с T7-промотора рекомбинантной ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli BL21 (DE3)*. Селекцию колоний и детекцию вставки целевого гена проводили аналогично описанию, представленному выше. Изолированные колонии продуцентов с рекомбинантными плазмидами засеивали в 5 мл LB-бульона с ампициллином (100 мкг/мл), инкубировали при температуре 37 °С в термостате в течение 16 часов. Бульонную культуру смешивали с глицерином (1:1), разливали в пробирки типа эппендорф и хранили при температуре минус 70 °С. Аликвоты замороженной культуры впоследствии использовали для наработки культуры штамма-продуцента и экспрессии рекомбинантных генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы.

2.3.2 Выделение рекомбинантных белков

Культуру штамма-продуцента вносили в LB-бульон с ампициллином (100 мкг/мл) в соотношении 1:20, инкубировали в термостатируемом орбитальном шейкере (160 об/мин) при температуре 37 °С до оптической плотности $OD_{600}=0,5$, после чего вносили 100 мМ-й водный раствор изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,5 мМ. Далее бульонную культуру продолжали инкубировать при температуре 22 °С на термостатируемом орбитальном шейкере (160 об/мин) в течение 20 часов. Синтез целевого белка 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). Для этого 1 литр культуральной жидкости после ИПТГ-индукции центрифугировали при температуре 4 °С (7000×g, 10 минут). Осадок ресуспендировали в охлажденном до 4 °С ТЕ-буфере и вновь центрифугировали. Клеточный осадок растворяли в связывающем буфере (20 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl, 5 мМ имидазола, pH 7,9) и подвергали ультразвуковой дезинтеграции (Virsonic 100, Virtis, США) в мягких условиях (озвучивание – 4 цикла по 10 секунд, 30 секунд – пауза) на ледяной бане. Бактериальный дебрис осаждали центрифугированием (17000×g, 15 минут), супернатант наносили на колонку с сорбентом, предварительно уравновешенным связывающим буфером. Колонку промывали связывающим буфером (8-10 объёмов колонки), затем буфером, содержащим 60 мМ имидазола, pH 7,9 (8-10 объёмов колонки), и элюировали буфером, содержащим 500 мМ имидазола, pH 7,9.

Выход целевого продукта контролировали спектрофотометрически. Далее продукт диализовали против 2-3 смен фосфатно-солевого буфера, pH 7,2 и анализировали с помощью SDS-электрофореза в 12 % ПААГ в трис-глициновом буфере. Гель окрашивали красителем «Coomassie Brilliant Blue R-250 Dye» (Thermo Fisher Scientific, США). Для сравнения использовали маркеры молекулярной массы белков «PageRuler™ Prestained Protein Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США).

Очищенный белок с ПС-деполимеразной активностью использовали для анализа и лиофильно высушивали для длительного хранения. Выход целевого белка с 1 литра культуральной жидкости штамма-продуцента составлял около 2 мг.

2.3.3 Изучение активности и специфичности рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз

Для оценки полисахарид-деградирующей активности рекомбинантных фаговых деполимераз использовали следующие методы:

1) Спот-тест – нанесение нескольких разведений полученного препарата на газон чувствительных к фагу бактерий, инактивированных в парах хлороформа. Образование мутного пятна в месте нанесения ПС-деполимеразы свидетельствовало об активности рекомбинантного фермента.

2) Расщепление капсульных полисахаридов *K. pneumoniae* при добавлении к раствору специфической рекомбинантной ПС-деполимеразы. Снижение вязкости раствора капсульных полисахаридов свидетельствовало об активности фермента.

3) Окраска капсулы клеток *K. pneumoniae* по Бурри-Гинсу. Для окрашивания готовили мазок клеток, взятых из предварительно обработанного специфичной ПС-деполимеразой бактериального газона (инкубация при комнатной температуре в течение 15-20 минут, до появления мутного пятна). Для сравнения также окрашивали культуру из зоны, не обработанной ПС-деполимеразой. Протокол окрашивания: каплю туши смешивали с каплей клеточной суспензии, растирали тонким слоем, высушивали и фиксировали в пламени горелки, далее окрашивали фуксином Циля в течение 1 минуты, высушивали и микроскопировали. Снижение количества капсульного материала вокруг бактериальных клеток, обработанных ПС-деполимеразой, свидетельствовало об активности рекомбинантного фермента.

Для оценки специфичности действия рекомбинантных ПС-деполимераз исследования проводили с использованием штаммов *K. pneumoniae* разных капсульных типов.

2.3.4 Изучение механизма действия рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз

Для выяснения механизма действия рекомбинантных фаговых ферментов определяли структуру олигосахаридов, образующихся при расщеплении капсульных полисахаридов рекомбинантными ПС-деполимеразами. Экстракты капсульных полисахаридов растворяли в деионизованной воде (10 мг/мл) и выдерживали сутки при комнатной температуре для набухания. Далее добавляли 0,5 мг/мл очищенной ПС-деполимеразы и инкубировали сутки при комнатной температуре. Очистку и изучение продуктов расщепления полисахаридов проводили в лаборатории химии углеводов ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН. Олигосахаридные фрагменты фракционировали с помощью гель-фильтрационной хроматографии на колонке с гелем Fractogel TSK-HW 40 (S) (Merck, Германия) (элюент – 1 % уксусная кислота), контролировали

дифференциальным рефрактометром (Кнауер, Германия). Структуру полученных соединений определяли с помощью двумерной ЯМР-спектроскопии ^1H и ^{13}C на спектрометре Bruker Avance II 600 MHz NMR (Bruker, Германия).

2.3.5 Оценка эффективности рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимераз на модели клебсиеллезной инфекции мышей

Изучение лечебно-профилактической эффективности рекомбинантной ПС-деполимеразы Dep_kpv74 проводили на двух моделях – инфекции мягких тканей бедра и острого сепсиса. Инфекцию мягких тканей бедра моделировали как указано в пункте 2.2.9. Острую септическую инфекцию у белых аутбредных мышей воспроизводили путем внутрибрюшинной инъекции культуры вирулентного ГМ-штамма *K. pneumoniae* KPi1627. В каждой модели использовали две группы мышей (контрольная и экспериментальная). Все павшие до окончания эксперимента животные были вскрыты и исследованы, выжившие мыши – эвтаназированы с последующим исследованием крови и паренхиматозных органов на наличие культуры *K. pneumoniae* (метод отпечатков). Схема эксперимента представлена в таблице 2.3.

Таблица 2.3 – Схема экспериментального лечения *K. pneumoniae*-инфекций мышей рекомбинантной полисахарид-деполимеразой Dep_kpv74

№ группы	Кол-во мышей в группе	Штамм	Заражающая доза, КОЕ	Препарат	Начало терапии	Доза, частота и способ ведения препаратов
1	15	KPi1627	2×10^3 в/бр. - 0,5 мл	Dep_kpv74	Через 30 минут	40 мкг/0,2 мл, однократно, в/бр.
2	15			Контроль без лечения		
3	6		3×10^4 в/м. - 0,05 мл	Dep_kpv74	Через 30 минут	40 мкг/0,2 мл, однократно, в/бр.
4	6			Контроль без лечения		

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 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 (в том числе высоковирулентный для мышей штамм КРМ9, выделенный из пробы сточных вод Краснодарского края).

Одним из основных фенотипических признаков hvKp-штаммов *K. pneumoniae* является гипермукоидность. Штаммы, обладающие гипертрофированной капсулой, в некоторых случаях можно детектировать визуально, особенно на средах, содержащих сахара (рисунок 3.1).



Рисунок 3.1 – Сравнение штаммов *K. pneumoniae*: слева – негипермукоидный штамм, справа – штамм, обладающий ГМ-фенотипом (среда Эндо, HiMedia, Индия).

Использование стринг-теста позволяет более точно определить наличие/отсутствие признака гипермукоидности. По итогам теста выявили 27 штаммов (12,6 % исследуемой коллекции), обладающих гипермукоидным фенотипом. Так как один из основных механизмов формирования ГМ-фенотипа связан с наличием гена *rmpA* (регулятор мукоидного фенотипа), все ГМ-штаммы проанализировали на наличие этого гена с помощью полимеразной цепной

реакции [144]. В итоге, ген *rtxA* выявили в геноме 24 ГМ-штаммов. В геноме трех гипермукоидных штаммов ген *rtxA* не выявлен. Однако при анализе генома (черновой вариант) одного из *rtxA*-негативных штаммов обнаружили ген *rtxA2* – аллельный вариант гена *rtxA*. Механизм формирования ГМ-фенотипа оставшихся *rtxA*-негативных штаммов остается неясным.

Как было упомянуто ранее (п.п. 1.2.3), среди гипервирулентных (гипермукоидных) штаммов *K. pneumoniae* преобладают штаммы капсульных типов K1 и K2, а также встречаются штаммы капсульных типов K5, K20, K54 и K57 [91]. 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 представлено на рисунке 3.2.

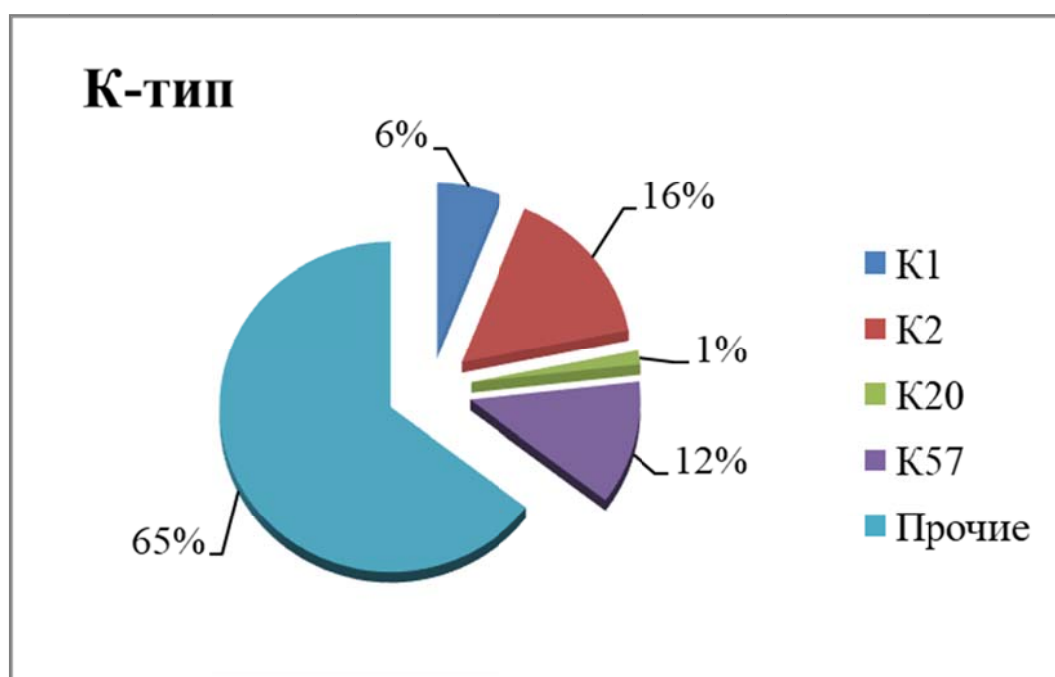


Рисунок 3.2 – Распределение штаммов *K. pneumoniae* по K-типам. В группу «Прочие» входят штаммы, геномы которых были секвенированы и капсульный тип был определен при анализе полных нуклеотидных последовательностей генома, а также штаммы, чей капсульный тип не принадлежит к искомым с помощью ПЦР типам.

Гипермукоидные штаммы по капсульным типам распределились следующим образом: K1 – 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 3.3). Примечательным является тот факт, что

штаммы других К-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.

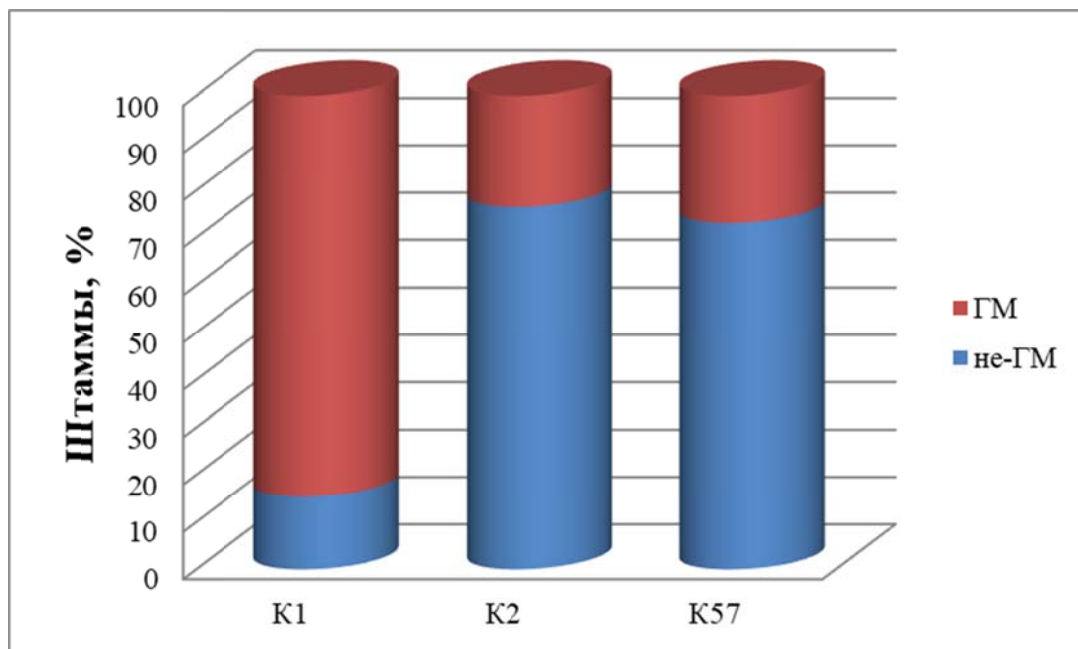


Рисунок 3.3 – Доля гипермукоидных вариантов среди штаммов капсульных типов K1, K2 и K57.

Для подтверждения капсульного типа, выявленного с помощью ПЦР, выделили и очистили полисахариды из клеток ГМ-штаммов КРВ463-13 (K1), КРi261 (K1), КРВ4010 (K2), КРМ9 (K20) и КРi8289 (K57). На основании детального анализа спектров ЯМР ^1H и ^{13}C выделенных полисахаридов, проведенного в лаборатории химии углеводов ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН, подтвердили правильность определенного методом ПЦР капсульного типа. Впоследствии эти штаммы использовали как референсные при постановке ПЦР.

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 LD_{50} для белых аутбредных мышей. По итогам проведенных экспериментов штаммы с ГМ-фенотипом разделили на три группы – высоковирулентные (LD_{50} не превышает 100 КОЕ), умеренно-вирулентные ($\text{LD}_{50} < 10^5$ КОЕ) и слабовирулентные ($\text{LD}_{50} > 10^6$ КОЕ) (таблица 3.1). Как видно из данных, представленных в таблице 3.1, среди высоковирулентных штаммов, как и следовало ожидать, преобладают гипермукоидные штаммы капсульных типов K1 и K2.

Таблица 3.1– 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

Также стоит упомянуть, что при оценке вирулентности 15 штаммов, не обладающих гипермукоидным фенотипом, во всех случаях показатель LD₅₀ был больше 10⁶ КОЕ.

Общая характеристика гипермукоидных штаммов представлена в таблице 3.2. Кроме представленных выше данных в таблицу также включены сведения об устойчивости штаммов к антибиотикам, наличии генов антибиотикорезистентности и вирулентности, опубликованные в работе Lev с соавт. (2018) [144].

Таким образом, опираясь на представленные выше данные, можно утверждать, что ГМ-штаммы *K. pneumoniae* действительно обнаруживаются на территории Российской Федерации, их доля среди клинических штаммов составляет 12,6 %, что согласуется с данными исследований зарубежных авторов. Вирулентность штаммов подтверждена исследованиями на аутбредных белых мышах. Оказалось, 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.

3.2 Выделение и характеристика бактериофагов, лизирующих *K. pneumoniae*

Для выделения фагов, лизирующих штаммы *K. pneumoniae*, использовали разнообразный материал, полученный из инфекционных стационаров (дренажные трубки, перевязочный материал и т.д.), а также 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*.

Таблица 3.2 – Характеристика гипермукоидных hvKp-штаммов

Штамм	Дата выделения	Источник	<i>rmpA</i>	LD ₅₀ (в/бр.)	К-тип	Гены вирулентности	Гены резистентности	Устойчивость к антибиотикам (классы)
КРВ-463-13	2013, апрель	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	10 ⁴	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL AMI SUL NIT
КРВ-1493-1	2013, октябрь	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	472	K1	<i>rmpA, aer, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL AMI SUL NIT
КРВ-1802	2013, ноябрь	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	86	K1	<i>rmpA, aer, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ompC</i>	BLA
КРВ-594	2014, февраль	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	2600	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge_2, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT
КРВ-475	2014, март	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	1259	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT
КРВ-1103	2014, июль	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	323	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT
КРВ-2580	2014, июль	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	17	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>int1, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMI SUL NIT
КРi-1683	2014, август	ИКБ №1	+	26	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{SHV} , <i>ompK36</i>	BLA NIT
КРi-3695	2015, октябрь	ИКБ №1	+	<10 ⁵	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	–	–
КРi-261	2014, июнь	ИКБ №1	+	16	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>ompK36</i>	BLA AMI NIT

Продолжение таблицы 3.2

Штамм	Дата выделения	Источник	<i>rmpA</i>	LD ₅₀ (в/бр.)	К-тип	Гены вирулентности	Гены резистентности	Устойчивость к антибиотикам (классы)
KPS-73	2016, июль	Лаб. коллекция	+	44	K1	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla_{SHV}</i>	BLA
KPi-3014	2014	ИКБ №1	+	10 ⁴	K2	<i>rmpA2, aer1, uge, wabG, kfu, fimH, allS</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMI NIT
KPB-4010	2013, октябрь	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	25	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA TET NIT
KPi-1748	2014, август	ИКБ №1	+	83	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA QNL CHL AMI SUL
KPi-2965	2015, сентябрь	ИКБ №1	+	<10 ⁵	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH, allS</i>	–	–
KPB-492-16	2016, апрель	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	<700	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA
KPB-463-16	2016, апрель	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	<800	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA
KPi-1627	2014, июнь	ИКБ №1	+	14	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA NIT
KPi-6208	2014, март	ИКБ №1	+	11	K2	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	BLA TET NIT

Окончание таблицы 3.2

Штамм	Дата выделения	Источник	<i>rmpA</i>	LD ₅₀ (в/бр.)	К-тип	Гены вирулентности	Гены резистентности	Устойчивость к антибиотикам (классы)
KPi-8289	2014	ИКБ №1	+	>10 ⁶	K57	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, fimH</i>	<i>bla_{SHV}, ompK36</i>	–
KPB-156	2015	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	-	>10 ⁶	K57	<i>rmpA2, uge, wabG, fimH</i>	<i>bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, ompK36</i>	–
KPB-612-1	2013, май	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	>10 ⁶	K57	<i>rmpA, aer1, aer2, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-48}, int1, ompK36</i>	BLA QNL AMI SUL PHO NIT CST
KPB-567	2013, май	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	-	>10 ⁶	K57	–	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-244}, int1</i>	–
KPB-757	2013, июнь	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	10 ⁸	K57	<i>rmpA, aer1, aer2, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-244}, int1, ompK36</i>	BLA TET QNL CHL AMK SUL NIT PHO
KPB-811	2013, июль	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	+	10 ⁸	K57	<i>rmpA, aer1, aer2, wabG, fimH, allS</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-244}, int1, ompK36</i>	BLA QNL SUL NIT PHO
KPM-9	2012	Лаб. коллекция	+	15	K20	<i>rmpA, aer1, aer2, uge, wabG, kfu, fimH, allS</i>	<i>bla_{SHV}, ompC</i>	BLA
KPB-690	2015, апрель	ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко	-	>10 ⁶	K57	<i>uge, wabG</i>	<i>bla_{TEM}, bla_{SHV}, bla_{CTX-M}, bla_{OXA-48}, int1, ompK36</i>	BLA QNL CHL AMI NIT

Условные обозначения: *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-244}* – гены, кодирующие β-лактамазы; *int1* – интегрон класса 1; *ompC*, *ompK36* – гены, кодирующие образование пориновых белков; BLA – β-лактамы; TET – тетрациклины; QNL – хинолоны; CHL – хлорамфениколы; AMK – аминогликозиды; SUL – сульфаниламиды; NIT – нитрофураны; PHO – фосфомицины.

В период с 2014 по 2016 год выделены 18 бактериофагов, лизирующих бактерии вида *K. pneumoniae*. Для оценки уникальности бактериофагов, на этапе их выделения использовали метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) фаговой ДНК (эндонуклеазы рестрикции *EcoRV* и *HindIII*), что подтвердило уникальность каждого выделенного бактериофага, так как ДНК всех 18 фагов отличалась по характеру распределения фрагментов рестрикции в геле 1 %-й агарозы. Примеры электрофореграмм фаговой ДНК представлены на рисунке 3.4.

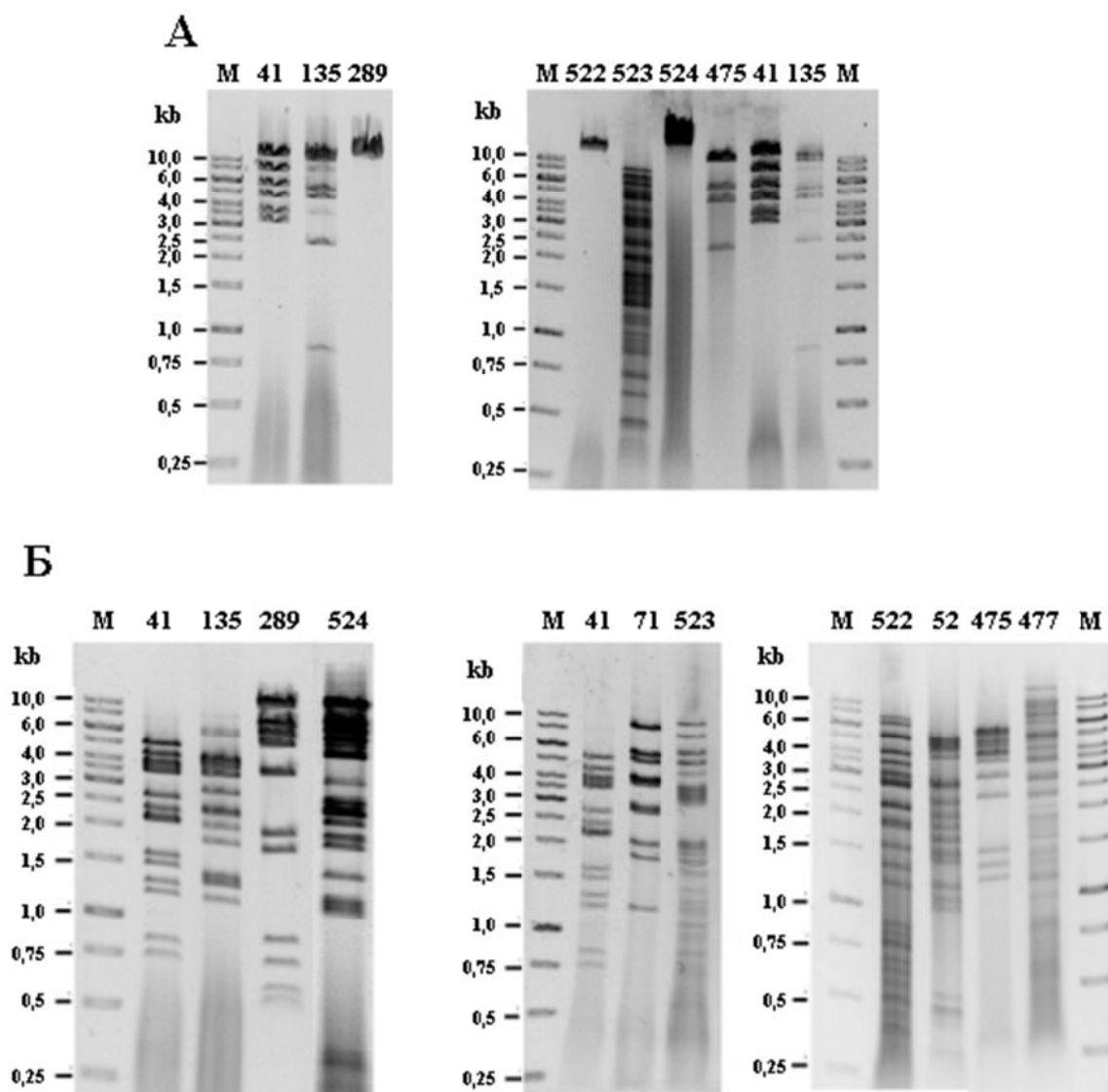


Рисунок 3.4 – Электрофореграммы фаговой ДНК, обработанной эндонуклеазами рестрикции *HindIII* (А) и *EcoRV* (Б); 1 %-й агарозный гель, трис-боратный буфер. Номера над гелем соответствуют обозначению КрV-бактериофагов, М – маркер молекулярных масс «GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США).

Исследование бактериофагов на коллекции штаммов *K. pneumoniae* показало, что выделенные фаги отличаются по спектру литического действия и лизируют от 2,7 до 18,1 % штаммов *K. pneumoniae* с различной эффективностью бляшкообразования (таблица 3.3).

Таблица 3.3 – 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. Пушкино)	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 – показатель эффективности бляшкообразования.

Дополнительные параметры литической активности (время адсорбции, латентный период, выход фага в расчете на бактериальную клетку) определили 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).

Общей особенностью морфологии негативных колоний всех выделенных бактериофагов является образование ореола вокруг прозрачной зоны лизиса, что косвенно указывает на наличие растворимого фермента, предположительно деполимеризующего капсульный полисахарид *K. pneumoniae* (рисунок 3.5).

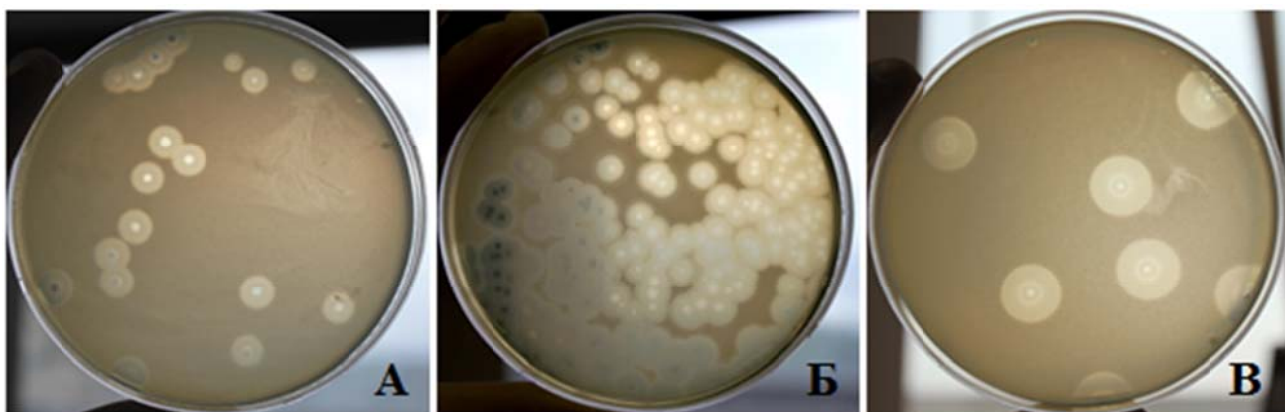


Рисунок 3.5 – Негативные колонии бактериофагов КрV79 (А), КрV767 (Б), КрV762 (В).

Все выделенные и исследованные бактериофаги паспортизованы и депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk», что делает их доступными для других исследователей (таблица 3.3).

3.3 Исследования генома бактериофагов

Для 13 бактериофагов определили полную нуклеотидную последовательность генома. При биоинформационном анализе с использованием алгоритмов BLAST [33], а также программного обеспечения GeneMark.hmm [164], RAST [39] и Prodigal [119], 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 3.6). 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 в виду наличия их всесторонней характеристики и отсутствия негативных качеств. Аннотированные геномы бактериофагов депонировали в международную

базу данных DDBJ/EMBL/GenBank. При размещении в базе данных фаги обозначили в соответствии с номенклатурой, рекомендованной Подкомитетом по вирусам бактерий и архей ICTV (таблица 3.4).

Таблица 3.4 – Геномные данные секвенированных бактериофагов

Название	Размер генома, п.н.	G+C, %	№ GenBank	Наименование по рекомендации ICTV
КрV41	44 203	53,9	KT964103	vB_KpnP_KpV41
КрV475	42 201	54,2	KX211991	vB_KpnP_KpV475
КрV48	44 623	54,1	KX237514	vB_KpnP_KpV48
КрV71	43 267	53,9	KU666550	vB_KpnP_KpV71
КрV74	44 094	54,1	KY385423	vB_KpnP_KpV74
КрV289	41 054	52,6	LN866626	vB_KpnP_KpV289
КрV763	40 764	53,2	KX591654	vB_KpnP_KpV763
КрV766	41 283	52,6	KX712071	vB_KpnP_KpV766
КрV767	40 394	52,3	KX712070	vB_KpnP_KpV767
КрV52	47 405	48,9	KX237516	vB_KpnM_KpV52
КрV79	47 612	48,9	MF663761	vB_KpnM_KpV79
КрV477	168 272	53,1	KX258185	vB_KpnM_KpV477
КрV522	51 099	50,8	KX237515	vB_KpnS_KpV522

Известно, что последовательности некоторых основных генов и их продуктов (например, ДНК-полимеразы, РНК-полимеразы, терминаза, основной белок капсида) могут быть использованы для определения таксономического положения бактериофагов [110]. 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, 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 (рисунок 3.6). Бактериофаги КрV41, КрV48, КрV71, КрV74 и КрV475 показали высокую степень идентичности с бактериофагами рода *Kp34virus*, в то время как остальные подовирусы (КрV289, КрV763, КрV766 и КрV767) расположились среди фагов рода *Kp32virus* на одной ветви с известными клебсиеллезными фагами К11, К30 и КР32 (рисунок 3.7).

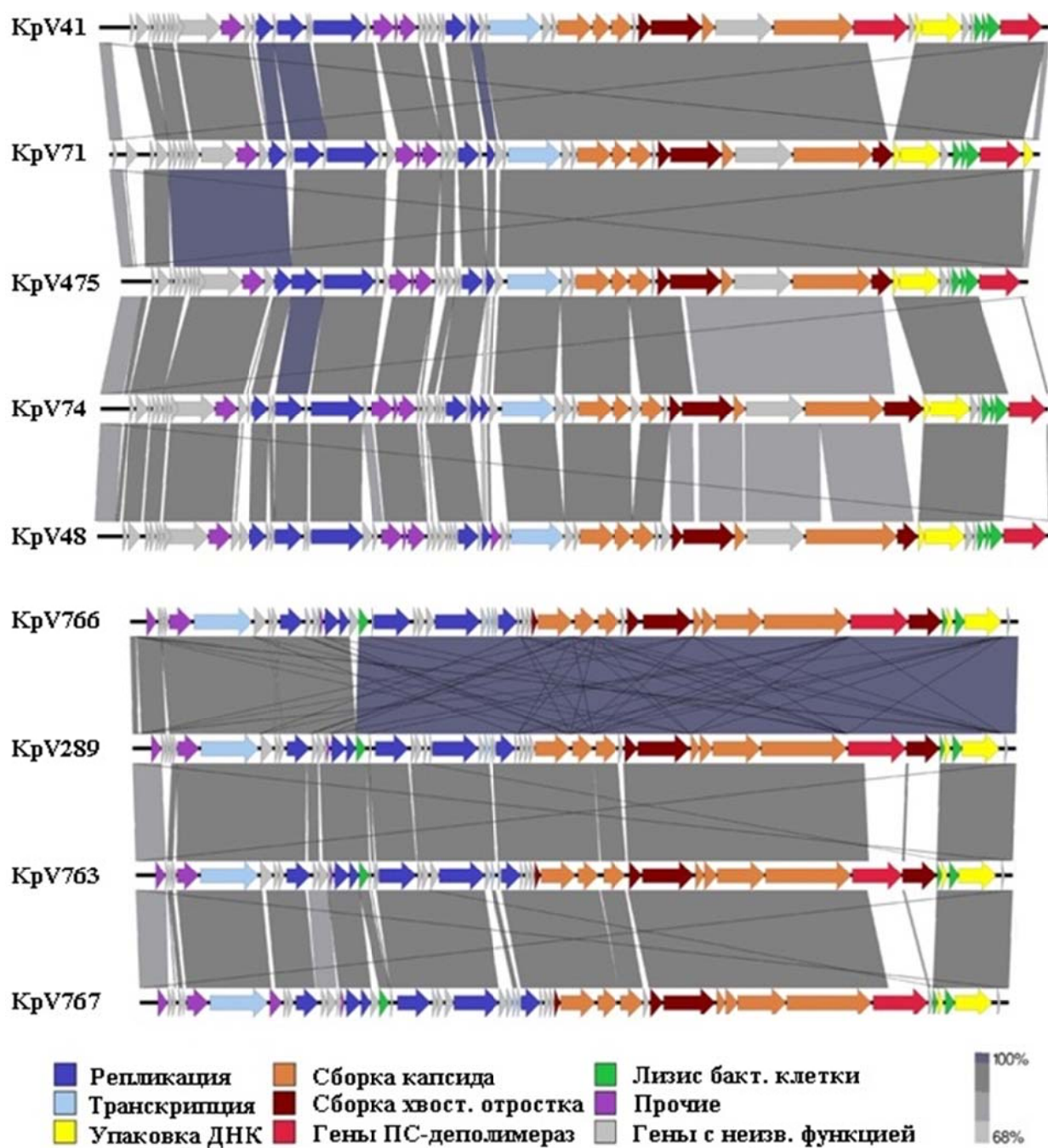


Рисунок 3.6 – Сравнение последовательностей генома подовирусов с помощью программы Easyfig.

Таким образом, согласно геномной структуре, гомологии последовательностей и филогенетическим данным, классифицировали подовирусы KpV763, KpV766 и KpV767 как представителей рода *Kp32virus*, а бактериофаги KpV41, KpV48, KpV71, KpV74 и KpV475 – как представителей рода *Kp34virus* (таблица 3.5).

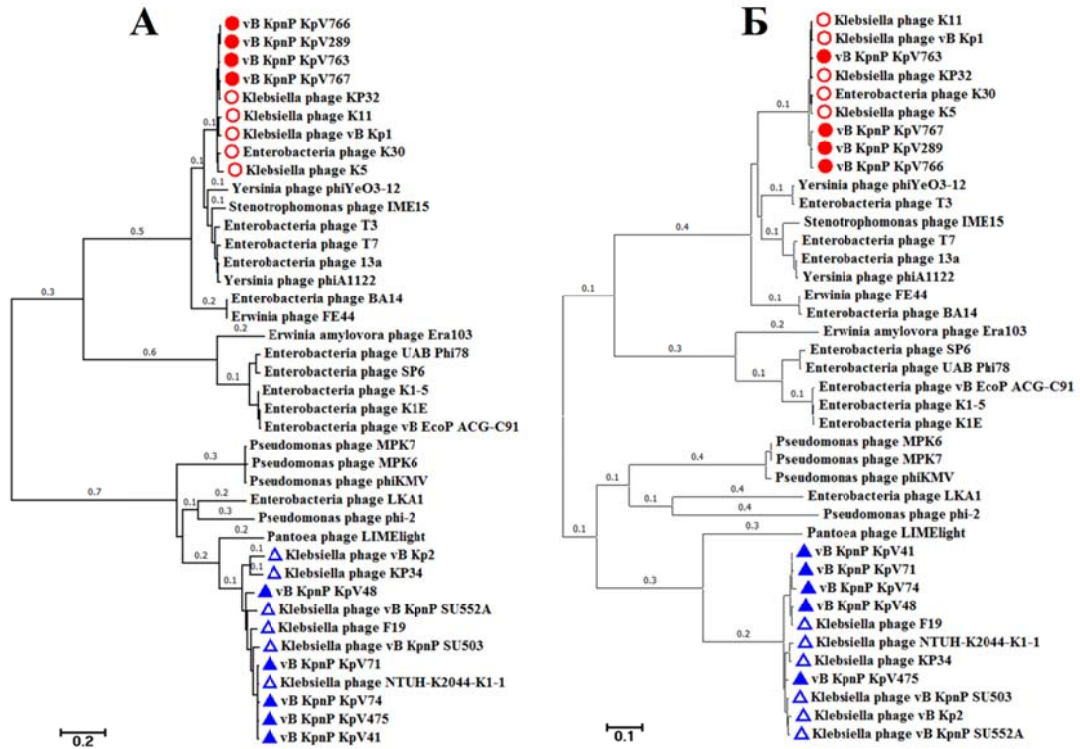


Рисунок 3.7 – Филогенетическое дерево, основанное на аминокислотных последовательностях ДНК- (А) и РНК-полимеразы (Б) бактериофагов семейства Podoviridae, подсемейства Autographivirinae. Кругами обозначены фаги рода *Kp32virus*, треугольниками – фаги рода *Kp34virus*. Значки бактериофагов, представленных в исследовании – закрашены.

Аналогичное сравнение геномных последовательностей миовирусов показало, что КрV52 и КрV79 являются близкородственными и, в то же время, существенно отличаются от бактериофага КрV477 (рисунок 3.8). Небольшое количество охарактеризованных геномов, гомологичных геномам фагов КрV52 и КрV79 в базе данных GenBank, затрудняет классификацию данных фагов до рода.

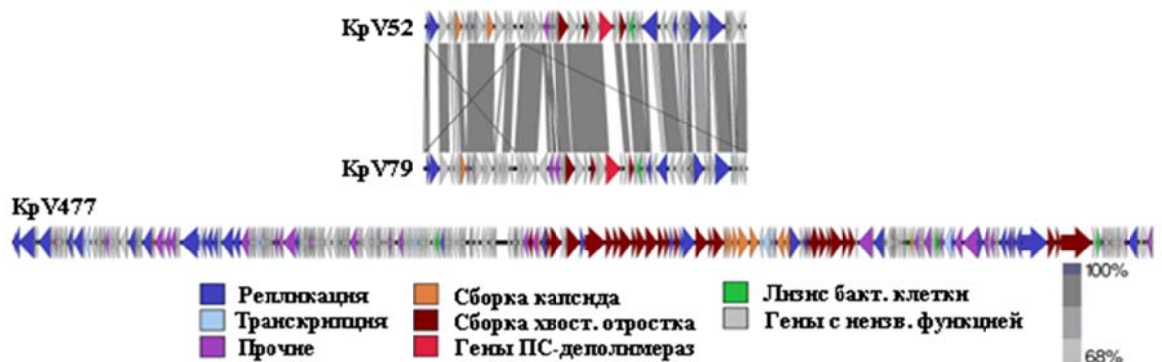


Рисунок 3.8 – Сравнение последовательностей генома миовирусов с помощью программы Easyfig.

Использование алгоритма megablast позволило отнести единственный сифовирус к подсемейству Tunavirinae, род *Kp36virus*, а отличающийся от миовирусов KpV52 и KpV79 фаг KpV477 – к подсемейству Tevenvirinae и роду *Jd18virus* (таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Таксономическое положение бактериофагов

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

3.4 Капсулоспецифичные бактериофаги

Как было отмечено выше, исследуемые бактериофаги лизируют достаточно узкий круг бактериальных штаммов (при тестировании на суммарной коллекции штаммов *K. pneumoniae*) (таблица 3.3). 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 3.6).

K1-специфичные фаги. Бактериофаги данной группы лизируют от 84,6 до 92,3 % штаммов K1-типа. Бактериофаги KpV41, KpV71, KpV135, KpV475, KpV524 не лизируют лишь один штамм K1-типа из нашей коллекции – KPB463-13. При анализе состава капсульных полисахаридов данного штамма оказалось, что моносахаридный состав его капсульного полисахарида несколько отличается от состава капсульных полисахаридов другого штамма K1-типа – KPi261, лизируемого всеми K1-специфичными фагами. Это позволяет предположить, что отличие в составе полисахаридов штамма KPB-463-13 является причиной отсутствия лизиса

указанными бактериофагами. Что касается лизиса штаммов других капсульных типов – возможно, это объясняется уникальностью капсульных полисахаридов данных штаммов.

Таблица 3.6 – Литический спектр капсулоспецифичных бактериофагов

Бактериофаг	К-тип	% лизиса штаммов К-типа	Количество лизируемых штаммов других К-типов
КрV41	К1	92,3	1 (К57), 1 (К62)
КрV71	К1	92,3	1 (К62)
КрV135	К1	92,3	2 (К57), 1 (К62)
КрV475	К1	92,3	1 (К57), 1 (К62)
КрV522	К1	84,6	1 (ND)
КрV524	К1	92,3	-
КрV765	К1	92,3	1 (К2)
КрV52	К2	17,6	-
КрV74	К2	29,4	1 (К13)
КрV762	К2	23,5	1 (ND)*
КрV763	К2	44,1	3 (ND), 1 (К13)
КрV79	К57	73,0	-
КрV523	К57	50,0	-
КрV767	К57	38,5	-

*ND – капсульный тип штамма не дифференцирован.

К2-специфичные фаги. Процент лизиса штаммов К2-типа колеблется от 17 до 29 %. Лизис единственного штамма капсульного типа К13 бактериофагами КрV74 и КрV763 объясним, так как известно, что штаммы К2- и К13-типов обладают перекрестной сероспецифичностью и имеют сходную структуру капсульных полисахаридов [186].

К57-специфичные фаги. Фаги данной группы лизируют от 38,5 % (КрV767) до 73 % (КрV79) штаммов капсульного типа К57 и не активны по отношению к *K. pneumoniae* других капсульных типов.

В итоге, по крайней мере восемь капсулоспецифичных бактериофагов (К1- и К57-специфичные фаги) лизируют до 70 % штаммов определенного для них капсульного типа. Эти данные предполагают потенциальную возможность использования капсулоспецифичных фагов в качестве типизирующей панели для штаммов К1- и К57-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-деполимеразми. Например, К2-специфичный бактериофаг КрV74 лизирует лишь 29,4 % штаммов К2-типа, но за счет эффекта «мутного пятна» дополнительно удалось распознать 55,8 % штаммов К2-типа, не лизируемых фагом (таблица 3.7).

Таблица 3.7 – 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*.

3.5 Клонирование генов фаговых полисахарид-деполимераз

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, используя алгоритмы BLASTP (protein-protein BLAST) и PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST), а также ресурсы HHpred [220] и InterProScan [124], позволяющие выявлять доменные структуры белковых молекул (таблица 3.8).

Таблица 3.8 – Анализ генов, предположительно кодирующих ПС-деполимеразы

Фаг	Ген (Protein ID, NCBI)	Размер белка, А.о.	Координаты домена, А.о.	Семейство	Анализ
КрV41	kpv41_55 (ALO80745.1)	651	35-406	Polygalacturonase; Glyco hydro 28	HHpred
			16-357	Pectin lyase fold	InterPro
			358-643		
	kpv41_46 (ALO80736.1)	858	1-141	Phage T7 tail fiber protein	HHpred
356-579			Pectate lyase 3		
КрV475	kpv475_51 (ANO57720.1)	651	87-405	Polygalacturonase; Glyco hydro 28	HHpred
			358-643	Pectin lyase fold	InterPro
			39-357		
КрV71	kpv71_52 (AMQ66478.1)	651	87-456	Glyco hydro 28	HHpred
			358-472	Pectin lyase fold	InterPro
			6-353		
КрV74	kpv74_56 (APZ82768.1)	577	85-303	Pectate lyase 3	HHpred
			423-572	Galactose-binding domain	InterPro
КрV52	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	
КрV763	kpv763_43 (AOT28172.1)	777	1-152	Phage T7 tail fiber protein	HHpred
			295-525	Pectate lyase 3	
КрV79	kpv79_42 (ATI16495.1)	721	143-519	Pectate lyase 3	HHpred
			173-567	Pectin lyase fold	InterPro
КрV767	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

В результате проведенного анализа в геномах K1-специфичных (КрV41, КрV475, КрV71), K2-специфичных (КрV52, КрV74, КрV763) и K57-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 3.6). Интересные результаты получили при анализе фагов KpV763 и KpV767, имеющих разную специфичность (K2 и K57, 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 3.6). 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 3.8, 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 pET22b(+), 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 KpV763 и KpV767, дополнительно разработали пары праймеров (таблица 2.2) для получения ампликона без N-концевого домена (рядом исследований показано, что N-домен не является необходимым для правильной сборки и ферментативной активности деполимеразы).

Ниже, в качестве примера, приведена схема и этапы клонирования гена *kpv71_52*, кодирующего предполагаемую ПС-деполимеразу *Dep_kpv71* бактериофага KpV71 (рисунок 3.9). Схема включает следующие этапы: амплификация целевого гена со специфическими праймерами (добавление сайтов необходимых эндонуклеаз рестрикции), рестрикция наработанного ампликона и вектора, лигирование обработанного эндонуклеазами рестрикции вектора и ампликона, трансформация полученными лигатами компетентных клеток *E. coli DH5α* и последующий отбор клонов, устойчивых к ампициллину, ПЦР-детекция вставки целевого гена, выделение рекомбинантной плазмиды и секвенирование ее по Сэнгеру, трансформация компетентных клеток *E. coli BL21* (DE3), получение колоний-продуцентов, экспрессия целевого белка, его выделение и очистка. По аналогичной схеме клонировали полноразмерные гены *kpv52_42*, *kpv74_56*, *kpv79_42*, кодирующие предполагаемые ПС-деполимеразы фагов KpV52, KpV74 и KpV79, соответственно, а также гены *kpv763_43* и *kpv767_46*, с делецией области кодирования N-терминального домена ПС-деполимераз бактериофагов KpV763 и KpV767, соответственно.

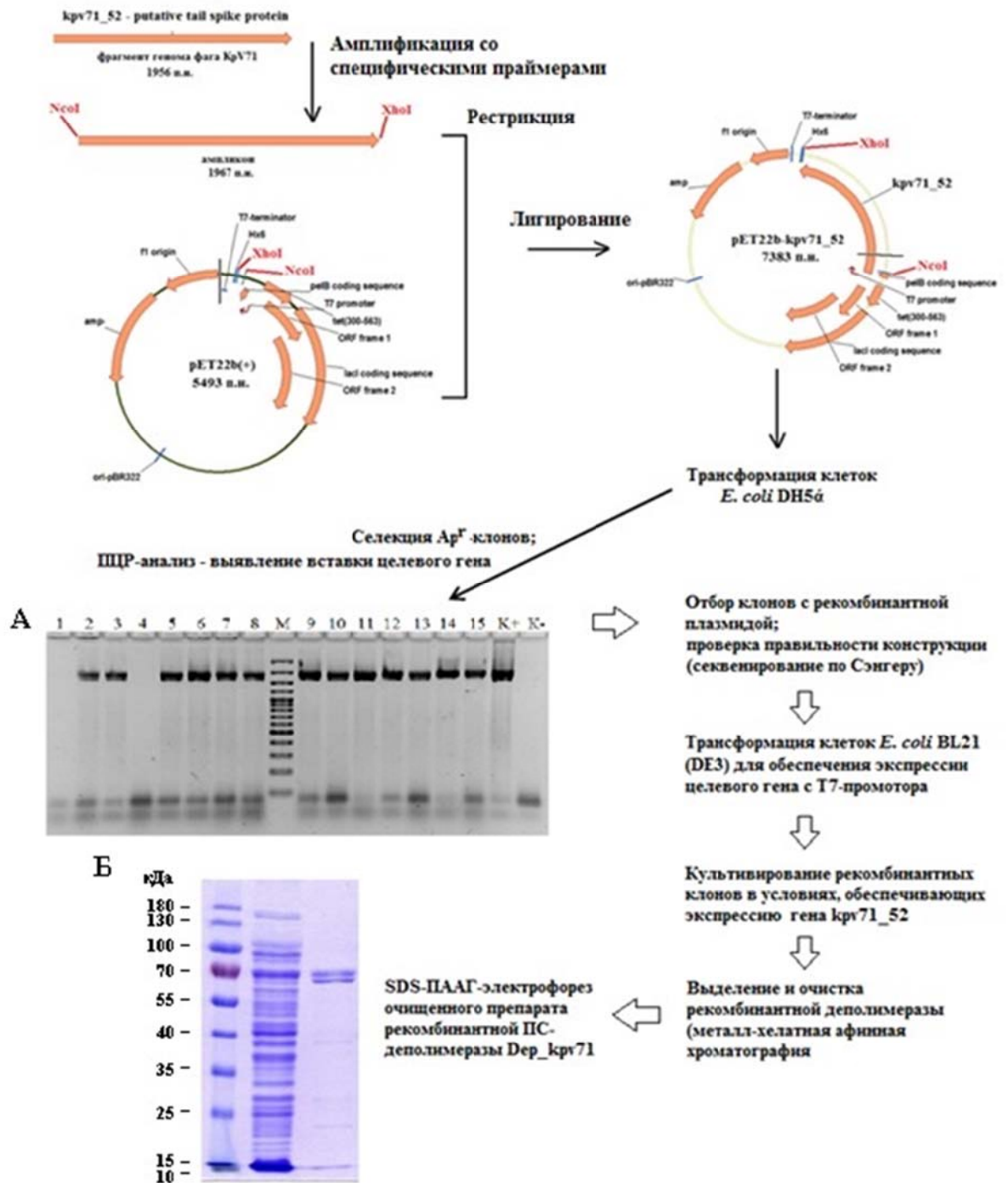


Рисунок 3.9 – Схема и этапы клонирования гена, кодирующего ПС-деполимеразу бактериофага КрV71. А – ПЦР-анализ ДНК трансформантов *E. coli* DH5α (pET22b-kpv71_52): 1-15 – номера колоний; K+ – ДНК бактериофага КрV71; M – маркер длин ДНК «O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use» (Thermo Fisher Scientific, США). 1%-й агарозный гель, 90V; Б – SDS-ПААГ-электрофорез очищенного препарата рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv71: справа – очищенная ПС-деполимераза Der_kpv71; по центру – раствор озвученных клеток-продуцентов до нанесения на колонку; слева – маркер молекулярной массы белков «PageRuler™ Prestained Protein Ladder» (Thermo Fisher Scientific, США).

3.6 Активность и специфичность рекомбинантных полисахарид-деполимераз

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 3.10, 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 3.10 (Б, В), демонстрируют существенное уменьшение капсульного материала у клеток, находившихся в зоне действия фермента.

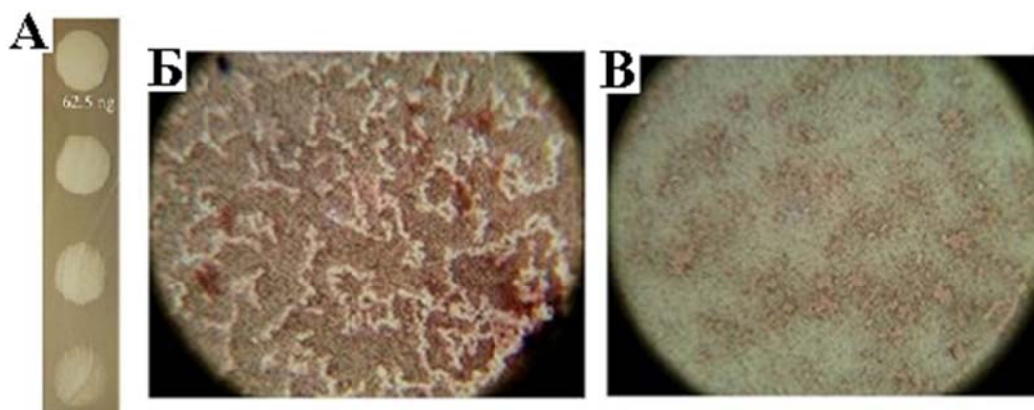


Рисунок 3.10 – Активность рекомбинантной ПС-деполимеразы K2-специфичного фага KpV74. (А) – спот-тест – мутные зоны в месте нанесения ПС-деполимеразы Der_kpv74 (сверху-вниз: двукратные разведения препарата) на газоне *K. pneumoniae* KPi1627 (K2-тип); (Б) – клетки *K. pneumoniae* KPi1627 из бактериального 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 Der_kpv74 (световой микроскоп, окраска тушью) – капсула не выявлена.

Активные ПС-деполимеразы также снижали вязкость растворенных в воде капсульных полисахаридов чувствительных штаммов. Таким образом установили, что ферментативной активностью обладают ПС-деполимеразы Der_kpv71, Der_kpv74, Der_kpv79 и Der_kpv767del. Ферменты Der_kpv52 и Der_kpv763del не проявляли полисахарид-деградирующей активности ни на газонах чувствительных бактериальных штаммов, ни на их капсульных полисахаридах.

Для оценки специфичности рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз хроматографически-очищенные ферменты тестировали на культурах штаммов *K. pneumoniae* разных капсульных типов. В таблице 3.9 представлены результаты сравнительного анализа, которые подтверждают предположение о более высоком уровне специфичности рекомбинантных ПС-деполимераз по сравнению с нативными бактериофагами.

Таблица 3.9 – Сравнение степени специфичности бактериофагов и рекомбинантных ПС-деполимераз

Штамм	ГМ	К-тип	Dep_kpv71	KpV71	Dep_kpv74	KpV74	Dep_kpv79	KpV79
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	-	-	-	-	+	+

Штамм	ГМ	К-тип	Dep_kv71	KpV71	Dep_kv74	KpV74	Dep_kv79	KpV79
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.

Чтобы определить механизм ферментативного действия рекомбинантных ПС-деполимераз мы проанализировали продукты, полученные при ферментативном расщеплении капсульных полисахаридов К2- и К57-типов препаратами Dep_kv74 и Dep_kv79, соответственно. При ферментативном расщеплении капсульного полисахарида К2-типа (выделен из штамма КРi1627) рекомбинантной ПС-деполимеразой Dep_kv74 были получены два олигосахарида – мономер и димер тетрасахаридного повторяющегося звена полисахарида (рисунок 3.11). Проведенный анализ показал, что рекомбинантная ПС-деполимераза Dep_kv74 расщепляет b-D-Glcp-(1→4)-D-ManpA (A→C)-связь капсульного полисахарида К2-типа.

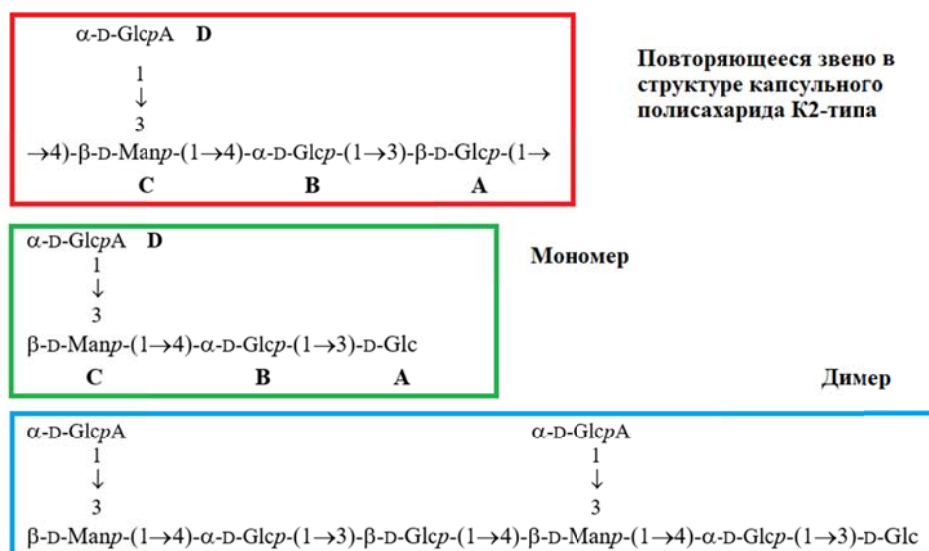


Рисунок 3.11 – Структура капсульного полисахарида штамма КРi1627 и олигосахарида, полученные при ферментативном расщеплении полисахарида рекомбинантной ПС-деполимеразой Dep_kv74.

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 3.12).

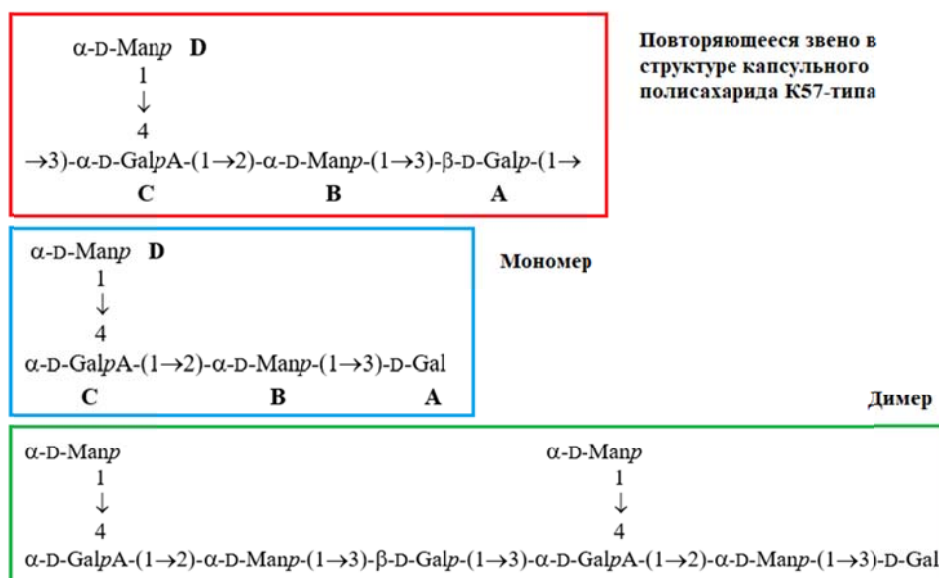


Рисунок 3.12 – Структура капсульного полисахарида штамма KPi8289 и олигосахариды, полученные при ферментативном расщеплении полисахарида рекомбинантной ПС-деполимеразой Der_kpv79.

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.

3.7 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 потенциала К2-специфичного бактериофага КрV74. Для этого моделировали *K. pneumoniae*-инфекцию мягких тканей бедра у мышей. Полученные результаты (рисунок 3.13) 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 – 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*.

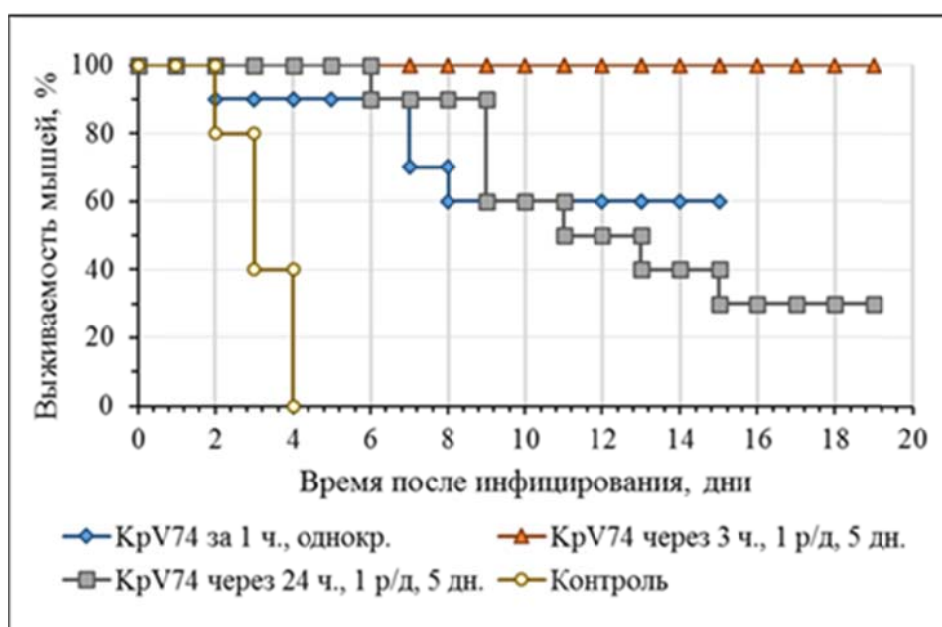


Рисунок 3.13 – Эффективность бактериофага КрV74 при лечении и профилактике инфекции мягких тканей бедра, вызванных вирулентным гипермукоидным штаммом *K. pneumoniae* КРi1627 у мышей.

Другой вариант использования – смесь бактериофагов, лизирующих бактерии К1-, К2- и К57-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 (К1-специфичный), КрV74 (К2-специфичный), КрV79 (К57-специфичный), КрV477 (без выраженной К-специфичности, наиболее широкий круг хозяев

среди всех фагов коллекции) и КрV289 (без выраженной К-специфичности, лизирует некоторые гипермукоидные штаммы, в том числе штамм капсульного типа К20). Эффективность данного коктейля оценивали *in vitro* на гипермукоидных штаммах К1-, К2-, К20- и К57-типа. Проведенные эксперименты продемонстрировали литическую активность коктейля фагов по отношению ко всем тестируемым штаммам *K. pneumoniae*. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.14.

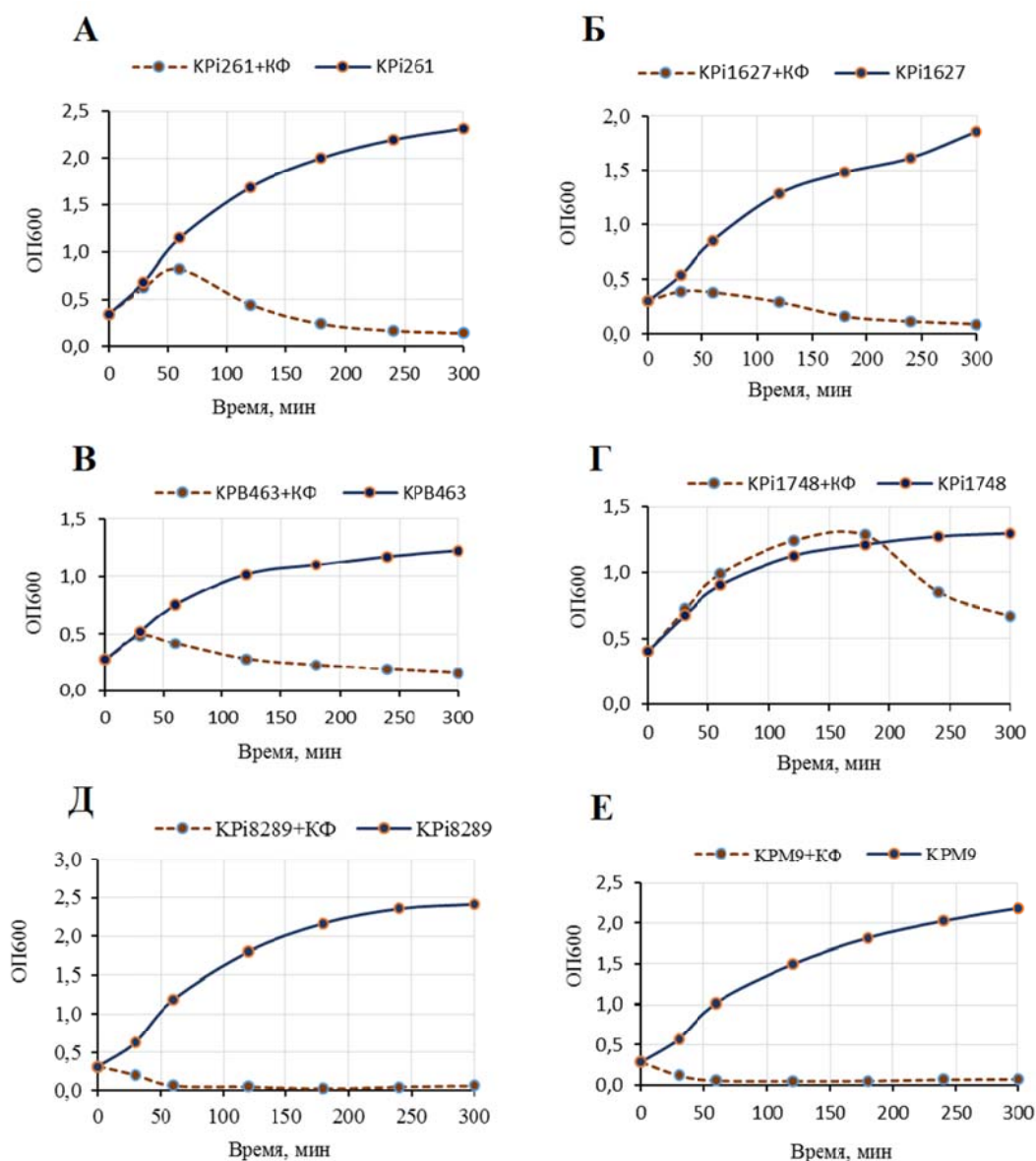


Рисунок 3.14 – Ингибирование роста бактерий *K. pneumoniae* разных штаммов коктейлем бактериофагов. А – штамм КРi261 (К1); Б – штамм КРi1627 (К2); В – штамм КРВ463-13 (К1); Г – штамм КРi1748 (К2); Д – штамм КРi8289 (К57); Е – штамм КРМ9 (К20).

КФ – коктейль бактериофагов КрV71, КрV52, КрV74, КрV79, КрV477 и КрV289 (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 3.9) 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 3.15) и инфекции мягких тканей бедра (рисунок 3.16).

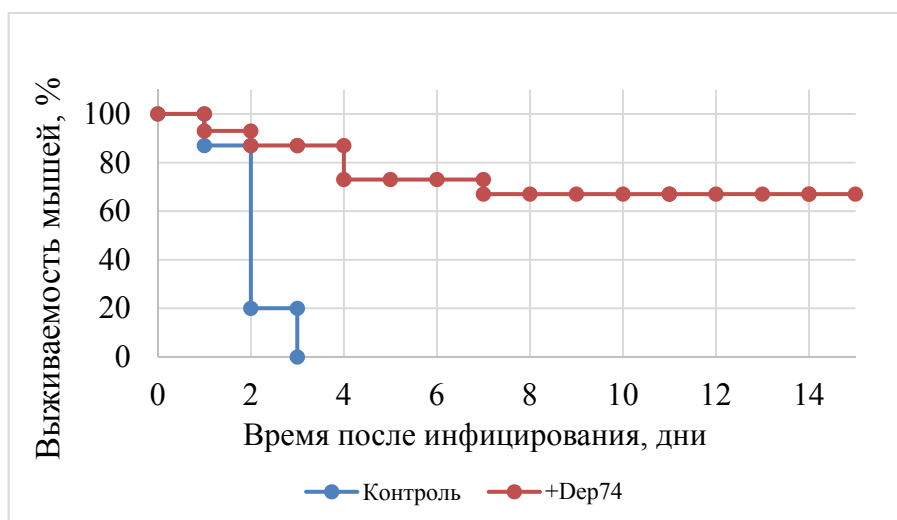


Рисунок 3.15 – Эффективность рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv74 на модели острого *K. pneumoniae*-сепсиса у мышей.

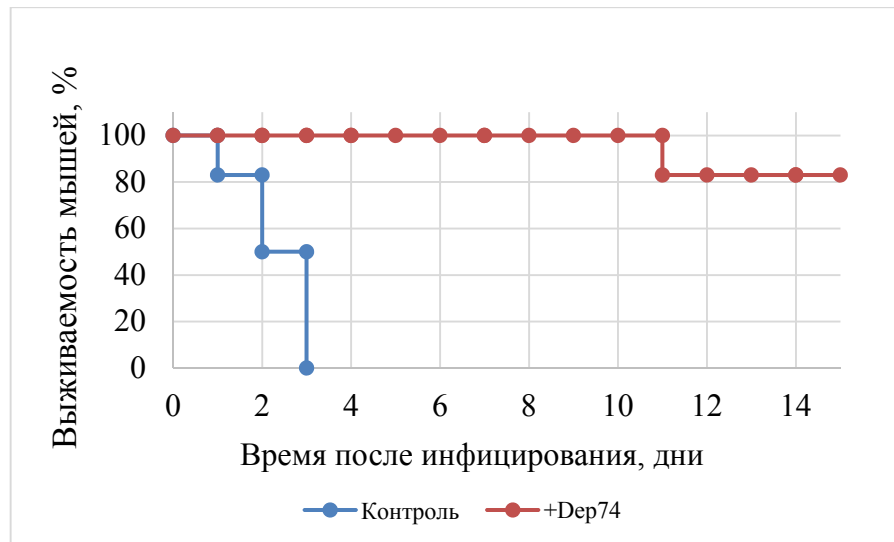


Рисунок 3.16 – Эффективность рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv74 на модели *K. pneumoniae*-инфекции мягких тканей бедра у мышей.

По итогам экспериментов, в контрольных группах (без обработки Der_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 Majkowska-Skrobek с соавт. [167].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Бактерии вида *K. pneumoniae* в настоящее время являются одними из самых проблемных микроорганизмов в клинической инфекционной патологии. С одной стороны, это обусловлено множественной лекарственной устойчивостью большинства клинических изолятов, с другой – повышением уровня вирулентности обособленной группы штаммов *K. pneumoniae*, обладающих гипермукоидным фенотипом. Проведенные исследования подтверждают, что среди клинических изолятов крупных инфекционных стационаров г. Москвы обнаруживаются гипермукоидные штаммы (общий процент внутри исследуемой коллекции – 12,6 %). При детальном исследовании установлено, что эти штаммы относятся к капсульным типам K1, K2 и K57, большинство из них обладает главным маркером гипермукоидности – геном-регулятором мукоидного фенотипа *mpA*. Следует отметить, что среди штаммов других капсульных типов гипермукоидных вариантов мы не обнаружили. При оценке степени вирулентности на лабораторных животных было показано, что к высоковирулентным и умеренновирулентным относятся штаммы преимущественно K1 и K2 типов, что подтверждает данные зарубежных исследований. Для сравнения - при оценке вирулентности 15 штаммов, не обладающих гипермукоидным фенотипом, во всех случаях показатель ЛД₅₀ был больше 10⁶ КОЕ. Обращает на себя внимание тот факт, что большинство штаммов устойчивы к трем и более классам антибиотиков. Более того, в исследуемой коллекции мы обнаружили штаммы, совмещающие в себе высокую степень вирулентности для лабораторных животных и множественную лекарственную устойчивость (6-7 классов антибактериальных препаратов). Приобретая свойства, способствующие увеличению степени вирулентности и резистентности, *K. pneumoniae* фактически становится суперпатогеном, потенциально способным к причинению большого вреда здоровью человека. Наряду с тем, что такие штаммы потенциально способны инфицировать здоровых людей, инфекции, вызываемые ими, трудно поддаются лечению в связи с их резистентными свойствами. Поэтому, актуальными являются поиск и разработка альтернативных методов борьбы с подобными штаммами.

Одним из хорошо известных способов борьбы с антибиотикорезистентными бактериями являются литические бактериофаги. Исследования бактериофагов сейчас выходят на новый виток в связи с развитием технологий секвенирования ДНК. В ходе выполненного исследования сформировали коллекцию из 18 бактериофагов, выделенных из различного материала – образцы, собранные в госпитальной среде (перевязочные материалы, катетеры и дренажные трубки), а также пробы сточных и канализационных вод. Уникальность каждого бактериофага подтвердили данными, полученными с помощью молекулярно-генетических методов. Выделенные бактериофаги отличаются различными показателями литического

действия: лизируют от 2,7 до 18,1 % штаммов *K. pneumoniae* с различной эффективностью бляшкообразования. 17 исследованных бактериофагов паспортизовали и депонировали в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск», обеспечив таким образом их доступность для других исследователей.

Большую работу провели по изучению свойств фаговых геномов – для 13 бактериофагов определена полная нуклеотидная последовательность генома. Последовательности геномов проанализированы и аннотированы. Проведенный анализ свидетельствует об отсутствии в геноме бактериофагов детерминант антибиотикорезистентности, генов, кодирующих белки-токсины и какие-либо другие известные факторы патогенности, а также генов, определяющих лизогенный путь развития бактериофагов. Этот критерий является одним из наиболее важных в контексте применения литических бактериофагов в современной клинической практике. Кроме того, геномные исследования позволили определить таксономическое положение бактериофагов. Подовирусы KpV298, KpV763, KpV766 и KpV767 классифицированы как представители рода *Kp32virus* подсемейства *Autographivirinae*, а бактериофаги KpV41, KpV48, KpV71, KpV74 и KpV475 – как представители рода *Kp34virus* этого же подсемейства. Единственный сифовирус KpV522 отнесли к подсемейству *Tunavirinae*, род *Kp36virus*, а миовирус KpV477 – к подсемейству *Tevenvirinae* и роду *Jd18virus*. Ввиду отсутствия в базе данных GenBank охарактеризованных гомологов бактериофагов KpV52 и KpV79 подсемейство и род данных бактериофагов установить не удалось.

Данные об особенностях литического действия, а также сведения, полученные в ходе анализа геномов исследуемых фагов, являются полноценной основой для дальнейшего изучения и разработки лечебно-профилактических препаратов с целью использования в клинической практике.

Одна из основных задач выполненного исследования направлена на поиск бактериофагов, лизирующих гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*, обладающие ГМ-фенотипом. Известно, что гипермукоидными чаще всего являются штаммы капсульных типов K1 и K2 (реже K5, K20, K54 и K57). В сформированной коллекции бактериальных штаммов мы обнаружили три группы фагов – K1-, K2- и K57-специфичные. Следует отметить, что K57-специфичные бактериофаги выделены и описаны впервые. В ходе проведенных исследований установлено, что K1-специфичные бактериофаги лизируют от 84,6 (KpV522) до 92,3 % (KpV71) штаммов K1-типа, K2-специфичные – от 17 (KpV52) до 29 % (KpV74). K57-специфичные фаги лизируют от 38,5 (KpV767) до 73 % (KpV79) штаммов капсульного типа K57 и не активны по отношению к *K. pneumoniae* других капсульных типов. Выявленная специфичность определяет возможность применения бактериофагов (особенно K1- и K57-специфичных) в качестве типизирующей панели для определения капсульного типа клинических изолятов *K. pneumoniae*.

С целью оценки активности исследуемых бактериофагов провели серию дополнительных экспериментов по определению влияния фагового коктейля на размножение бактерий вирулентных гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* разных капсульных типов в жидкой питательной среде. Проведенные эксперименты продемонстрировали литическую активность коктейля фагов по отношению ко всем тестируемым штаммам *K. pneumoniae*. На примере K2-специфичного бактериофага KpV74 показана эффективность фаготерапии *in vivo*. На модели *K. pneumoniae*-инфекции мягких тканей бедра у мышей был достигнут хороший терапевтический эффект при раннем начале лечения, все мыши через две недели после окончания курса фаготерапии были живы, в то время как все мыши контрольной группы погибли на 2-4 сутки после инфицирования. У выживших мышей в течение двух недель после курса фаготерапии отсутствовали общие и местные признаки инфекционного заболевания. Бактериологический анализ органов и тканей выживших животных показал, что они не являются носителями *K. pneumoniae*.

Проведенные эксперименты показали, что капсулоспецифичные бактериофаги с охарактеризованными литическими свойствами, а также с проанализированными последовательностями геномов, на наш взгляд, являются перспективными для разработки лечебно-профилактических препаратов против госпитальных *K. pneumoniae*-инфекций. По результатам исследований, проведенных в ходе выполнения диссертационной работы, для включения в лечебно-профилактические коктейли рекомендованы следующие бактериофаги: KpV71 (K1-специфичный); KpV52 и/или KpV74 (K2-специфичные); KpV79 (K57-специфичный); KpV477 (без выраженной K-специфичности, наиболее широкий круг хозяев среди всех фагов) и KpV289 (без выраженной K-специфичности, лизирует некоторые гипермукоидные штаммы, в том числе штамм капсульного типа K20, выделенный из окружающей среды).

При оценке специфичности бактериофагов обратили внимание на тот факт, что на некоторых штаммах *K. pneumoniae* из исследуемой коллекции бактериофаги не образуют негативных колоний (т.е. не размножаются), но оставляют мутное пятно. Очевидно, такие пятна образуются за счет действия ПС-деполимераз, что может свидетельствовать о том, что специфичность данных ферментов несколько выше по сравнению с нативными бактериофагами. На примере K2-специфичного бактериофага KpV74 было показано, что он образует негативные колонии на 29,4 % штаммов K2-типа, а еще на культурах 55,8 % штаммов K2-типа при нанесении капли фаголизата формируется лишь мутное пятно.

Анализ фаговых геномов позволил обнаружить гены, кодирующие белки, предположительно являющиеся ПС-деполимеразами. Стоит отметить, что в близкородственных подовирусах KpV41 и KpV475 были обнаружены белки, содержащие по два мотива ПС-

деполимеразы, а в бактериофаге КрV41 выявлены два вероятных белка с ПС-деполимеразным доменом. Результаты анализа в полной мере подтверждают высокую степень вариабельности генов, кодирующих фаговые ПС-деполимеразы. Например, при анализе фагов КрV763 и КрV767, имеющих разную К-специфичность (K2 и K57, соответственно), но выделенных из одного образца сточных вод, обнаружили высокую степень гомологии ДНК, за исключением области кодирования белков, содержащих мотивы ПС-деполимераз. 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.

Гены, предположительно кодирующие ПС-деполимеразы бактериофагов КрV71, КрV52, КрV74, КрV79, КрV763 и КрV767, были клонированы и экспрессированы в клетках *E.coli* BL21 (DE3). Изучение активности хроматографически очищенных рекомбинантных ПС-деполимераз на газонах бактериальных культур, инактивированных хлороформом, а также на капсульных полисахаридах показало, что ферментативной активностью обладают ПС-деполимеразы Der_kpv71, Der_kpv74, Der_kpv79 и Der_kpv767del. Ферменты Der_kpv52 и Der_kpv763del не проявляли полисахарид-деградирующей активности ни на газонах чувствительных бактериальных штаммов, ни на их капсульных полисахаридах. Дальнейшее изучение механизма ферментативного действия рекомбинантных фаговых ПС-деполимераз Der_kpv74, Der_kpv79 позволило классифицировать их как специфические гликозидазы, катализирующие расщепление полисахаридов *K. pneumoniae* по β -глюкозидным и β -галактозидным связям, соответственно.

Эксперименты по сравнению специфичности нативных бактериофагов и их рекомбинантных ПС-деполимераз подтвердили предположение о более высокой специфичности фаговых ферментов. Например, рекомбинантная ПС-деполимераза Der_kpv79 активна по отношению к большому количеству штаммов K57-типа, чем бактериофаг КрV79, причем, и фаг, и ПС-деполимераза не активны по отношению к *K. pneumoniae* других капсульных типов. Следует отметить удобство и быстроту типирования штаммов при использовании рекомбинантных ПС-деполимераз – результат проявляется через 15 минут и не требует обязательного наличия свежего бактериального газона. Таким образом, можно сделать вывод, что рекомбинантные ПС-деполимеразы являются эффективным средством для быстрой идентификации капсульного типа, что открывает перспективы разработки панели для типирования клинически значимых изолятов *K. pneumoniae*.

В заключение хотелось бы еще раз акцентировать внимание на «антивирулентном» свойстве рекомбинантных ПС-деполимераз, связанном с их способностью расщеплять капсульные полисахариды, которые являются одним из основных факторов, определяющих

вирулентность *K. pneumoniae*. Это свойство показывает перспективы использования рекомбинантных ПС-деполимераз, наряду с бактериофагами, в качестве терапевтического средства, особенно против hvKp-штаммов, обладающих, чаще всего, ярко выраженной полисахаридной капсулой. Проведенные исследования подтвердили эффективность лечебно-профилактического действия K2-специфичной рекомбинантной ПС-деполимеразы Der_kpv74. При исследовании терапевтической эффективности данного фермента на двух экспериментальных моделях – острого сепсиса и инфекции мягких тканей бедра у мышей, показано, что рекомбинантная ПС-деполимераза, введенная мышам через 30 минут после инфицирования культурой высоковирулентного гипермукоидного штамма *K. pneumoniae*, обеспечивает выживаемость 65 % и 80 % животных, соответственно. Более того, при вскрытии выживших и умерщвленных через 15 суток животных, получавших лечение, каких-либо патологий в органах и тканях не обнаружено, ни у одной из мышей не выделена культура *K. pneumoniae*, что указывает на полную санацию организма. Все эти данные отражают способность фаговых ПС-деполимераз дезактивировать основной фактор вирулентности гипермукоидных штаммов – гиперкапсулу. Устранение гиперкапсулы, очевидно, приводит к активизации компонентов иммунной системы, действие которых приводит к эрадикации возбудителя из организма экспериментальных животных. Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантные фаговые ПС-деполимеразы как средства, дополняющие арсенал лечебных и лечебно-профилактических средств для борьбы с гипермукоидными hvKp-штаммами.

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 Dep_kpv71, Dep_kpv74, Dep_kpv79 обладают ферментативной активностью и проявляют более выраженную специфичность по сравнению с нативными фагами.

5. Установлено, что рекомбинантные ПС-деполимеразы Dep_kpv74 и Dep_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 Dep_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 СОКРАЩЕНИЙ

- А.о. – аминокислотный остаток
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- в/бр. – внутрибрюшинно
- в/м. – внутримышечно
- ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
- ГКПМ – Государственная коллекция патогенных микроорганизмов
- ГМ – гипермукоидность
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- дцДНК – двуцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИКБ №1 – ГБУ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы»
- ИОХ им. Н.Д. Зелинского РАН – Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского Российской академии наук
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- кДа – килодальтон
- КОЕ – колониеобразующая единица
- КПС – капсульный полисахарид
- ЛПС – липополисахарид
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость
- НК – негативная колония
- оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
- п.н. – пара нуклеотидов
- ПС– полисахарид
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- ЦН им. ак. Н.Н. Бурденко – ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко» Минздрава РФ
- ЭБ – эффективность бляшкообразования
- ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
- ЭПС – экстраклеточный полисахарид

ЯМР – ядерный магнитный резонанс
allS – ген, кодирующий активатор аллантиинового регулона
amp – ген, кодирующий β-лактамазу, гидролизующую ампициллин
AmpC – β-лактамаза класса C, гидролизующая ампициллин
 ATCC – Американская коллекция типовых культур
bla – ген, кодирующий β-лактамазу
 BLAST – BasicLocalAlignmentSearchTool
 cKp – классические *K. pneumoniae*
cps – кластер генов синтеза капсульного полисахарида
 Dep – полисахарид-деполимераза
 EMBO – Европейская организация молекулярной биологии
 ESKAPE – *E*nterococcus *f*aecium, *S*taphylococcus *a*ureus, *K*lebsiella *p*neumoniae, *A*cinetobacter *b*baumannii, *P*seudomonas *a*eruginosa и виды рода *E*nterobacter
 hvKp – гипервирулентные *K. pneumoniae*
 Hx6 – гексагистидиновая последовательность
 ICTV – Международный комитет по таксономии вирусов
intl – ген, кодирующий интегразу 1 класса
iroBCDN – кластер генов синтеза сальмохелина
iucABCiutA – кластер генов синтеза аэробактина
 kb – килобаза
 Kfu – белок-транспортер железа
kfu – ген ABC-системы утилизации трехвалентного железа
 КР-АП – *K. pneumoniae*-ассоциированный абсцесс печени
 LD₅₀ – полумлетальная доза
magA – ген, ассоциированный с признаком гипермукоидности
 NCBI – Национальный центр биотехнологической информации
 OD – оптическая плотность
pelB – сигнальная последовательность
 Prodigal – Prokaryotic Dynamic Programming Genefinding Algorithm
 RAST – Rapid Annotation using Subsystem Technology
rcsA – ген регуляторной системы синтеза капсульного полисахарида
rcsB – ген регуляторной системы синтеза капсульного полисахарида
rmpA – ген, кодирующий регулятор мукоидного фенотипа
rmpA2 – аллельный вариант гена *rmpA*
 RmpA – регулятор мукоидного фенотипа

SDS – додецилсульфат натрия

T_a – температура отжига

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аветисян, Л.Р. Эпидемиологические и микробиологические аспекты колонизации кишечника детей первого года жизни условно-патогенными микроорганизмами: Автореферат дис. к-та мед. наук / Л.Р. Аветисян. Москва 2008. – 14 с.
2. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. Л.: Наука. – 1962. – С. 180.
3. Боговазова, Г.Г. Иммунобиологические свойства и терапевтическая эффективность препаратов бактериофагов клебсиелл / Г.Г. Боговазова, Н.Н. Ворошилова, В.М. Бондаренко и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1992. – №3. – С. 30-33.
4. Боговазова, Г.Г. Эффективность бактериофага *Klebsiella pneumoniae* при терапии экспериментальной клебсиеллезной инфекции / Г.Г. Боговазова, Н.Н. Ворошилова, В.М. Бондаренко // Микробиология. – 1991. – № 4. – С. 5-8.
5. Борзилов, А.И. Эффективность бактериофага KPV289 при лечении острой пневмонии и инфекции бедра, вызванных *Klebsiella pneumoniae*, у мышей / А.И. Борзилов, Н.В. Воложанцев, О.В. Коробова и др. // Инфекция и иммунитет. – 2017. – Т. 15. – № 3. – С. 48-57.
6. Власова, А.В. Фагирование в комплексном подходе к элиминации мультирезистентных штаммов *K. pneumoniae* из отделения реанимации новорожденных / А.В. Власова, Н.Ю. Горячева, Е.Л. Христофорова и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 1(68). – С. 36-41.
7. Ворошилова, Н.Н. Научные основы и разработка технологий производства препаратов бактериофагов *Shigella* и *Klebsiella*: Автореферат дис. д-ра мед. наук / Н.Н. Ворошилова. Москва. – 1992. – 53 с.
8. Габрилович, И.М. О взаимодействии фагов *Klebsiella* с чувствительными клетками / И.М. Габрилович, Т.Ч. Жугова // Вирусы микроорганизмов. Пущино: Науч. Центр биологических исследований АН СССР. – 1981. – С. 112-113.
9. Габриэлян, Н.И. Исследование антибиотико- и фагочувствительности нозокомиальных штаммов микробов, выделенных от пациентов трансплантологической клиники / Н.И. Габриэлян, Е.М. Горская, Т.С. Спирина и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. 13. – № 3. – С. 26-32.
10. Гельфанд, Б.Р. Значение энтеробактерий в этиологии нозокомиальных инфекций у больных в критических состояниях. Современные возможности антимикробной терапии

- / Б.Р. Гельфанд, Б.З. Белоцерковский, И.А. Милюкова, Д.Н. Проценко, Е.Б. Гельфанд, Т.В. Попов // *Анналы хирургии*. – 2015. – № 4. – С. 12–26.
11. Егорова, С.А. Карбапенемазы, продуцируемые штаммами *K. pneumoniae* – возбудителями ИСМП в стационарах Санкт-Петербурга / С.А. Егорова, Л.В. Липская, И.Б. Коноваленко и др. // *Инфекция и иммунитет*. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 22.
 12. Жуков-Вережников, Н.Н., Перемитина Л.Д., Берило Э.А. и др. Изучение терапевтического эффекта препаратов бактериофага в комплексном лечении гнойных хирургических заболеваний. *Советская медицина*. – 1978. – Т. 12. – С. 64-66.
 13. Захаров, А.А., Анализ микрофлоры ротовой полости обследованных людей с различными заболеваниями / А.А. Захаров, Н.А. Ильина // *Успехи современного естествознания*. – 2007. – № 12. – С. 353-355.
 14. Зурабов, А.Ю. Фаговый препарат «Фагодерм»: перспективы использования в дерматологии и косметологии / А.Ю. Зурабов, Е.Л. Жиленков, Д.В. Попов и др. // *Консилиум главных врачей*. – 2012. – № 9. – С. 29-38.
 15. Кокин, Г.А. Применение бактериофагов в хирургии. *Советская медицина*, 1941, 9, 15-18.
 16. Колмакова, Е.Ф. Микробиоценоз кожи и методы его коррекции / Е.Ф. Колмакова, О.С. Панова, С.А. Чубатова и др. // *Экспериментальная и клиническая дерматокосметология*. – 2004. – № 5. – С. 36-39.
 17. Кочеткова, В.Л. Фаготерапия послеоперационных гнойно-воспалительных осложнений у онкологических больных / В.Л. Кочеткова, Л.С. Мамонтов, Р.Л. Московцева и др. // *Советская Медицина*. – 1989. – Т. 6. – С. 23-26.
 18. Летаров, А.В. Адсорбция бактериофагов на клетках бактерий / А.В. Летаров, Е.Е. Куликов // *Успехи биологической химии*. – 2017. – Т. 57. – С. 153-208.
 19. Поздеев, О.К., Федоров Р.В. *Энтеробактерии: руководство для врачей*. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007 – 720 с.
 20. Покудина, И.О. Распространённость и вклад в антибиотикоустойчивость β-лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae* / И.О. Покудина, К.А. Коваленко // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. – 2016. – № 12 (2). – С. 295-298.
 21. Савостьянова, О.А. *Acinetobacter baumannii* и *Klebsiella pneumoniae* – возбудители бактериальной инфекции крови / О.А. Савостьянова, И.В. Драбкина, Т.В. Крупенио и др. // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2016. – Т. 18. – № 5. – С. 176.
 22. Смирнова, Л.И., Биологические свойства микроорганизмов вида *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, изолированных из молока коров при мастите / Л.И. Смирнова,

- А.В. Забровская, С.А. Егорова и др. // Международный вестник ветеринарии. – 2014. – № 2. – С. 12-16.
23. Султанов, Н.М. Антибактериальная активность и клиническая эффективность препарата пиобактериофага поливалентного очищенного при лечении хронического гнойного риносинусита: Автореферат дис. к-та биол. Наук / Уфа, 2007. – 20 с.
24. Функер, Е.В. Микробиологические и технологические аспекты разработки комплексного препарата бактериофагов: Автореферат дис. к-та биол. Наук / Пермь, 2007. – 16 с.
25. Abedon, S.T. Bacteriophage exploitation of bacterial biofilms: phage preference for less mature targets / S.T. Abedon // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 363. – No.3. – P. fmv246.
26. Ackermann, H.W. Prokaryote viruses studied by electron microscopy / H.W. Ackermann, D. Prangishvili // Archives of Virology. – 2012. – Vol. 157. – No.10. – P. 1843-1849.
27. Ackermann, H.W. Tailed bacteriophages: the order caudovirales / H.W. Ackermann // Advances in Virus Research. – 1998. – Vol. 51. – P. 135-201.
28. Adler, K. Bacteriological and virological status in upper respiratory tract infections of cats (cat common cold complex) / K. Adler, I. Radeloff, B. Stephan et al. // Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift. – 2007. – Vol. 120. – No. 3-4. – P. 120-125.
29. Adriaenssens, E.M. T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by *Dickeya solani* / E.M. Adriaenssens, J. Van Vaerenbergh, D. Vandenneuvel et al. // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – No.3. – P. e33227.
30. Adriaenssens, E.M. Integration of genomic and proteomic analyses in the classification of the Siphoviridae family / E.M. Adriaenssens, R. Edwards, J.H.E. Nash et al. // Virology. – 2015. – Vol. 477. – P. 144-154.
31. Adriaenssens, E.M. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2017 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee / E.M. Adriaenssens, J. Wittmann, J.H. Kuhn et al. // Archives of Virology. – 2018. – Vol. 163. – P. 1125-1129.
32. Alexiou, K. A prospective randomised trial of isolated pathogens of surgical site infections (SSI) / K. Alexiou, I. Drikos, M. Terzopoulou et al. // Annals of Medicine and Surgery. – 2017. – Vol. 21. – P. 25-29.
33. Altschul, S.F. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices / S.F. Altschul, J.C. Wootton, E.M. Gertz et al. // The FEBS Journal. – 2005. – Vol. 272. – No.20. – P. 5101-5109.
34. Alvarez, D. R. An online phage therapy bibliography: Separating under-indexed wheat from overly indexed chaff / D. R. Alvarez, S.T. Abedon // AIMS Microbiology. – 2017. – Vol. 3. – P. 525-528.

35. Anzai, E.K. First case report of non-human primates (*Alouatta clamitans*) with the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 strain ST 23: A possible emerging wildlife pathogen / E.K. Anzai, J.C. de Souza Júnior, A.R. Peruchi et al. // *Journal of Medical Primatology*. – 2017. – Vol.46. – No.6. – P. 337-342.
36. Arakawa, Y. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* Chedid (O1:K2) / Y. Arakawa, M. Ohta, R. Wacharotayankun et al. // *Infection and Immunity*. – 1991. - Vol. 59. – No.6. – P. 2043-2050.
37. Arena, F. First case of bacteremic liver abscess caused by an ST260-related (ST1861), hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / F. Arena, T. Spanu, L.H. De Angelis et al. // *Journal of Infection*. – 2016. – Vol. 73. – No.1. – P. 88-91.
38. Arena, F. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: A case report and literature review / F. Arena, L.H. De Angelis, M.M. D'Andrea et al. // *Virulence*. – 2017. – Vol. 8. – No.8. – P. 1900-1908.
39. Aziz, R.K. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology / R.K. Aziz, D. Bartels, A.A. Best et al. // *BMC Genomics*. – 2008. – Vol. 9. – P. 75.
40. Bach, S. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae / S. Bach, A. de Almeida, E. Carniel // *FEMS Microbiology Letters*. – 2000. – Vol. 183. – No.2. – P. 289-294.
41. Bales, P.M. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens / Bales P.M., Renke E.M., May S.L. et al. // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8. – No.6. – P. e67950.
42. Barbirz, S. Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related / S. Barbirz, J.J. Müller, C. Uetrecht et al. // *Molecular Microbiology*. – 2008. – Vol. 69. – No.2. – P. 303-316.
43. Barylski, J. The discovery of phiAGATE, a novel phage infecting *Bacillus pumilus*, leads to new insights into the phylogeny of the subfamily Spounavirinae / J. Barylski, G. Nowicki, A. Goździcka-Józefiak // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – No.1. - P. e86632.
44. Bedi, M.S. Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumonia* B5055 / M.S. Bedi, V. Verma, S. Chhibber // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2009. – Vol. 25. – No.7. – P. 1145-1151.
45. Brenner, D.J. Bergey's manual of Systematic Bacteriology / D.J. Brenner, N.R. Krieg, J.R. Staley // Springer., 2005. – Vol. 2. – Part B. – P. 367.

46. Bertani, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // Journal of Bacteriology. – 1951. – Vol. 62. – No.3. – P. 293-300.
47. Bialek-Davenet, S. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups / S. Bialek-Davenet, A. Criscuolo, F. Ailloud et al. // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 20. – No.11. – P. 1812-1820.
48. Borysowski, J. Phage Therapy: Current Research and Application / J. Borysowski, R. Miedzybrodzki, A. Górski, // Clinical Infectious Diseases. – 2015. - Vol. 61. – No.1. – P. 141-142.
49. Brisse, S. wzj gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains / S. Brisse, V. Passet, A.B. Haugaard et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51. – No.12. – P. 4073-4078.
50. Brüssow, H. Phage genomics: small is beautiful / H. Brüssow // Cell. – 2008. – Vol. 108. – No.1. – P. 13-16.
51. Bruttin, A. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy / A. Bruttin, H. Brüssow // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2005. – Vol. 49. – No.7. – P. 2874-2878.
52. Bruynoghe, R. Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage / R. Bruynoghe, J. Maisin // Journal De La Societe De Biologie. – 1921. – Vol. 85. – P. 1120-1121.
53. Bullen, J.J. Iron binding proteins and infection / J.J. Bullen, H.J. Rogers, E. Griffiths // British Journal of Haematology. – 1972. – Vol. 23. – No.4. – P. 389-392.
54. Calendar, R. The Bacteriophages, 2nd Ed. – Oxford University Press, 2006. – XIII. – ISBN-13 978-0-19-514850-3.
55. Cao, F. Evaluation of the Efficacy of a Bacteriophage in the Treatment of Pneumonia Induced by Multidrug Resistance *Klebsiella pneumoniae* in Mice / F. Cao, X. Wang, L. Wang et al. // BioMed Research International. - 2015. – P. 752930.
56. Casjens, S.R. Short noncontractile tail machines: adsorption and DNA delivery by podoviruses / S.R. Casjens, I.J. Molineux // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2012. – Vol. 726. – P. 143-79.
57. Catalán-Nájera, J.C. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes? / J.C. Catalán-Nájera, U. Garza-Ramos, H. Barrios-Camacho // Virulence. – 2017. – Vol. 8. – No.7. – P. 1111-1123.
58. Catalano, C. Viral genome packaging machines: genetics, structure, and mechanism: Springer. – 2005 edition.

59. Chai, H. Synthetic Antimicrobial Peptides Exhibit Two Different Binding Mechanisms to the Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* / H. Chai, W.E. Allen, R.P. Hicks // International Journal of Medicinal Chemistry. – 2014. – Vol. 2014. – Article ID 809283.
60. Chen, Y.J. Mycotic aneurysm caused by gas-forming serotype K5 *Klebsiella pneumoniae* / Y.J. Chen, S.Y. Chen, J.T. Wang et al. // International Journal of Infectious Diseases. – 2009. – Vol. 13. – No.2. – P. 47-48.
61. Chen, Y.T. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43 / Y.T. Chen, H.Y. Chang, Y.C. Lai et al. // Gene. – 2004. – Vol. 337. – P. 189-198.
62. Cheong, H.S. Emergence of an extended-spectrum β -lactamase-producing serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strain from Asian countries / H.S. Cheong, D.R. Chung, M. Park et al. // Epidemiology & Infection. – 2017. – Vol. 145. – No.5 – P. 990-994.
63. Cheong, H.S. Emergence of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains co-producing the plasmid-mediated AmpC betalactamase DHA-1 and an extended-spectrum beta-lactamase in Korea / H.S. Cheong, D.R. Chung, C. Lee et al. // Antimicrobial Resistance and Infection Control. – 2016. – Vol. 5. – P. 50.
64. Chetcuti Zammit, S. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia / S. Chetcuti Zammit, N. Azzopardi, J. Sant // European Journal of Internal Medicine. – 2014. – Vol.25. – No.6. – P. 571-576.
65. Chou, H.C. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection / H.C. Chou, C.Z. Lee, L.C. Ma et al. // Infection & Immunity. – 2004. – Vol. 72. – No.2. – P. 3783-3792.
66. Chung, D.R. Epidemiologic study of pyogenic liver abscess in Korea, 1989-1998 / D.R. Chung, J.M. Kang, S.S. Hong et al. // Clinical Infectious Diseases. – 1998. – Vol. 27. – No.4. – P. 950.
67. Chung, D.R. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea / D.R. Chung, H. Lee, M.H. Park et al. // European Journal of Clinical Microbiology & Infectious. – 2012. – Vol. 31. – No.4. – P. 481-486.
68. Chung, P.Y. The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation / P.Y. Chung // FEMS Microbiology Letters. – 2016. – Vol. 363. – No.20. – P. fw219.
69. Cislo, M. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections / M. Cislo, M. Dabrowski, B. Weber-Dabrowska et al. // Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis. – 1987. – Vol. 35. – No.2. – P. 175-183.

70. Compain, F. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* / F. Compain, A. Babosan, S. Brisse et al. // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52. – No.12. – P. 4377-4380.
71. Conlan, S. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project / S. Conlan, H.H. Kong, J.A. Segre // PLoS One. – 2012. – Vol. 7. – No.10. – P. e47075.
72. Cooper, C.J. Adapting Drug Approval Pathways for Bacteriophage-Based Therapeutics / C.J. Cooper, M.K. Mirzaei, A.S. Nilsson // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – P. 1209.
73. Corsaro, M.M. ¹H and ¹³C NMR characterization and secondary structure of the K2 polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* strain 52145 / M.M. Corsaro, C. De Castro, T. Naldi et al. // Carbohydrate Research. – 2005. – Vol. 340. – No.13. – P. 2212-2217.
74. Cortes, G. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia / G. Cortes, N. Borrell, B. de Astorza et al. // Infection & Immunity. – 2002. – Vol. 70. – No.5. – P. 2583-2590.
75. Costerus, J.M. Nosocomial meningitis caused by gas producing *Klebsiella pneumoniae* / J.M. Costerus, D. van de Beek, M.C. Brouwer // BMJ Case Reports. – 2012. – P. bcr1120115137.
76. Coutinho, R.L. Community-acquired invasive liver abscess syndrome caused by a K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* isolate in Brazil: a case report of hypervirulent ST23 / R.L. Coutinho, M.F. Visconde, F.J. Descio et al. // Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. – 2014. – Vol. 109. – No.7. – P. 970-971.
77. Cryz, S.J. Jr. Prevention of fatal experimental burn wound sepsis due to *Klebsiella pneumoniae* KP1-O by immunization with homologous capsular polysaccharide / S.J. Jr. Cryz, E. Furer, R. Germanier // The Journal of Infectious Diseases. – 1984. – Vol. 150. – No.6. – P. 817-822.
78. Cubero, M. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in Adults / M. Cubero, I. Grau, F. Tubau et al. // Microbial Drug Resistance. – 2017. - doi: 10.1089/mdr.2017.0107.
79. d'Herelle, F. 1921. Le bactériophage: son rôle dans l'immunité. Masson et Cie, Paris, France.
80. d'Herelle, F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques / F. D'Hérelle // Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De l'Academie Des Sciences. – 1917. – Vol. 165. – P. 373-375.
81. D'Andrea, M.M. ϕ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage /

- M.M. D'Andrea, P. Marmo, L. Henrici De Angelis et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – No.1. – P. 2614.
82. Decre, D. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France / D. Decre, C. Verdet, A. Emirian et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49. – No.8. – P. 3012-3014.
83. Deveau, H. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions / H. Deveau, J.E. Garneau, S. Moineau // *Annual Review of Microbiology*. – 2010. – Vol. 64. – P. 475-493.
84. Dillon, R.J. A note: Gut bacteria produce components of a locust cohesion pheromone / R.J. Dillon, C.T. Vennard, A.K. Charnley // *Journal of Applied Microbiology*. – 2002. – Vol. 92. – No.4. – P. 759–763.
85. Domenico, P. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae* / P. Domenico, R.J. Salo, A.S. Cross et al. // *Infection & Immunity*. – 1994. – Vol. 62. – No.10. – P. 4495-4499.
86. Drulis-Kawa, Z. Bacteriophages and phage-derived proteins – application approaches / Z. Drulis-Kawa, G. Majkowska-Skrobek, B. Maciejewska // *Current Medicinal Chemistry*. – 2015. – Vol. 22. – P. 1757-1773.
87. El Fertas-Aissani, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens / R. El Fertas-Aissani, Y. Messai, S. Alouache et al. // *Pathologie Biologie*. – 2013. – Vol. 61. – No.5. – P. 209-216.
88. Estell, K.E. Pneumonia Caused by *Klebsiella spp.* in 46 Horses / K.E. Estell, A. Young, T. Kozikowski et al. // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. – 2016. – Vol. 30. – No.1. – P. 314-321.
89. Evrard, B. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae* / B. Evrard, D. Balestrino, A. Dosgilbert et al. // *Infection & Immunity*. – 2010. – Vol. 78. – No.1. – P. 210-219.
90. Fang, C.T. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications / C.T. Fang, Y.P. Chuang, C.T. Shun et al. // *The Journal of Experimental Medicine*. – 2004. – Vol. 199. – No.5. – P. 697-705.
91. Fang, C.T. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess / C.T. Fang, S.Y. Lai, W.C. Yi et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 45. – No.3. – P. 284-293.
92. Fernandes, E. A bacteriophage detection tool for viability assessment of *Salmonella* cells / E. Fernandes, V.C. Martins, C. Nóbrega et al. // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2014. – Vol. 52. – P. 239-246.

93. Fischetti, V.A. Bacteriophage lysins as effective antibacterials / V.A. Fischetti // *Current Opinion in Microbiology*. – 2008. – Vol. 11. – No.5. – P. 393-400.
94. Fokine, A. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages / A. Fokine, M.G. Rossmann // *Bacteriophage*. – 2014. – Vol. 4. – No.1. – P. e28281.
95. Fouts, D.E. Complete genome sequence of the N₂-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice / D.E. Fouts, H.L. Tyler, R.T. DeBoy et al. // *PLoS Genetics*. – 2008. – Vol. 4. – No.7. – P. e1000141.
96. Friedländer, C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie / C. Friedländer // *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*. – 1882. – No.87. – P. 319-324.
97. Friedman, S.D. Gene mapping and phylogenetic analysis of the complete genome from 30 single-stranded RNA male-specific coliphages (family Leviviridae) / S.D. Friedman, F.J. Genthner, J. Gentry et al. // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – No.21. – P. 11233-11243.
98. Fu, W. Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an in vitro model system / W. Fu, T. Forster, O. Mayer et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2010. – Vol. 54. – No.1. – P. 397-404.
99. Fukuda, K. *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice: effects of topical bacteriophage KPP12 administration / K. Fukuda, W. Ishida, J. Uchiyama et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – No.10. – P. e47742.
100. Fursova, N.K. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter spp.* isolated in Moscow, Russia / N.K. Fursova, E.I. Astashkin, A.I. Knyazeva // *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. – 2015. – Vol. 14. – No.46.
101. Glonti, T. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* / T. Glonti, N. Chanishvili, P.W. Taylor // *Journal of Applied Microbiology*. – 2010. – Vol. 108. – No.2. – P. 695-702.
102. Goldman, J.M. Hepatic Abscess and Osteomyelitis from *Klebsiella pneumoniae* / J.M. Goldman, J.K. Kowalec // *Journal of the American Medical Association*. – 1978. – Vol. 240. – No.24. – P. 2660.
103. Górski, A. Phage as a modulator of immune responses: practical implications for phage therapy / A.Górski, R. Międzybrodzki, J. Borysowski et al. // *Advances in Virus Research*. – 2012. – Vol. 83. – P. 41-71.

104. Gu, D. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study / D. Gu, N. Dong, Z. Zheng et al. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2018. – Vol. 18. – No.1. – P. 37-46.
105. Guo, Y. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with invasive infections in China / Y. Guo, S. Wang, L. Zhan et al. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 24.
106. Gutierrez, D. Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB_SepiS-philPLA7 as an anti-biofilm agent in *Staphylococcal* species / D. Gutierrez, Y. Briers, L. Rodriguez-Rubio et al. // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 1315.
107. Hatfull, G.F. Bacteriophages and their genomes / G.F. Hatfull, R.W. Hendrix // *Current Opinion in Virology*. – 2011. – Vol. 1. – No.4. – P. 298-303.
108. Hendrix, R.W. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage / R.W. Hendrix, M.C. Smith, R.N. Burns et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1999. – Vol. 96. – No.5. – P. 2192-2197.
109. Hennequin, C. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* / C. Hennequin, F. Robin // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 35. – No.3. – P. 333-341.
110. Hoai, T.D. Properties and genomic analysis of *Lactococcus garvieae* lysogenic bacteriophage PLgT-1, a new member of Siphoviridae, with homology to *Lactococcus lactis* phages / T.D. Hoai, I. Nishiki, T. Yoshida // *Virus Research*. – 2016. – Vol. 222. – P. 13-23.
111. Hoyles, L. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*-bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman / L. Hoyles, J. Murphy, H. Neve // *Peer J*. – 2015. – Vol. 3. – P. e1061.
112. Hsieh, P.F. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess / P.F. Hsieh, T.L. Lin, C.Z. Lee et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 197. – No.12. – P. 1717-1727.
113. Hsieh, P.F. Two T7-like Bacteriophages, K5-2 and K5-4, Each Encodes Two Capsule Depolymerases: Isolation and Functional Characterization / P.F. Hsieh, H.H. Lin, T.L. Lin et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – No.1. – P. 4624.
114. Hsu, C.R. Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase / C.R. Hsu, T.L. Lin, Y.J. Pan et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – No.8. – P. e70092.
115. Hsu, C.R. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited / C.R. Hsu, T.L. Lin, Y.C. Chen et al. // *Microbiology*. – 2011. – Vol. 157. – No.12. – P. 3446-3457.

116. Hulo, C. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity / C. Hulo, E. de Castro, P. Masson et al. // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – P. D576-82.
117. Humphries, S. Enzymatic activity of bacteriophage-culture lysates I. A capsule lysine active against *Klebsiella pneumonia* type A / S. Humphries // *Journal of Bacteriology*. – 1948. – No.56. – P. 683.
118. Hung, C.H. Experimental phage therapy in treating *Klebsiella pneumoniae*-mediated liver abscesses and bacteremia in mice / C.H. Hung, C.F. Kuo, C.H. Wang et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2011. – Vol. 55. – No.4. – P. 1358-65.
119. Hyatt, D. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification / D. Hyatt, G.L. Chen, P.F. Locascio et al. // *BMC Bioinformatics*. – 2010. – Vol. 8. – No.11. – P. 119.
120. Iranzo, J. The Double-Stranded DNA Virosphere as a Modular Hierarchical Network of Gene Sharing / J. Iranzo, M. Krupovic, E.V. Koonin // *MBio*. – 2016. – Vol. 7. – No.4. – P. e00978-16.
121. Iwasaki, Y. Bacterial meningitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* capsular genotype K54 with development of granuloma-like nodal enhancement in the brain during the subacute phase / Y. Iwasaki, R. Inokuchi, S. Harada et al. // *Internal Medicine*. – 2017. – Vol. 56. – No.3. – P. 373-376.
122. Jamal, M. Characterization of Siphoviridae phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm / M. Jamal, T. Hussain, C.R. Das et al. // *Journal of Medical Microbiology*. – 2015. – Vol. 64. – No.4. – P. 454-462.
123. Jian-Li, W. Serotype and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from mink and its pathogenesis in mice and mink / W. Jian-Li, S. Yuan-Yuan, G. Shou-Yu et al. // *Scientific Reports*. – 2017. – Vol. 7. – No.1. – P. 17291.
124. Jones, P. InterProScan 5: genome-scale protein function classification / P. Jones, D. Binns, H.Y. Chang et al. // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30. – No.9. – P. 1236-1240.
125. Jung, S.W. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea / S.W. Jung, H.J. Chae, Y.J. Park et al. // *Epidemiology & Infection*. – 2013. – Vol. 141. – No.2. – P. 334-340.
126. Kaczkowski, H. Use of bacteriophages in the treatment of chronic bacterial diseases / H. Kaczkowski, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski et al. // *Wiadomosci Lekarskie* – 1990. – Vol. 43. – No.3-4. – P. 136-141.
127. Kassa, T. Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme / T. Kassa, S. Chhibber // *Journal of Virological Methods*. – 2012. – Vol. 179. – No.1. – P. 135-141.

128. Kasuya, K. Septicemic invasive *Klebsiella pneumoniae* infection in a cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) with severe diffused suppurative meningoencephalitis / K. Kasuya, K. Takayama, M. Bito et al. // Journal of Veterinary Medical Science. – 2017. – Vol. 79. – No.7. – P. 1167-1171.
129. Keller, J.J. Risk of infections subsequent to pyogenic liver abscess: a nationwide population-based study / J.J. Keller, M.C. Tsai, C.C. Lin et al. // Clin Microbiol Infect. – 2013. – Vol. 19. – No.8. – P. 717-722.
130. Kęsik-Szeloch, A. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* / A. Kęsik-Szeloch, Z. Drulis-Kawa, B. Weber-Dąbrowska et al. // Virology Journal. – 2013. – Vol. 10. – P. 100.
131. Khaertynov, K.S. Case of Meningitis in a Neonate Caused by an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / K.S. Khaertynov, V.A. Anokhin, Y.N. Davidyuk // Frontiers in Microbiology. – 2017. – Vol. 8. – P. 1576.
132. Kim, Y.J. Virulence factors and clinical patterns of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine / Y.J. Kim, S.I. Kim, Y.R. Kim et al. // Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 49. – No.3. – P. 178-184.
133. Ko, W.C. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns / W.C. Ko, D.L. Paterson, A.J. Sagnimeni et al. // Emerging Infectious Diseases. – 2002. – Vol. 8. – No.2. – P. 160-166.
134. Ku, Y.H. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance / Y.H. Ku, Y.C. Chuang, C.C. Chen et al. // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – No.1. – P. 6634.
135. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Molecular Biology and Evolution. – 2016. – Vol. 33. – No.7. – P. 1870-1874.
136. Labrie, S.J. Bacteriophage resistance mechanisms / S.J. Labrie, J.E. Samson, S. Moineau // Nature Reviews Microbiology. – 2010. – Vol. 8. – No.5. – P. 317-327.
137. Lai, Y.C. RmpA2, an activator of capsule biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43, regulates K2 cps gene expression at the transcriptional level / Y.C. Lai, H.L. Peng, H.Y. Chang // Journal of Bacteriology. – 2003. – Vol. 185. – No.3. – P. 788-800.
138. Lake, J.G. Pathogen Distribution and Antimicrobial Resistance Among Pediatric Healthcare-Associated Infections Reported to the National Healthcare Safety Network, 2011-2014 / J.G. Lake, L.M. Weiner, A.M. Milstone et al. // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2017. – Vol. 39. – No.1. – P. 1-11.

139. Laupland, K.B. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment / K.B. Laupland, T. Ross, J.D. Pitout et al. // *Infection*. – 2007. – Vol. 35. – No.3. – P. 150-153.
140. Lee, C.H. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis / C.H. Lee, C.C. Chang, J.W. Liu et al. // *Virulence*. – 2014. – Vol. 5. – No.6. – P. 673-679.
141. Lee, C.R. Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms / C.R. Lee, J.H. Lee, K.S. Park et al. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 483.
142. Lee, I.R. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population / I.R. Lee, J.S. Molton, K.L. Wyres et al. // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – No.29316.
143. Leiman, P.G. Evolution of a new enzyme activity from the same motif fold / P.G. Leiman, I.J. Molineux // *Molecular Microbiology*. – 2008. – Vol. 69. – No.2. – P. 287-290.
144. 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.
145. Li, B. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* / B. Li, Y. Zhao, C. Liu et al. // *Future Microbiology*. – 2014. – Vol. 9. – No.9. – P. 1071-1081.
146. Li, W. Increasing Occurrence of Antimicrobial-Resistant Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Isolates in China / W. Li, G. Sun, Y. Yu et al. // *Clinical Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 58. – No.2. – P. 225-232.
147. Lim, H.W. Endogenous endophthalmitis in the Korean population: a six-year retrospective study / H.W. Lim, J.W. Shin, H.Y. Cho et al. // *Retina*. – 2014. – Vol. 34. – No.3. – P. 592-602.
148. Lima-Mendez, G. Reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes / G. Lima-Mendez, J. Van Helden, A. Toussaint et al. // *Molecular Biology and Evolution*. – 2008. – Vol. 25. – No.4. – P. 762-777.
149. Lin, J.C. High prevalence of phagocytic-resistant capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess / J.C. Lin, F.Y. Chang, C.P. Fung et al. // *Microbes and Infection*. – 2004. – Vol. 6. – No.13. – P. 1191-1198.
150. Lin, T.L. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment / T.L. Lin, P.F. Hsieh, Y.T. Huang et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 210. – No.11. – P. 1734-1744.

151. Lin, Y.C. Assessment of hypermucoviscosity as a virulence factor for experimental *Klebsiella pneumoniae* infections: comparative virulence analysis with hypermucoviscosity-negative strain / Y.C. Lin, M.C. Lu, H.L. Tang et al. // BMC Microbiology. – 2011. – Vol. 11. – P. 50.
152. Lin, Y.T. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008 / Y.T. Lin, Y.Y. Jeng, T.L. Chen et al. // BMC Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 10. – P. 307.
153. Lindberg, A.A. Bacteriophage receptors / A.A. Lindberg // Annual Review of Microbiology. – 1973. – Vol. 27. – P. 205-241.
154. Lindsay, A.M. The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection / A.M. Lindsay, M. Zhang, Z. Mitchell et al. // Microbiology. – 2009. – Vol. 155. – No.2. – P. 443-449.
155. Ling, G.V. Interrelations of organism prevalence, specimen collection method, and host age, sex, and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995) / G.V. Ling, C.R. Norris, C.E. Franti et al. // Journal of Veterinary Internal Medicine. – 2001. – Vol. 15. – No.4. – P. 341-347.
156. Linhares, I. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009) / Linhares, I., T. Raposo, A. Rodrigues et al. // BMC Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 13. – P. 19.
157. Liu, Y.C. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis / Y.C. Liu, D.L. Cheng, C.L. Lin // Archives of Internal Medicine. – 1986. – Vol. 146. – No.10. – P. 1913-1916.
158. Liu, Y.M. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China / Y.M. Liu, B.B. Li, Y.Y. Zhang et al. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2014. – Vol. 58. – No.9. – P. 5379-5385.
159. Llobet, E. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptidedependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors / E. Llobet, M.A. Campos, P. Gimenez et al. // Infection and Immunity. – 2011. – Vol. 79. – P. 3718-3732.
160. Llobet, E. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides / E. Llobet, J.M. Tomas, J.A. Bengoechea // Microbiology. – 2008. – Vol. 154. – P. 3877-3886.
161. Loc-Carrillo, C. Pros and cons of phage therapy / C. Loc-Carrillo, S.T. Abedon // Bacteriophage. – 2011. – Vol. 1. – No.2. – P. 111-114.

162. Lu, T.K. Engineered Bacteriophage Targeting Gene Networks as Adjuvants for Antibiotic Therapy / T.K. Lu, J.J. Collins // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2009. – Vol. 106. – No.12. – P. 4629-4634.
163. Lu, T.K. The next generation of bacteriophage therapy / T.K. Lu, M.S. Koeris // Current Opinion in Microbiology. – 2011. – Vol. 14. – No.5. – P. 524-531.
164. Lukashin, A.V. GeneMark.hmm: new solutions for gene finding / A.V. Lukashin, M. Borodovsky // Nucleic Acids Research. – 1998. – Vol. 26. – No.4. – P. 1107-1115.
165. Ma, L.C. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection / L.C. Ma, C.T. Fang, C.Z. Lee et al. // The Journal of Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 192. – No.1. – P. 117-128.
166. Machida, Y. Structure and function of a novel coliphage-associated sialidase / Y. Machida, K. Miyake, K. Hattori et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2000. – Vol. 182. – No.2. – P. 333-337.
167. Majkowska-Skrobek, G. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy / G. Majkowska-Skrobek, A. Łątka, R. Berisio et al. // Viruses. – 2016. – Vol. 8. – No.12. – P. E324.
168. Mavrich, T.N. Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome / T.N. Mavrich, G.F. Hatfull // Nature Microbiology. – 2017. – Vol. 2. – P. 17112.
169. McCabe, R. Invasive *Klebsiella pneumoniae* infections, California, USA / R. McCabe, L. Lambert, B. Frazee // Emerging Infectious Diseases. – 2010. – Vol. 16. – No.9. – P. 1490-1491.
170. McMahon, S.A. Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance / S.A. McMahon, G.A. Roberts, K.A. Johnson et al. // Nucleic Acids Research. – 2009. – Vol. 37. – No.15. – P. 4887-4897.
171. Miethke, M. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control / M. Miethke, M.A. Marahiel // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2007. – Vol. 71. – No.3. – P. 413-451.
172. Migueis, S. Efficacy of LISTEX P100 at Different Concentrations for Reduction of *Listeria monocytogenes* Inoculated in Sashimi / S. Migueis, C. Saraiva, A. Esteves // Journal of Food Protection. – 2017. – Vol. 80. – No.12. – P. 2094-2098.
173. Moranta, D. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells / D. Moranta, V. Regueiro, C. March et al. // Infection and Immunity. – 2010. – Vol. 78. – No.3. – P. 1135-1146.

174. Mushtaq, N. Prevention and cure of systemic *E. coli* K1 infection by modification of the bacterial phenotype / N. Mushtaq, M.B. Redpath, J.P. Luzio et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – No.5. – P. 1503-1508.
175. Nassif, X. Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin / X. Nassif, P.J. Sansonetti // *Infection and Immunity*. – 1986. – Vol. 54. – No.3. – P. 603-608.
176. Nathan, C. Antibiotic resistance- problems, progress and prospects / C. Nathan, O. Cars // *The New England Journal of Medicine*. – 2014. – Vol. 371. – No.19. – P. 1761-1763.
177. Nikaido, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited / H. Nikaido // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67. – No.4. – P.593-656.
178. Ørskov, I. New *Klebsiella* capsular antigen K82 and the deletion of five of those previously assigned / I. Ørskov, M.A. Fife-Asbury // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1977. – Vol. 27. – No.4. – P. 386-387.
179. Paczosa, M.K. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense / M.K. Paczosa, J. Mecsas // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2016. – Vol. 80. – No.3. – P. 629-661.
180. Pan, Y.J. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing / Y.J. Pan, T.L. Lin, Y.H. Chen et al. // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – No.12. – P. e80670.
181. Pan, Y.J. Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment / Y.J. Pan, T.L. Lin, Y.T. Lin et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2015. – Vol. 59. – No.2. – P. 1038-1047.
182. Pan, Y.J. *Klebsiella* phage ϕ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types / Y.J. Pan, T.L. Lin, C.C. Chen et al. // *Journal of Virology*. – 2017. – Vol. 91. – No.6. – P. e02457-16.
183. Parmar, K.M. Control of Multidrug-Resistant Gene Flow in the Environment Through Bacteriophage Intervention / K.M. Parmar, Z.J. Hathi, N.A. Dafale // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2017. – Vol. 181. – No.3. – P. 1007-1029.
184. Pedulla, M.L. Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes / M.L. Pedulla, M.E. Ford, J.M. Houtz et al. // *Cell*. – 2003. – Vol. 113. – No.2. – P. 171-182.
185. Peirano, G. Population-based surveillance for hypermucoviscosity *Klebsiella pneumoniae* causing community-acquired bacteremia in Calgary, Alberta / G. Peirano, J.D. Pitout, K.B. Laupland et al. // *Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 24. – No.4. – P. e61-4.

186. Pieroni, P. The use of bacteriophages to differentiate serologically cross-reactive isolates of *Klebsiella pneumoniae* / P. Pieroni, R. P. Rennie, B. Ziola et al. // *Journal of Medical Microbiology*. – 1994. – Vol. 41. – P. 423–429.
187. Pinto-Tomas, A.A. Symbiotic nitrogen fixation in the fungus gardens of leaf-cutter ants / A.A. Pinto-Tomas, M.A. Anderson, G. Suen et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 326. – No.5956. – P. 1120-1123.
188. Pires, D.P. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications / D.P. Pires, H. Oliveira, L.D. Melo et al. // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2016. – Vol. 100. – No.5. – P. 2141-2151.
189. Pisharath, H.R. Septicemia and peritonitis in a colony of common marmosets (*Callithrix jacchus*) secondary to *Klebsiella pneumoniae* infection / H.R. Pisharath, T.K. Cooper, A.K. Brice et al. // *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*. – 2005. – Vol. 44. – No.1. – P. 35-37.
190. Podschun, R. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors / R. Podschun, U. Ullmann // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1998. – Vol. 11. – No.4. – P. 589-603.
191. Pomakova, D.K. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and underrecognized pathogenic variant / D.K. Pomakova, C.B. Hsiao, J.M. Beanan et al. // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 31. – No.6. – P. 981-989.
192. Potera, C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance / C. Potera // *Environmental Health Perspectives*. – 2013. – Vol. 121. – No.2. – P. a48–a53.
193. Prigent, M. A diversity of bacteriophage forms and genomes can be isolated from the surface sands of the Sahara Desert. / M. Prigent, M. Leroy, F. Confalonieri et al. // *Extremophiles*. – 2005. – Vol. 9. – No.4. – P. 289-296.
194. Qureshi, Z.A. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens / Z.A. Qureshi, D.L. Paterson, B.A. Potoski et al. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 56. – No.4. – P. 2108-2113.
195. Raymond, K.N. Enterobactin: an archetype for microbial iron transport / K.N. Raymond, E.A. Dertz, S.S. Kim // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 100. – No.7. – P. 3584-3588.
196. Razmyar, J. An outbreak of yolk sac infection and dead-in-shell mortality in common canary (*Serinus canaria*) caused by *Klebsiella pneumoniae* / J. Razmyar, A.H. Zamani // *Iranian Journal of Veterinary Research*. – 2016. – Vol. 17. – No.2. – P. 141-143.

197. Restrepo, M.I. Comparison of the bacterial etiology of early-onset and lateonset ventilator-associated pneumonia in subjects enrolled in 2 large clinical studies / M.I. Restrepo, J. Peterson, J.F. Fernandez et al. // *Respiratory Care*. – 2013. – Vol. 58. – No.7. – P. 1220-1225.
198. Reyes, A. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut / A. Reyes, N.P. Semenkovich, K. Whiteson et al. // *Nature Reviews Microbiology*. – 2012. – Vol. 10. – No.9. – P. 607-617.
199. Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE / L.B. Rice // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2008. – Vol. 197. – No.8. – P. 1079-1081.
200. Rodrigue, S. Whole genome amplification and de novo assembly of single bacterial cells / S. Rodrigue, R.R. Malmstrom, A.M. Berlin et al. // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – No.9. – P. e6864.
201. Rohwer, F. The Phage Proteomic Tree: A Genome-Based Taxonomy for Phage / F. Rohwer, R. Edwards // *Journal of Bacteriology*. – 2002. – Vol. 184. – No.16. – P. 4529-4535.
202. Rose, T. Experimental phage therapy of burn wound infection: difficult first steps / T. Rose, G. Verbeken, D.D. Vos et al. // *International Journal of Burns and Trauma*. – 2014. – Vol. 4. – No.2. – P. 66-73.
203. Rossolini, G.M. Extensively drug-resistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: an emerging challenge for clinicians and healthcare systems / G.M. Rossolini // *Internal Medicine Journal*. – 2015. – Vol. 277. – No.5. – P. 528-531.
204. Russo, T.A. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* / T.A. Russo, R. Olson, U. Macdonald et al. // *Infection and Immunity*. – 2014. – Vol. 82. – No.6. – P. 2356-2367.
205. Russo, T.A. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae ex vivo* and *in vivo* / T.A. Russo, R. Olson, U. MacDonald et al. // *Infection and Immunity*. – 2015. – Vol. 83. – No.8. – P. 3325-3333.
206. Sahly, H. Impairment of respiratory burst in polymorphonuclear leukocytes by extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* / H. Sahly, H. Aucken, V.J. Benedi et al. // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2004. – Vol. 23. – No.1. – P. 20-26.
207. Sahly, H. Recognition of bacterial surface polysaccharides by lectins of the innate immune system and its contribution to defense against infection: the case of pulmonary pathogens /

- H. Sahly, Y. Keisari, E. Crouch et al. // *Infection and Immunity*. – 2008. – Vol. 76 – No.4. – P. 1322-1332.
208. Saitou, N. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // *Molecular Biology and Evolution*. – 1987. – Vol. 4. – No.4. – P. 406-425.
209. Schmid, J. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies / J. Schmid, V. Sieber, B. Rehm // *Frontiers in Microbiology*. – 2015. – Vol. 6. – P. 496.
210. Seguel, M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in California Sea Lions (*Zalophus californianus*): Pathologic Findings in Natural Infections / M. Seguel, N.L. Gottdenker, K. Colegrove et al. // *Veterinary Pathology*. – 2017. – Vol. 54. – No.5. – P. 846-850.
211. Sertic, V. Untersuchungen iiber einen Lysinonen bildenden Bakteriophagen / V. Sertic // *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene*. – 1929 – No.110. – P. 125-139.
212. Shankar, C. Draft genome sequences of three hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from bacteremia / C. Shankar, L.E.B. Nabarro, N.K.D. Ragupathi et al. // *Genome Announcements*. – 2016. – Vol. 4. – No.6. – P. e01081-16.
213. Sherman, J.D. Changing trends in the casuistics of hepatic abscess / J.D. Sherman, S.L. Robbins // *The American Journal of Medicine*. – 1960. – Vol. 28. – P. 943-950.
214. Shin, J. Single origin of three plasmids bearing blaCTX-M-15 from different *Klebsiella pneumoniae* clones / J. Shin, K. Soo Ko // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. - 2014. – Vol. 69. – No.4. – P. 969-972.
215. Shon, A.S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed / A.S. Shon, R.P. Bajwa, T.A. Russo // *Virulence*. – 2013. – Vol. 4. – No.2. – P. 107-118.
216. Sillankorva, S. *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiIBB-PF7A / S. Sillankorva, P. Neubauer, J. Azeredo // *BMC Biotechnology*. – 2008. – Vol. 8. – P. 79.
217. Silpa-Archa, S. Culture-Positive Endogenous Endophthalmitis: An Eleven-Year Retrospective Study in the Central Region of Thailand / S. Silpa-Archa, A. Ponwong, J.M. Preble et al. // *Ocular Immunology and Inflammation*. – 2018. – Vol. 26. – No.4. – P. 533-542.
218. Siu, L.K. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome / L.K. Siu, K.M. Yeh, J.C. Lin et al. // *The Lancet Infectious Diseases*. – 2012. – Vol. 12. – No.11. – P. 881-887.
219. Slopek, S. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986 / S. Slopek, B. Weber-Dabrowska, M. Dabrowski et al. // *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. – 1987. – Vol. 35. – No.5. – P. 569-583.
220. Soding, J. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction / J. Soding, A. Biegert, A. N. Lupas // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – Vol. 33. – P. 244-248.

221. Spricigo, D.A. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry / D.A. Spricigo, C. Bardina, P. Cortés et al. // International Journal of Food Microbiology. – 2013. – Vol. 165. – No.2. – P. 169-174.
222. Srinivasiah, S. Phages across the biosphere: contrasts of viruses in soil and aquatic environments / S. Srinivasiah, J. Bhavsar, K. Thapar et al. // Research in Microbiology. – 2008. – P. 159. – No.5. – P. 349-357.
223. Stroj, L. Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn / L. Stroj, B. Weber-Dabrowska, K. Partyka et al. // Neurol. Neurochir. Pol. – 1999. – Vol. 33. – No.3. – P. 693-698.
224. Struve, C. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / C. Struve, C.C. Roe, M. Stegger et al. // mBio. – 2015. – Vol. 6. – No.4. – P. e00630-15.
225. Stummeyer, K. DEvolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages / K. Stummeyer, D. Schwarzer, H. Claus et al. // Molecular Microbiology. – 2006. – Vol. 60. – No.5. – P. 1123-1135.
226. Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy / A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, J.G. Morris // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2001. – Vol. 45. – No.3. – P. 649-659.
227. Sullivan, M.J. Easyfig: a genome comparison visualizer / M.J. Sullivan, N.K. Petty, S.A. Beatson // Bioinformatics. – 2011. – Vol. 27. – No.7. – P. 1009-1010.
228. Surgers, L. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France / L. Surgers, A. Boyd, P.M. Girard et al. // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 22. – No.9. – P. 1687-1688.
229. Thompson, J.E. The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism / J.E. Thompson, M. Pourhossein, A. Waterhouse et al. // The Journal of Biological Chemistry. – 2010. – Vol. 285. – No.31. – P. 23963-23969.
230. Toenniessen, E. Über Vererbung und Variabilität bei Bakterien mit besonderer Berücksichtigung der Virulenz / E. Toenniessen // Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. - 1914. – Vol. 73. – P. 241-277.
231. Trevisan, V. Caratteri di alcuni nuovi generi di Batteriaceae (Characteristics of some new genera of Bacteriaceae) / V. Trevisan // Atti. Accad. Fis.-Med.-Stat. – 1885. – No.3. – P. 92-106.
232. Trevisan, V. Sul micrococco della rabia e sulla possibilità di riconoscere durante il periodo d'incubazione, dall'esame del sangue della persona morsicata, se ha contratta l'infezione rabbica / V. Trevisan // R. C. Ist. Lombardo. – 1887. – No.20. – P. 88-105.
233. Tsay, R.W. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes

- as a herald for community-acquired infection / R.W. Tsay, L.K. Siu, C.P. Fung et al. // Archives of Internal Medicine. – 2002. – Vol. 162. – No.9. – P. 1021-1027.
234. Turton, J.F. Evaluation of a multiplex PCR for detection of serotypes K1, K2 and K5 in *Klebsiella sp.* and comparison of isolates within these serotypes / J.F. Turton, H. Baklan, L.K. Siu et al. // FEMS Microbiology Letters. – 2008. – Vol. 284. – No.2. – P. 247-252.
235. Turton, J.F. Genetically similar isolates of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing liver abscesses in three continents / J.F. Turton, H. Englender, S.N. Gabriel et al. // Journal of Medical Microbiology. – 2007. – Vol. 56. – P. 593-597.
236. Twenhafel, N.A. Multisystemic abscesses in African green monkeys (*Chlorocebus aethiops*) with invasive *Klebsiella pneumoniae*-identification of the hypermucoviscosity phenotype / N.A. Twenhafel, C.A. Whitehouse, E.L. Stevens et al. // Veterinary Pathology. – 2008. – Vol. 45. – No.2. – P. 226-231.
237. Twort, F.W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses / F.W. Twort // The Lancet. – 1915. – Vol. 186. – P. 1241-1243.
238. Van Boeckel, T.P. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data / T.P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok et al. // The Lancet Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 14. – No.8. – P. 742-750.
239. Vandeveld, A. On a Boat: A Case in Australia of Endophthalmitis and Pyogenic Liver, Prostatic, and Lung Abscesses in a Previously Well Patient due to *Klebsiella pneumoniae* / A. Vandeveld, B. Stepanovic // Case Reports in Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 2014. – P. 137248.
240. Verma, V. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment / V. Verma, K. Harjai, S. Chhibber // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – Vol. 64. – No.6. – P. 1212-1218.
241. Verma, V. Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae* / V. Verma, K. Harjai, S. Chhibber // Biofouling. – 2010. – Vol. 26. – No.6. – P. 729-737.
242. Vinodkumar, C.S. Bacteriophage in the treatment of experimental septicemic mice from a clinical isolate of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* / C.S. Vinodkumar, Y.E. Neelagund, S. Kalsurmath // The Journal of Communicable Diseases. – 2005. – Vol. 37. – No.1. – P. 18-29.
243. VirusTaxonomy: 2015 Release [Электронный ресурс] Режим доступа: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/?Redirected=true>.

244. Vogels, G.D. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms / G.D. Vogels, C. Van der Drift // *Bacteriological Reviews*. - 1976. – Vol. 40. – No.2. – P. 403-468.
245. Wang, L. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils / L. Wang, D. Shen, H. Wu et al. // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – No.3. – P. e0173638.
246. Weigele, P.R. Homotrimeric, beta-stranded viral adhesins and tail proteins / P.R. Weigele, E. Scanlon, J. King // *Journal of Bacteriology*. – 2003. – Vol. 185. – No.14. – P. 4022-4030.
247. Weinbauer, M.G. Are viruses driving microbial diversification and diversity? / M.G. Weinbauer, F. Rassoulzadegan // *Environmental Microbiology*. – 2004. – Vol. 6. – No.1. – P.1-11.
248. Whitfield, C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli* / C. Whitfield // *Annual Review of Biochemistry*. – 2006. – Vol. 75. – P. 39-68.
249. World Health Organization Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) Annual report 2017 [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0005/354434/WHO_CAESAR_AnnualReport_2017.pdf?ua=1.
250. World Health Organization Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Электронный ресурс] Режим доступа: http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
251. Wittebole, X. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens / X. Wittebole, S. De Roock, S.M. Opal // *Virulence*. – 2014. – Vol. 5. – No.1. – P. 226-235.
252. Wolcott, R. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a Phase I safety trial / R. Wolcott, D. Rhoads, M. Kuskowski et al. // *Journal of Wound Care*. – 2009. – Vol. 18. – No.6. – P. 237-243.
253. Wommack, K.E. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems / K.E. Wommack, R.R. Colwell // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2000. – Vol. 64. – No.1. – P. 69-114.
254. Wright, A. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy / A. Wright, C.H. Hawkins, E.E. Anggård et al. // *Clinical Otolaryngology*. – 2009. – Vol. 34. – No.4. – P. 349-357.
255. Yan, J. Allocation of *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates into four distinct groups by ompK36 typing in a Taiwanese university hospital / J. Yan, P.X. Zheng, M.C. Wang et al. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2015. – Vol. 53. – No.10. – P. 3256-3263.

256. Yan, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications / J. Yan, J. Mao, J. Xie // *BioDrugs*. – 2014. – Vol. 28. – No.3. – P. 265-274.
257. Yeoh, K.G. Tropical liver abscess / K.G. Yeoh, I. Yap, S.T. Wong et al. // *Postgraduate Medical Journal*. – 1997. – Vol. 73. – No.856. – P. 89-92.
258. Yokoyama, T. Pyogenic liver abscess / T. Yokoyama, E. Hiyama, Y. Imamura // *Ryoikibetsu Shokogun Shirizu*. – 1995. – Vol. 7. – No.7. – P. 39-42.
259. Yu, W.L. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes / W.L. Yu, W.C. Ko, K.C. Cheng et al. // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2008. – Vol. 62. – No.1. – P. 1-6.
260. Yu, W.L. Polymerase chain reaction analysis for detecting capsule serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* causing abscesses of the liver and other sites / W.L. Yu, C.P. Fung, W.C. Ko et al. // *The Journal of Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 195. – No.8. – P. 1235-1236.
261. Zhan, L. Outbreak by Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 Isolates with Carbapenem Resistance in a Tertiary Hospital in China / L. Zhan, S. Wang, Y. Guo et al. // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 182.
262. Zhang, Y.W. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China / Y.W. Zhang, J. Zeng, W. Liu et al. // *Journal of Infection*. – 2015. – Vol. 71. – No.5. – P. 553-560.
263. Zhao, J. Multilocus sequence types and virulence determinants of hypermucoviscosity-positive *Klebsiella pneumoniae* isolated from community-acquired infection cases in Harbin, North China / J. Zhao, J. Chen, M. Zhao et al. // *Japanese Journal of Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 69. – No.5. – P. 357-360.
264. Zhu, H. Characterization of polynucleotide kinase/phosphatase enzymes from Mycobacteriophage omega and Cjw1 and vibriophage KVP40 / H. Zhu, S. Yin, S. Shuman // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279. – No.25. – P. 26358-26369.
265. Zou, L. Phenotypic and genotypic characterization of β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from swine / L. Zou, H. Wang, B. Zeng et al. // *Veterinary Microbiology*. – 2011. – Vol. 149. – No.1-2. – P. 139-46.

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 К-1 / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, А.И. Князева, В.В. Вережкин, 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. Вережкин, 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 К1 и К2 / Е.В. Комисарова, В.П. Мякина, В.М. Красильникова, В.В. Вережкин, 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. Вережкин, **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. Вережкин, 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 K2. 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.