

**BOOK OF ABSTRACTS
МАТЕРИАЛЫ КОНФЕРЕНЦИИ**



**September 24–26, 2018
Nizhny Novgorod, Russia**

**24–26 сентября 2018 года
Нижний Новгород, Россия**

Fourth International
Scientific Conference

Четвертая научно-практическая конференция
с международным участием

БАКТЕРИОФАГИ

**Theoretical and Practical
Aspects of Their Application
in Medicine, Veterinary
and Food**

БАКТЕРИОФАГИ

**Теоретические и практические
аспекты применения
в медицине, ветеринарии
и пищевой промышленности**

Organizers

- Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing
- Federal Budget Institution of Science «G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology»
- Federal Budget Institution of Science «State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology»
- Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology»
- Federal Budget Institution of Science «I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology»
- P.A. Stolypin Ulyanovsk State Agrarian University
- Noncommercial partnership for assistance to development of research and practical use of bacteriophages «National Society for Bacteriophage Research»

Organizing committee

Chairman

A.Yu. Popova DSc in medicine, professor, head of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Co Chairman

S.Yu. Kombarova DSc in biology, acting director of G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

I.A. Dyatlov DSc in medicine, professor, full member of Russian Academy of Sciences, director of State Scientific Centre for Applied Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

V.G. Akimkin DSc in medicine, professor, full member of Russian Academy of Sciences, director of Central Research Institute for Epidemiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

E.I. Efimov DSc in medicine, professor, director of I.N. Blokhina Nizhniy Novgorod Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

V.A. Aleshkin DSc in biology, professor, scientific director of G.N.Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

Members of Organizing Committee

A.V. Aleshkin
V.P. Bondarev
N.I. Briko
E.B. Brusina
N.F. Brusnigina
D.A. Vasil'ev
G.I. Grigor'eva

V.V. Zverev
L.P. Zueva
O.V. Kovalishena
V.N. Krylov
E.A. Svetoch
E.P. Sel'kova
I.V. Soloveva

V.A. Tutel'yan
A.V. Tutel'yan
I.V. Feldblyum
D.A. Shagin
I.V. Shestakova
V.V. Shkarin
N.A. Yushchuk

Scientific Committee of the Conference

Stephen T. Abedon
Andrey Aleshkin
Dmitriy Vasil'ev
Nikolay Volozhantsev

Martha Clokie
Krystyna Dąbrowska
Betty Kutter
Rob Lavigne

Petr Leiman
Andrey Letarov
Konstantin Miroshnikov
Alexander Sulakvelidze

Congress operator

Medical Marketing Agency

Организаторы конференции

- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)
- Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского)
- Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ПМБ)
- Федеральное бюджетное учреждение науки Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (ФБУН ЦНИИЭ)
- Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора (ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной)
- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А.Столыпина» Минсельхоза России (ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ)
- Некоммерческое партнерство содействия развитию научных исследований и практического применения бактериофагов «Национальное общество исследователей бактериофагов»

Организационный комитет конференции

Председатель

Попова А.Ю. Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, д.м.н., профессор

Заместители председателя

Комбарова С.Ю. Врио директора ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, д.б.н.

Дятлов И.А. Директор ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Акимкин В.Г. Директор ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Ефимов Е.И. Директор ФБУН ННИИЭМ им. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора д.м.н., профессор

Алешкин В.А. Научный руководитель ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, д.б.н., профессор

Члены оргкомитета

Алешкин А.В.
Бондарев В.П.
Брико Н.И.
Брусина Е.Б.
Бруснигина Н.Ф.
Васильев Д.А.
Григорьева Г.И.

Зверев В.В.
Зуева Л.П.
Ковалишена О.В.
Крылов В.Н.
Светоч Э.А.
Селькова Е.П.
Соловьева И.В.

Тутельян В.А.
Тутельян А.В.
Фельдблюм И.В.
Шагин Д.А.
Шестакова И.В.
Шкарин В.В.
Ющук Н.Д.

Научный комитет конференции

Stephen T. Abedon
Андрей Алешкин
Krystyna Dąbrowska
Дмитрий Васильев

Martha Clokie
Николай Воложанцев
Elizabeth Kutter
Андрей Летаров

Alexander Sulakvelidze
Petr Leiman
Константин Мирошников
Rob Lavigne

Технический организатор

Медицинское Маркетинговое Агентство

Book of abstracts

**Fourth International
Scientific Conference**

BACTERIOPHAGES:

**Theoretical and Practical Aspects
of Their Application in Medicine,
Veterinary and Food**

to the 70th Anniversary of professor V.A. Aleshkin

Moscow
Medical Marketing Agency
2018

Материалы

**Четвертой научно-практической конференции
с международным участием**

БАКТЕРИОФАГИ:

**теоретические и практические аспекты
применения в медицине, ветеринарии
и пищевой промышленности**

к 70-летию профессора В.А. Алешкина

Москва
Медицинское Маркетинговое Агентство
2018

УДК 578.347(082)
ББК 28.3я4
Б19

Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы 4-ой научно-практической конференции с международным участием: к 70-летию профессора В.А. Алёшкина, Нижний Новгород, 24–26 сентября / Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.] – Москва : Медицинское Маркетинговое Агентство, 2018 – 76 с. – На англ. и рус. яз.
ISBN 978-5-9905908-3-0

Члены Научного комитета конференции приняли единогласное решение о публикации тезисов докладов на русском и английских языках.

Мероприятие проводится при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Проект №18-04-20080.

Members of the Scientific Committee of the Conference decided unanimously to publish the abstracts in Russian and English.

The event is sponsored by the Russian Foundation for Basic Research, Project № 18-04-20080.

УДК 578.347(082)
ББК 28.3я4

Comparative analysis of converting prophages of Siphoviridae in genomes of *Staphylococcus aureus* strains isolated during staphylococcal outbreaks in Russia

Abaev I.V., Skryabin Yu.P., Kislichkina A.A., Korobova O.V., Bogun A.G., Dyatlov I.A.

Federal Budget Institution of Science State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (FBIS SRCAMB), Obolensk, Russia

Moderate bacteriophages and lysogenic conversion associated with some virulence factors play an important role in the evolution of pathogenic bacteria. Phage conversion produces a specific phenotype of *Staphylococcus aureus* strains, etiological agents of staphylococcal poisoning. Full-genomic data for *S. aureus* strains isolated in Russia and related with staphylococcal toxic infections have made it possible to conduct a comparative study of converting prophages structure, taking into account clinical and epidemiological information. The aim of the study is to establish the specific features of the nucleotide sequences of the Siphoviridae family prophages associated with neonatal exfoliative dermatitis and foodborne toxic infections. The results of the full genome sequencing of 36 *S. aureus* strains isolated during outbreaks of exfoliative dermatitis of newborns and foodborne infections in 2013–2016 in Russia were used for the study. Regions of possible prophages in *S. aureus* genomes were determined using the PHASTER service. Based on the definition of integration sites and integrase genes, full-length sequences of two different types of the Siphoviridae family prophages associated with the production of exfoliative toxin A and enterotoxin A have been identified. Each type of prophage includes several structural variants. A comparative phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the converting prophages using the full genomic sequences of *S. aureus* presented in GenBank is carried out. Three variants of the nucleotide structure of prophages encoding exfoliative toxin A gene and specific for the clonal complexes of *S. aureus* 121, 15 and 8 have been identified. Two variants of prophages encoding the enterotoxin A gene and associated with clonal complexes of *S. aureus* 1 and 30 have been revealed. It is shown that the nucleotide sequence of the prophages coding for the enterotoxin A gene is highly conserved within the structural variants associated with some clonal lines of *S. aureus*.

This work was supported by Rosпотребнадзор sectoral program.

Prophages in genome composition of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates

Alekseeva A.E.¹, Brusnigina N.F.¹, Gordinskaya N.A.²

¹I.N. Blokhina Nizhniy Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russia;

²Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

The characterization of prophages found in the genome of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence-type 395 clinical isolates is the purpose of this study.

Whole-genome sequencing of the three *Klebsiella* isolates was performed on a MiSeq instrument using the Nextera XT kit for the preparation of DNA libraries. De novo alignment and assembly of nucleotide sequences were performed by SPAdes program. The genome annotations were made by RAST server. BLASTN and BLASTP services were used for search of prophages homologous sequences.

Several sites containing prophage sequences in the genome of the investigated *K. pneumoniae* strains, were found. The same set and composition of prophages in two isolates were detected, in particular, each isolate had 5 prophage sites, two of which were classified by analysis of the structure of the capsid protein as P2-like phages of the Myoviridae family, and three as HK97-like belonging to the Siphoviridae family. Prophages nucleotide sequence comparative analysis was revealed a high level of their similarity. The complete identity of the first pair of P2-like prophages with the prophage of *K. pneumoniae* strain Goe 62629 (NZ_CP018364.1) was detected, the second pair is represented by conservative P2-like prophages present in the genome of more than 50 *Klebsiella* strains deposited in the RefSeq NCBI database. The third pair of HK97-like prophages has the highest level of identity (98%) with the prophage of *K. pneumoniae* k2254 strain (NZ_FLFR01000017.1), the coverage level was 82%. A fourth pair of HK97-like prophages is characterized by only 99% identity as between the isolates and the prophage of the *K. pneumoniae* strain Goe 62629. The fifth pair of HK97-like prophages with a full identity has a 99% similarity with the prophage sequence of the strain *K. pneumoniae* isolate 23 (NZ_CP016926.1). The third *K. pneumoniae* strain contains only 2 sites of P2 and HK97-like prophages sequences with 99–100% identity of the nucleotide sequences of the prophages of the first two investigated *K. pneumoniae* isolates (the second and fourth pairs of P2 and HK97-like prophages, respectively).

Thus, the investigation of the set and composition of prophages in the bacterial genome broadens the possibilities for typing epidemically significant strains – pathogens of nosocomial infections.

Evaluation of effectiveness of comprehensive correction of violations of the composition of the intestinal microbiota in children bacteriophages, probiotics, lactoglobulin

Aleshukina A.V., Polishchuk I.S., Aleshukina I.S., Goloshva E.V., Tverdokhlebova T.I.

Rostov Scientific Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rostov, Russia

The purpose: to select the scheme of effective correction of infringements of structure of a microbiota of an intestine at children of early age.

Materials and methods. Children were examined (206). The study of the composition of the intestinal microbiota was carried out using differential diagnostic media (Obolensky NPC) in accordance with the OST 2003. Microorganisms were identified on the basis of Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). For correction, the drug lactoglobulin was used against opportunistic bacteria and salmonella (FBUN RostovNII microbiology and parasitology of Rospotrebnadzor (LH-UPBS), bacteriophages (BF) (Microgen), probiotics (Pr) (bifilysis, bifidumbacterin, etc.).

Results and discussion. Design of the study: children were randomized into 4 groups: 1st – children with a slight increase in the content of opportunistic microorganisms (UPM) (24 cases); 2nd – children with increased *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* with altered properties (41 sl.); 3^{ya} – children up to 6 months, with violations of the microbiota of the intestine due to an increase in UPM (70 people); 4th – children older than 6 months with prolonged decompensated intestinal microbiota disorders (71 cases). The first group received the course of the LH-UPBS, then the successive course of Pr. 2nd group-course Bf, then course Pr. 3rd group – the course of LH-UPBS, then BF and next course of Pr. 4th group – a course simultaneously ЛГ-УПБС and Bf and a trace Пр. Identification of *Staphylococcus sp.* in children was accompanied by a decrease in the content of lacto- and bifidobacteria ($44 \pm 2.1\%$ and $96 \pm 0.8\%$, respectively). UPB were associated with *Staphylococcus sp.* in $30,1 \pm 1,9\%$: *Klebsiella sp.* – $17.8 \pm 1.6\%$; *Proteus sp.* – $10.9 \pm 1.3\%$; *Pseudomonas sp.* – $1.4 \pm 0.5\%$. It was found that with the combined use of LH-UPBS and BF, the effectiveness of correction is significantly higher than when using these drugs separately. The use of BF significantly reduced *S. aureus* ($16.5 \pm 1.5\%$ of cases). After correction, $47.2 \pm 2.1\%$ of staphylococci were not detected. At $16.4 \pm 1.5\%$, a second course of treatment was necessary. Stabilization of bifidobacteria and lactobacilli occurred in all children.

Thus, the appointment of an immune preparation of lactoglobulin in combination with bacteriophages and probiotics contributed to the stabilization of the composition of intestinal microbiota in infants at different degrees of severity of disorders.

Diversity phages in Kazakhstan as source for development new therapeutic preparations

Alexyuk P.G., Alexyuk M.S., Turmagambetova A.S., Akanova K.S., Zhumanov Zh.Zh., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.

Institute of microbiology and virology, Almaty, Kazakhstan

The modern approach to the development of new therapeutic preparations against plant, animals and human disease caused by microorganisms is based on the use preparations preventing of microbe reproduction. One of the promising trends in this way is the creation of specific cocktails of bacteriophages against certain types of microbes. Historically, use of such technology is concentrated only in some countries. However, the emergence of new technologies for phage detection and the spread of antibiotic-resistant microorganisms gave a new impetus to the search for alternative strategies for the prevention and control of bacterial infections. The unique geographical situation and large biodiversity within the territory of Kazakhstan puts the country in a strategic position to develop the rational and sustained exploration of new phages of therapeutic value. The extension of the country covers a wide range of climates, soil types, and altitudes, providing a unique set of selective pressures for the adaptation of microorganisms and their accompanying phages in these scenarios. In our studies metagenomic research of microorganisms and their phages of some Kazakhstan water ecotopes was carried out. Representatives of 9 families of bacteriophages were detected. Various types of relationships between phage and host have been established. Symbiotic, neutral and antagonistic relationships are revealed. Of the detected bacteriophage sequences, a variety of lytic phages against tuberculosis, nosocomial infections and a number of other human diseases are of particular interest. Factually all of the explored phages are unique and differ from those described in the international database. In this way, metagenomic studies of viromes from various environmental samples provide information on the species diversity of phages in the ecosystems. In carrying out further research, this information will reduce the time and costs of studying, isolating and cultivating lytic bacteriophages for creating new phage cocktails for fight with microbial diseases and create alternative antibiotic therapy.

Antimicrobial activity of bacteriophage encoded endolysins against Gram-negative bacteria

Antonova N.P.^{1,2}, Usachev E.V.¹, Makarov V.V.¹, Rubalsky E.O.^{3,4}, Kiseleva I.A.³, Zulkarneev E.R.³, Popova A.V.^{5,6,7}, Tkachuk A.P.¹, Gushchin V.A.^{1,2}

¹*N.F.Gamaleya Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;*

²*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

³*Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;*

⁴*Hannover Medical School, Hannover, Germany;*

⁵*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Moscow Region, Russia;*

⁶*Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia;*

⁷*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russia*

The alarming rate of antibiotic resistance is one of the major concerns of contemporary healthcare. The number of bacterial strains with multiple or extensive resistance keeps growing. Some of them do not respond to treatment with otherwise highly effective medications, including drugs of last resort; some become totally resistant “superbugs” causing persistent infections to any used antibiotic.

Phage lysins have a few indisputable advantages over other antimicrobial agents. First, they are selective and attack only certain bacterial species while sparing the normal microbiota. Second, phage lysins ensure rapid lysis as they do not rely on slow metabolic reactions. Therefore, phage lysin-based therapies may not take as much time as standard antibacterial treatments. Third, the risk of developing resistance to phage lysins is low. Phage lysins target specific molecules crucial for the normal life cycle of the host, rendering emergence of a resistant isolate highly improbable as it would have to be accompanied by the massive rearrangement of the bacterial cell wall. Fourth, phage lysins can kill antibiotic-resistant bacterial strains providing a solution to one of the most pressing problems of contemporary healthcare. Fifth, due to their capacity to destabilize the peptidoglycan layer of the cell wall, phage lysins can both kill metabolically active or latently rested cells and access bacterial cells hidden by biofilms.

In frame of the present work we describe a set of synthetic recombinant endolysins belonging to bacteriophages KPP10, Am24, Ap22, ECD7, Si3, St11. We describe its bactericidal activity against panel of laboratory and clinical strains of Gram-negative bacteria. In most of cases we observe 3–4 orders of magnitude decrease of bacteria load. Our findings confirm that lytic properties of phage lysins targeting gram-negative bacteria from both inside and outside the cell can be modified and enhanced by the use of permeabilizing agents. The results of our work are consistent with previously published data on endolysin KZ144 isolated from antipseudomonal bacteriophage phiKZ and endolysin OBPgpLYS that exhibited antimicrobial activity in the presence of permeabilizers. This gives hope for the discovery of therapeutic agents based on recombinant phage lysins that could become a real alternative to antibiotics.

Effect of lytic bacteriophages application on the dynamics of the phage sensitivity of pathogenic and opportunistic bacteria at the individual and group levels on a monkey model

Arshba I.M.¹, Orlov S.V.¹, Rubalskii E.O.^{2,3}, Aleshkin A.V.², Rubalsky O.V.⁴, Agumava A.A.¹, Polyakova V.I.¹, Cherkashina E.V.¹

¹*Research Institute of Medical Primatology, Sochi-Adler, Russia;*

²*G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;*

³*Hannover Medical School, Hannover, Germany;*

⁴*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia*

A number of researches are all over the world aimed at studying the properties of lytic bacteriophages, the mechanisms of phage resistance of bacteria and the development of new phage-containing compositions and preparations. At the same time remains unexplored the influence of mass use of lytic bacteriophages on the state of microecology of biotopes of living organisms, as well as on biological diversity and adaptability of opportunistic and pathogenic bacteria in the environment. Moreover it is necessary for lytic phages studies to select reliable and informative in vivo experimental models of infectious pathology, including the reconstruction of unexplored conditions for a propagation of pathogenic and opportunistic bacteria and specific virulent bacteriophages in the biotopes of the organism, in populations and in the environment with the determination of the dynamics of phage sensitivity of bacteria caused by exogenous virulent bacteriophages. Monkeys are the most reliable model of the physiological and pathological functioning of a human body when interacting with microbiota. Therefore, we began the present research on the phage sensitivity dynamics of most common pathogenic and opportunistic bacteria of *Macaca mulatta* caused by exogenous introduction of virulent bacteriophages in comparison with the level of phage specific DNA in intestine of the primates and the environment at the individual and group levels.

Bacteriophages for the control of *Klebsiella pneumoniae* outbreak in the neonatal intensive care unit

Aslanov B.I., Lubimova A.V., Dolgij A.A.

North-Western State Mechnikov Medical University, Saint-Petersburg, Russia

Background. Health care-associated infections (HAI) are the most frequent adverse event in health-care delivery worldwide. Antibiotic resistance threatens the effective prevention and treatment of an ever-increasing range of HAI caused by bacteria. There is an urgent need to investigate alternative preventive and treatment options while there are still a few antibiotics left. Bacteriophage (phage) therapy, the use of viruses that infect bacteria as antimicrobials, has been championed as a promising alternative to antibiotics.

Klebsiella pneumoniae is an important multidrug-resistant pathogen affecting humans and a major source for HAI associated with high morbidity and mortality due to limited treatment options, especially in newborn intensive care units.

Methods and Materials. Commercial bacteriophage cocktail targeting *Klebsiella pneumoniae* («Sextaphag» produced by «Microgen» company) was orally given over 5 days to patients hospitalized in the neonatal intensive care unit in Saint-Petersburg, Russia.

To assess the ability of the bacteriophage to lyse host bacteria in vitro, spot assays were used on the *Klebsiella pneumoniae* lawn.

Results. The outbreak started with two community cases of pneumonia caused by *K. pneumoniae*. Totally, HAI caused by *K. pneumoniae* were occurred in 15 patients, the rate was 19.0% (95% CI = 11.0–29.4) during the outbreak period.

Common measures to control the outbreak had been unsuccessful. After application of the phage cocktail among newborns, the rate of nosocomial *K. pneumoniae* infections decreased to zero and remained at this level for more than a month of surveillance in the ICU. All treatments were well tolerated. No adverse events were reported.

Conclusion. Presented results clearly demonstrate high efficiency of bacteriophages.

Advantages of phage therapy over the use of antibiotics can be framed in terms of phage properties. Phages have several features that make them potentially attractive antibacterial agents. Bacteriophages are highly specific and very effective in destroying targeted bacteria, have only minimally impact on health-protecting normal flora bacteria, safe and rapidly modifiable to combat the emergence of newly arising bacterial threats.

Antibiotic resistance in Russia: the state of problem and perspectives of control

Azizov I.S.

Smolensk State Medical University,
Institute of Antimicrobial Chemotherapy

The global rise of resistance to antimicrobial agents significantly limits therapeutic options, especially in nosocomial infections. Over the last decade, the role of Gram-positive bacteria (MRS, VRE) in etiology of nosocomial infections has been decreasing while, in contrast, the prevalence of Gram-negative pathogens has been increasing. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and carbapenemase- and extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales, identified by the WHO as level 1 critical priority pathogens, are now the leading cause of nosocomial infections in Russia.

Nowadays, resistance to many antibiotics has reached the irreversible state and cannot be overcome by increasing dosages and combining multiple antimicrobials. The WHO action plan for combating AMR includes the following important points:

1) Developing education programs for medical specialists and community aimed on improving antibiotic prescription and consumption;

2) Providing advanced techniques of antimicrobial therapy and diagnostics;

3) Establishing and improving surveillance systems and infections control practices;

4) Promoting rational use of existing antibiotics, developing new antimicrobials, vaccines and alternative therapies of infections;

5) Developing healthcare programs to improve sanitation and quality of life;

6) Using collaborative and multidisciplinary approaches.

Surveillance of AMR, especially among the critical priority pathogens mentioned above, is essential for controlling resistance spread and selecting optimal antibiotic treatment. According to results of AMR surveillance studies conducted by the IAC and IACMAC, over 50% of nosocomial *P. aeruginosa* and over 60% of nosocomial *A. baumannii* and Enterobacterales isolated in various hospitals in Russia in 2014–2015 exhibit multiple drug resistance (MDR). Furthermore, the resistance rates to carbapenems, the primary antimicrobial class for treating serious nosocomial gram-negative infections, exceed 47% (for both imipenem and meropenem) in *P. aeruginosa*, 67% – in *A. baumannii*, and varies from 3% (for imipenem) to 17% (for ertapenem) in Enterobacterales. Thus, the alarming resistance of major bacterial pathogens urges the need for alternative strategies to combat nosocomial infections. Such strategies for which the evidence of effectiveness is gradually being accumulated include the use of:

1) Lytic bacteriophages and their products, such as lysins,

2) Adjuvants, such as the agents enhancing permeability of bacterial cell-wall structures,

3) Nanomaterials;

4) Probiotics, fecal transplantation;

5) Inhibitors of quorum sensing;

6) Immunotherapeutic agents (e.g. poly- and monoclonal antibodies directly inhibiting bacteria or their virulence factors, as well as host-specific pathways).

The database of receptor-recognizing domains of tail fibers of *Escherichia coli* bacteriophages and their O-antigen specificity

Belalov I.Sh., Letarov A.V.

Winogradsky Institute of Microbiology, Federal Research Center "Biotechnology", Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Multiple antibiotic resistance in bacteria is undermining traditional approaches to treatment of bacterial diseases. Phage therapy is a promising tool to counteract drug resistance. Moreover bacteriophages target only their host species and do not affect symbiotic microflora. On the other hand bacteriophages usually have very narrow serotype specificity. Thus, vast majority of bacterial population is not targeted by a single bacteriophage sample. Rational design of candidate bacteriophages for phage therapy requires detailed knowledge of target serotypes and phage adsorption capabilities. There are almost two hundred types of O-antigen in *Escherichia coli*

alone, which makes experimental investigation of bacteriophage specificity extremely resource and time consuming. Available sequence data in post-genome era allows large scale bioinformatic search for identification of potential tail fibers; receptor-recognizing domains. Using this approach we are conducting the construction of a platform for O-antigen profile specific design of phage preparations. The database of receptor-recognizing domains and corresponding O-antigens complements experimental research on phage therapy in our lab. As a result we can obtain rationally designed phages to target specific serotypes.

This work was supported by Russian Science Foundation, grant № 151500134

Combining transcriptomics and translomics in LUZ19 infected cells to comprehensively understand a phage and its subfamily

Blasdel B., Grenga L., Malone J., Lavigne R.

KU Leuven, Leuven, Belgium

With the other Phikmvvirus genus members, *Pseudomonas* phage LUZ19 is a member of the Autographvirinae subfamily. The Autographvirinae subfamily is currently defined by its members; ability to transcribe their own genes using a distinctive single-subunit RNA polymerase as well as the synteny that can be observed in their genomes, their exclusive use of a single strand for transcription, and their putatively common transcriptional scheme resembling T7. Key to the current understanding of what ties the Autographvirinae together is the remarkable independence of its transcription from host factors achieved through a unique and characteristic transcriptional plan. In T7, strong sigma70 promoters at the beginning of the genome recruit the host RNA polymerase to transcribe early genes involved in shutting down host metabolism as well as the T7 RNA polymerase, which then transcribes middle/late genes. However, RNA Sequencing and Ribosomal sequencing of LUZ19 infected cells appears to indicate that Phikmvvirus members may be more estranged from the other Autographvirinae than previously thought with a more complex transcriptional scheme. Indeed, we can now confirm that in LUZ19 the sigma70 early promoters only have a role in transcribing a single previously unannotated coding sequence. Combining our RNA-Seq and Ribo-Seq data with 2D protein gels in early and late infection; we show how LUZ19 temporally regulates its genome on both a transcriptional and translational level. We also define the ways in which the phage and phage induced stress regulates expression of the host genome on both a transcriptional and translational level.

Analysis of molecular-genetic methods for evaluation of safety of bacteriophages and products of their base

Borisova O.Yu.¹, Rubalskii E.O.^{1,2}, Aleshkin A.V.¹, Zulkarneev E.R.¹, Rubalskii M.O.³

¹*G.N.Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;*

²*Hannover Medical School, Hannover, Germany;*

³*Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia*

The main modern requirements for the genetic characterization of bacteriophage preparations include:

- confirmation of the virulent (lytic) nature of each bacteriophage used in the preparation;
- confirmation of the absence in the genome of bacteriophages of genes coding antibiotic resistance factors and bacterial pathogenicity factors;
- taxonomy determination for each bacteriophage used in the preparation.

The gold standard of molecular-genetic control of bacteriophages is the methods of full genomic sequencing followed by bioinformatic analysis, which allows to define reliably the lytic type of a bacteriophage, define its species identity and confirm the absence of undesirable genes. However, these methods are still too costly to use them in the routine regime in the conditions of permanent isolation of new strains of bacteriophages and use of new host strains. Therefore, we developed a PCR-based approach for the molecular-genetic evaluation of the safety of bacteriophages.

Efficacy of phage re-therapy of experimental Klebsiellosis in mice

Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Myakinina V.P., Verevkin V.V., Krasilnikova V.M., Solovieva E.V., Volozhantsev N.V.

State Research Center Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Bacteriophages are a "weapon" of directed action against bacterial infections. Increasing interest of the researchers and physicians to phages is connected first of all with the search for ways to overcome the drug resistance of bacteria. The natural property of phages to interact specifically with a bacterial cell allows one to avoid a negative effect on the commensal microflora. However, the macroorganism perceives bacteriophages as foreign antigens that activated immune response mechanisms to neutralize them.

The aim of the study was to evaluate the efficacy of the repeated application of the bacteriophage KpV289 for the treatment of lethal recurrent infection in mice caused by *Klebsiella pneumoniae* strain KPM9.

Outbred white mice were used to produce *Klebsiella* infection. In the first stage, the animals were challenged intramuscularly (left thigh) with a culture of the hypermuroid strain KPM9 (4×10^3 CFU). Three hours later, treatment with a phage KpV289 was started. Phage was administered intraperitoneally once daily for five days at 10^8 PFU. Two weeks

after the end of treatment the surviving animals were divided in two equal groups, one of which was infected with a lethal dose of the KPM9 strain again and re-treated with a phage according to the scheme described above.

As a result, it was established that after the first course of phage therapy of experimental klebsiellosis 90% of animals survived. 100% non-treated mice in the control group were dead. Surviving animals were free from the causative agent of the infection. All mice survived after repeated intramuscular infection with culture of *K. pneumoniae* KPM9 and the subsequent course of phage therapy. Bacteriological analysis showed the absence of pathogen in mice. Mice from the non-treatment control group died from 3 to 5 days. After the first course of therapy, the titer of antibodies (IgG) to the phage KpV289 in the mice blood serum ranged from 1 : 800 to 1 : 1600. It increased to 1 : 32 000 – 1 : 512 000 after repeated treatment. It was shown that despite high IgG titers, anti-phage serum did not have a significant neutralizing effect on bacteriophage KpV289 in vitro.

Thus, the bacteriophage KpV289 has a pronounced therapeutic effect both with single and repeated treatment of lethal infection in mice caused by *K. pneumoniae* KPM9.

This work was funded by the Russian Science Foundation (Grant no. 15-15-00058P).

Phage therapy against MDR *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in an infant child. Case Report

Ciubotaru A.¹, Balica I.¹, Rubalskii E.^{2,3}, Chilianu M.¹, Botizatu A.¹, Dogotari V.¹, Frunze D.¹

¹Republican Clinical Hospital «Timofei Mosneaga», Chişinău, Republic of Moldova;

²Hannover Medical School, Hannover, Germany;

³G.N.Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Respiratory bacterial infections lead to serious complications in patients, which can be life threatening in case of a multi-drug resistance (MDR). Antibiotic therapy alone is often unsuccessful due to not only an antibiotic resistance but also a tolerance of bacteria to conventional drugs, as well as because of toxic effects that can occur as side effects of some antibiotics, especially in newborn babies and infants.

The subject of this case report is a 4 months infant with acute enterocolitis, associated with an antibiotic therapy and complicated with a septic pneumonia. MDR *Pseudomonas aeruginosa* was isolated as the causative pathogen. Therapy of the *P. aeruginosa* was challenging due to sepsis and toxic shock syndrome (drug and bacterial toxicity). Later the multiple poliorganic disfunction (MODS) was developed and exacerbated due to the toxicity of the administered drugs.

It was decided to try phage therapy as an alternative to conventional antibacterial therapy.

The personalized phage therapy protocol was used to treat the lung infection caused by the MDR *P. aeruginosa*. Bacteriophage strains from the Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology were

selected and prepared at the Hannover Medical School. Following application of the personalized phage preparation in combination with antibiotics provided complete resolution of the infection with no signs of recurrence.

Characterisation of a hybrid c2/P335 *Lactococcus lactis* bacteriophage

Damnjanovic D., Harvey M., Bridge W.

University of New South Wales, School of Biotechnology and Biomolecular Sciences, Faculty of Science, Sydney, Australia

Lytic bacteriophages pose a serious threat to dairy fermentation processes with 936-, P335- and c2- like phages being the most common to lactococcal starter cultures. Though all three belong to the Siphoviridae family, they do not share significant DNA similarity. This work characterises a newly isolated lytic phage (Ø15(Mo9)) for the strain *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* Mo9), which was shown by multiplex-PCR to contain sequences characteristic of both c2- and P335- type phages. Electron microscopy revealed the phage has a typical prolate capsid morphology defining the phage as a c2- type. Its host range includes *Lactococcus lactis* strains belonging to *cremoris* and *lactis* subspecies, including biovar *diacetyllactis*. The phage was propagated on each of the permissive hosts and genetically characterized by repetitive-PCR to confirm the phage individuality and to explore any host influence on the PCR fingerprints. The c2- group of phages are known to infect *L. lactis* strains using a protein receptor, while non-c2 phages use saccharidic receptors. Multiplex-PCR for the classification of P335 phages was used to investigate the origin of the P335-like element in this c2- type phage. Sequences of the Receptor Binding Protein (RBP)-encoding genes located at the baseplate corresponding to the P335- subgroup II were detected indicating a possibility that Ø15(Mo9) can also use sugars as receptors for binding. A recombination event between the c2 and a P335 species could have originated through sharing of the same bacterial host or by horizontal gene transfer between prophage or plasmid DNA and a lytic phage. Whole genome sequencing and analysis of Ø15(Mo9) is currently underway and should shed further light on origin of this novel hybrid bacteriophage.

Development of the test system for indication and identification of bacteriophages zoatroposagnificant representative of «group *Bacillus cereus*» and «group *Bacillus subtilis*»

Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Mastilenko A.V.

P.A.Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

57 isolates of bacteriophages, 8 – to *Bacillus mycoides*, 1 – to *Bacillus anthracis*, 22 – to *Bacillus subtilis*, 22 – to *Bacillus pumilus* were detached from objects of veterinary-sanitary inspection and selected specific to bacteria *Bacillus cereus*.

It was established that detached bacteriophages are specific within species and do not lyse bacteria of heterologous species, genus and family. Lytic activity of detached phages of *Bacillus cereus* was from 10^{-5} to 10^{-10} by Appellmann method and from $(1,8 \pm 0,4) \times 10^7$ to $(4,0 \pm 1,8) \times 10^{12}$ BFU/ml by agar-layer technique; *Bacillus pumilus* – from 10^{-5} to 10^{-8} and $(1,0 \pm 0,1) \times 10^6$ – $(4,0 \pm 0,3) \times 10^9$ BFU/ml, *Bacillus mycoides* – from 10^{-5} to 10^{-11} and $(2,3 \pm 0,7) \times 10^6$ to $(6,2 \pm 0,8) \times 10^{12}$ BFU/ml, *Bacillus subtilis* – from 10^{-5} to 10^{-8} within the range of $(1,7 \pm 0,3) \times 10^6$ to $(8,0 \pm 0,5) \times 10^9$ BFU/ml, *Bacillus anthracis* – from 10^{-5} to 10^{-7} within the range of $(1,9 \pm 0,1) \times 10^6$ to $(3,0 \pm 0,1) \times 10^8$ BFU/ml. Cumulative percent of phage lysis is *Bacillus cereus* – 89,5%, *Bacillus mycoides* – 100%, *Bacillus anthracis* – 81,8%, *Bacillus subtilis* – 95,0%, *Bacillus pumilus* – 91,0%. Destructive changes of bacillary bacteriophages were observed at its 25–35 minute interlocking with trichloromethan at the ratio 10:1. Thermal effect within the range of 64–78°C during 30 minute lowers lytic activity of studied bacteriophages by 4–6 decades. It was recorded that temperature 80–90°C for studied bacteriophages was critical. Bacteriophage storage, closed in flasks in native state at 2–4°C during 12 months, lowers its lytic activity at average of 2–3, which rehabilitates at 5–6 multiples passaging on indicator crop.

On the basis of data analysis system for PCR-detection in DNA composition of studied bacteriophages of genes, coding toxin *HBL enterotoxin* was developed. During its appliance fragments of virulent gene of enterotoxin bacteria *Bacillus* in bacteriophage genomes *Bacillus cereus* FBC-28, *Bacillus mycoides* FBmyc-4, *Bacillus anthracis* B.a.Rot, *Bacillus subtilis* FBs-16, *Bacillus pumilus* FBm-8 YTCXA series were not discovered.

Parameters of reaction layout of titer phage development were established: concentration of indicator crop, discovered in reaction layout – 10^2 – 10^3 micron/ml, working dilution of bacteriophage – 10^5 – 10^9 BFU/ml; optimal time of exposition – 5–6 hours of cultivation without preliminary growth of studied material.

Indication schemes of bacteriophages *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* are developed by method of reaction of phage titer growth with the use of biopreparations on the basis of detached and selected bacteriophages, which allow to discover bacteria in concentration of 10^3 – 10^4 micron/g of objects of veterinary-sanitary inspection in 26–27 hours.

Selection of cholera bacteriophages for experimental preventive drug

Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Pogozhova M.P.

The Rostov-on-Don antiplague institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

The threat of emergence of large-scale epidemics and the outbreaks of cholera on various continents of the world defines need of continuous monitoring of cholera, prevention of her distribution, emphasizes importance of optimization of modern prevention and therapy.

The World Health Organization recommends preventive measures the including mass vaccination against cholera.

But, vaccine has contraindications: allergy, age, pregnancy and breastfeeding. In spite of the fact that chemoprophylaxis with antibiotics is effective at cholera, collateral reactions to antibiotics are well-known. In the circumstances in prevention of bacterial infections bacteriophages can make an alternative to antimicrobial drugs.

In this regard the purpose of our work was to find perspective cholera bacteriophages for creation of preventive fagovy drug.

We have carried out in vitro assessment of bacteriophages of cholera vibrios from a collection of laboratory of bacteriophages of Rostov-on-Don antiplague institute of Rospotrebnadzor for the purpose of selection of the most effective strains of phages. At selection of phages the following indicators were considered: specificity of lytic action concerning vibrios, the highest reproductive activity, extent of lysis of homologous bacteria, cultivation duration, reproduction speed, sowing doses of bacteria and phages. Studying of properties of phages was carried out by the standard methods. Nutrient mediums for experiments included broth and 0,7%, 1,5% agar of Marten (pH 7,6–7,8).

The work was selected 3 cholera phages, liziruyushchy vibrios of O139 and O1 of a serogruppa of biovar of Classical and El Tor from which the new fagovy composition, in the ratio 1:1:1 is created have been selected. The range of lytic activity of one of phages has the wide range including cholera vibrios of biovar of Classical (64,6%) and El Tor (56%). Range of lytic activity of the second phage extends only to cholera vibrios of a biovar of El Tor, but in high percent (70%). The third bacteriophage has high lytic activity concerning serogruppa O139 V. cholerae (50%).

According to an electronic-microscopic research №1 and №2 cholera bacteriophages belonged to the Podoviridae family, a phage №3 to the Myoviridae family.

Thus, we have shown prospects of development of new phage composition for prevention of cholera. At present, work in this direction continues.

Contribution of Nizhny Novgorod NNRIEM named after academician I.N.Blokhina in fundamental and applied research in the field of creation and application of bacteriophages

Grigoreva G. I., Solovyeva I.V.

Federal Budgetary Institution of Science, Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology (FBIS NNRIEM) named after Academician I.N. Blokhina of Rospotrebnadzor, Nizhny Novgorod, Russia

The history of design and production, study of bacteriophage efficiency, creation of algorithms for their use in diagnostics, treatment and prevention of intestinal infections in the Institute dates back to 1935. At that time, two research topics were planned: "Epidemiological Significance of Aquatic Dysenteric and Typhoid Paratyphoid Bacteriophage" and "Study of Efficiency of Dysenteric Vaccinations and Bacteriophage Preventive Treatment". The first results of the

study were published in 1940. In the same year, a production department with a "Bacteriophage" subdivision was established. On the basis of uterine phages obtained from Moscow and Tbilisi scientific research institutes, production of dysenteric and typhoid bacteriophages was launched. In 1942, based on phages races obtained from the laboratory of Ermolieva Z.I., production of a liquid monophage (choleraic bacteriophage) was set up.

In total, during the Great Patriotic War, more than 56 thousand liters of dysenteric and choleraic bacteriophage were manufactured, which helped to cope with the spread of these infections at the fronts and in the rear. Since the 50s of the last century, in accordance with the main profile of the Institute, etiology of intestinal infections was systematically studied, perception of the role of salmonella, enteropathogenic enteric bacteria and proteus in human pathology was deepened. Thus, the dysenteric bacteriophage quality was improved, and the following bacteriophages were created: Tifimurium Breslaufag (1957), the ABCDE salmonellosis group (1960), and coli-proteus (1959). Their therapeutic, sanitizing and preventive action was studied and shown. In 1975, a tableted dry adapted polyvalent dysenteric bacteriophage with an acid-resistant coating was created, and in 1979 – a tableted salmonella bacteriophage. Phages, like any immunobiological drugs, require constant working with them in order to increase their valence. In this connection, since the 1950s, collections of phage races and pathogenic microorganisms, circulating in the region, have been created and replenished.

Based on the results of fundamental research on the bacterial metabolism study, new nutrient media and cultivation methods were developed at the Institute, in other words, the technological process of production was upgraded. From 1954 to 1987, more than 80 printed works were published, there were defended 2 PhD theses and 7 master's dissertation in the field of development, production technology and study of bacteriophage efficiency.

At present, the Institute conducts studies of the bacteriophage genomes of clinical isolates of enterobacteria and microorganisms that belong to a group of so-called non-fermenting gram-negative bacteria, as well as develops procedures for joint use of author's probiotics and bacteriophages.

Gosty9 – a T5-like phage with a novel receptor specificity

Golomidova A.K.¹, Kulikov E.E.¹, Belalov I.S.¹, Letarov A.V.^{1,2}

¹*Winogradsky Institute of Microbiology, FRC "Fundamentals of biotechnology", RAS, Moscow, Russia;*

²*Biology faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

T5-like phages are able to infect wide range of enterobacterial hosts and usually regarded as good candidates for phage therapy purposes. Infection by T5 phage depends on a irreversible interaction of their central tail fiber adhesin (pb5 protein) with host outer membrane large proteins – cyanocobalamin transporter BtuB (phage BF23 group) and ferrichrome transporter FhuA (T5 group). Using FastTree 2.1 software

and amino acid sequences, we plotted phylogenetic trees for pb5 protein sequences found in all known T5-like phages. Their phylogeny comprises 4 clusters, and the host receptors for two such groups are still unknown. We isolated a novel T59g coliphage that belongs to one of these "unknown" groups and whose pb5 aa sequence is close to that of Salmonella_Shivani phage. Providencia_vB_PreS_PR1 and Proteus_PM135 phages, not available to us, form the other "unknown" group. T59g is able to infect *E. coli* DH5a, and host mutants resistant to T59g infection were isolated.

T59g-resistant mutants gained also resistance to 9g phage characterized in our lab previously (Kulikov et al., 2014), while the mutants selected by their resistance to 9g phage remained sensitive to T59g. This fact indicates that T59g phage employs two different host receptors for infection, one shared with 9g. Comparing full genomic sequences of the wild type host and mutants will enable us to assign a new type of *E. coli* protein receptor for T5-like bacteriophages.

Work supported by RSF grant 15-15-00134P

The use of bacteriophages in treatment of patients with purulent-necrotic diseases of the lungs and pleura

Gostishev V.K., Gorbacheva I.V., Zolotarev D.V., Telyashov A.D.

Federal state autonomous educational institution of higher education I.M.Sechenov first Moscow State Medical University of the ministry of health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

It is very interesting to use bacteriophages in the complex treatment of patients with purulent necrotic diseases of the lungs and pleura in connection with the increase in infections associated with the provision of medical care caused by multi-resistant flora.

From 2013 to 2018 at the hospital. I.V.Davydovsky treated 300 patients with acute and chronic pleural empyema and lung abscess. Of these, 150 patients with pleural empyema, in the treatment program which used programmed thoracoscopic sanitation of the pleural cavity, 52 pleuro-thoracic fistulas and 98 from lung abscesses of different etiologies. The change of autochthonous flora to nosocomial one occurs in 2–3 days with complete replacement by 9 days, and patients with this pathology are treated usually more than 2 weeks or more.

We used a combined preparation of commercial bacteriophages active against nosocomial strains. The combined drug allows you to fight both the main infection and prevent the change of the dominant pathogenic agents in the case of long-time hospitalization. Every day after the sanitation of the pleural cavity through the drainage tube with physiological solution was administered bacteriophage drug at a concentration of 10⁷-200.0 ml with an exposure of about 2 hours. In the future, drainage of the pleural cavity was carried out passively. Antibacterial therapy included antibiotics active against nosocomial flora in combination with enteral administration of bacteriophages if patients were in hospital for more than 3 days.

In the treatment of lung abscesses without communication with the pleural cavity, the drug was administered with bronchial sanitation of no more than 10 ml and from enteral tract. It is possible to use the inhalation method of drug administration, including through the nebulizer. In no case was observed the addition of nosocomial flora from the group *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* and *Escherichia coli* in the application of bacteriophages. The ideal phagotherapy is the use of specific phag types for each hospital, taking into account its in-hospital microbial landscape. The criteria for stopping the use of bacteriophages are stopping the systemic inflammatory reaction, eliminating the source of infection, reducing the level of intrapleural contamination below 10^5 CFU / ml. The total duration of therapy with bacteriophages was on average 10 days.

Short-circulating phages

Hodyra-Stefaniak K., Lahutta K., Dabrowska K.

*Institute of Immunology and Experimental Therapy,
Polish Academy of Sciences, Wrocław, Poland*

Phage engineering is considered a promising approach to construct new molecular carriers, vaccines and other medical tools. Phage potential to be applied to animals and humans for the delivery of drugs or antigens in an efficient way has been demonstrated many times. Administration of phages to humans or to animals expose phages on interactions with immune system that eventually determine phage pharmacokinetics. Phage pharmacokinetics, in turn, determines phage therapeutic effectiveness and outcomes of the application. We studied engineered bacteriophages that presented foreign peptides on their capsids, by evaluating their blood circulation in vivo in animal model. We used eight types of different peptides to modify the wild type phage, each peptide was previously demonstrated as a biologically active one. Presentation was achieved by phage display technique on T4 phage capsid. Analysis of phage pharmacokinetics in vivo in mice revealed that three of tested modifications resulted in rapid elimination of the engineered phages from circulation (in comparison to the control, non-modified phage). We propose to name this phenomenon 'short circulating phages', since it seems in the contrary to the phenomenon of 'long circulating phages' described by Merrill et al. (Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1996). To understand individual pharmacokinetics of engineered phages, immune response elicited by the engineered phages was identified both in the part of innate immune response and adaptive immune response. We found that it was the innate immunity that was responsible for the short circulating phenotype of the engineered phages.

This work was supported by the National Science Centre in Poland (grant no. UMO-2014/13/N/NZ6/03985).

High-throughput technique for induction of staphylococcal prophages from lysogenic strains and determination of their host range

Indráková A., Mašlaňová I., Pantůček R., Doškař J.

Masaryk University, Faculty of Science, Department of Experimental Biology, Brno, Czech Republic

Staphylococci are well-known human and veterinary pathogens, whose phages are intensively studied for their impact on the staphylococcal virulence associated with lysogenic conversion as well as evolution mediated by generalized transduction. Of interest are phages residing in the bacterial genome known as prophages. Nowadays, it is generally accepted their classification by the integrase type associated with possible genes of virulence [1] and by virion head-tail type corresponding to International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) classification [2]. Prophages enhances fitness of the host by carrying virulence genes or aiding to resistance against other phages. Furthermore, the prophages upon induction might create viable phages as well as particles capable of transfer of genetic information such as resistance and virulence genes. Hence it is important to study the biological diversity of the endogenous prophages. The detection of staphylococcal prophages is usually done by UV-light or mitomycin C induction from bacterial suspension in millilitres of volume. However, such approach is laborious, expensive, and time consuming. Therefore, we developed a rapid bacteriophage assay method on 96-well plate combined with host range detection by double layer agar. This method allows screening of staphylococcal strains for endogenous prophages in large scale. The 96-well plate approach was optimized for the *Staphylococcus aureus* and further tested on the set of *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus petrasii* strains. In the obtained lysates novel viable inducible phages were detected and the indicator strains were found by host range testing. In conclusion, this technique enables fast large-scale assessment of the inducible prophage population.

*This work was supported by grants GA18-13064S
and MUNI/A/0824/2017*

[1] Goerke C, et al. Journal of Bacteriology. 2009;191(11):3462-3468

[2] Adriaenssens EM et Brister JR. Viruses. 2017;9(4):70

Dickeya bacteriophage PP35: the structure of bacterial surface polysaccharide provides the infection of the alternative bacterial host

Kabanova A.P.^{1,2}, Shneider M.M.¹, Korzhenkov A.A.³, Miroshnikov K.K.⁴, Zdorovenko E.L.⁵, Toschakov S.V.^{3,4}, Ignatov A.N.², Knirel Yu.A.⁵, Miroshnikov K.A.^{1,2}

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia;

²PhytoEngineering Research Center, Rochachevo, Moscow region, Russia;

³I.Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

⁴Fundamental Biotechnology Federal Research Center, Winogradsky Institute of Microbiology, RAS, Moscow, Russia;

⁵Zelinsky Institute of Organic Chemistry, RAS, Moscow, Russia

The limitations on the use of agricultural antibiotics stimulate the development of alternative strategies to combat plant bacteriosis. The recently evolved virulent phytopathogen *Dickeya solani* is a serious threat for potato growing. The use of bacteriophages to control *D.solani* seems a prospective approach in biocontrol. The presented work characterizes the Myoviridial Limestonevirus PP35, specific to *D.solani* with the genome size of 152048 bp. Similar bacteriophages were isolated during *D.solani* outbreaks in Great Britain, Netherlands, Finland and Poland. The infection host range of PP35 is determined by the function of the tail spike protein gp156. The sequence of this protein is highly conservative in all phages of the Limestonevirus genus specific to *Dickeya*. Mass-spectrometry reveals that recombinant PP35 gp156 degrades the O-polysaccharide of *D. solani* into octameric fragments. The polysaccharide structure, $\rightarrow 2$ - β -D-6-deoxy-D-altrose-(1 \rightarrow), is unique among soft-rot Pectobacteriaceae. However the identical structure was found in the non-pathogenic soil bacteria also susceptible to phage PP35. The alternative bacterial host *Lelliottia* spp. strain F154 was genomically characterized, and several genes responsible for O-polysaccharide biosynthesis identical to *D.solani* were characterized. Non-pathogenic bacteria may play a role in maintaining the threshold population of bacteriophages in soil. Also such bacteria may be used for industrial production of therapeutic bacteriophages.

The project is supported by Russian Science Foundation grant # 16-16-00073

Development of organo-inorganic hybrid coatings with sorbated bacteriophages to reduce the risk of development of medical acquired infections

Kaminsky V.V., Aleshkin A.V., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Efimova O.G., Emelianenko K.A., Emelyanenko A.M., Boinovich L.B.

G.N.Gabrichesky Research Institute For Epidemiology And Microbiology, Moscow, Russia;

A.N.Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

The objectives of this study included the study of the anti-bacterial properties of organo-inorganic hybrid coatings on an aluminum alloy AMg2, including superhydrophilic and superhydrophobic nanostructured metal substrates with the application of bacteriophage particles.

In the course of the experiments bactericidal activity was evaluated ($BA = ((K-Op) / K) \times 100\%$, where BA – bactericidal activity, K – number of colonies on control plates, Op – number of colonies on textured plates) surfaces after artificial contamination of 100 μ l of a bacterial suspension in a titer of 10^7 cfu / ml. To increase the antibacterial effect of the plates, a bacteriophage was adsorbed onto their surface in a titer of 10^9 pfu / ml, an organic solvent was used to fix it on the surface. The titer of bacteria and bacteriophages was determined on days 1, 4 and 6 after contamination.

The original virulent bacteriophages, representatives of the families Podoviridae and Myoviridae, active against the main bacterial species of the causative agents of ISMP: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *A. baumannii* and *P. aeruginosa* were used in the experiment.

As a result of the experiments that simulate the possibility of the spread of ISMP pathogens, it can be concluded that the BA of superhydrophilic surfaces is higher than that of superhydrophobic surfaces, which for 99 *aeruginosa* 3086 was 99% and 45% for the 1st day of the experiment for *A. baumannii* B-05 99% and 0% for the 1st day of the experiment, for *K. pneumoniae* 811 – for the 6 days, 99% and 91%, respectively.

The application of bacteriophage particles does not prevent the primary colonization of textured metal surfaces by the strains used in the experiment, however, in some cases it increases its BA. Thus, in the second series of experiments with *A. baumannii* B-05 and bacteriophage AM24, BA of superhydrophobic surfaces was almost 100% higher by the 6th day of the study, in the experiment with *K. pneumoniae* 811 and phage KpV811 – higher by 7.5% to 6 day, and in the experiment with *P. aeruginosa* 3086 and the bacteriophage PA10 BA is higher by 46% than BA of superhydrophobic plates without sorbed bacteriophages. On superhydrophilic surfaces with a bacteriophage KpV811, BA was equal to 100% by the 4th day, and 99% on coatings without a bacteriophage.

The quantitative model of probiotics interaction with non probiotics and new criteria for synbiotic compositions development

Karetkin B., Evdokimova S., Guseva E., Grosheva V.

D.Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russian Federation

At present the huge number of probiotic strains and a lot of prebiotic ingredients are described. So, to prove the synergistic interaction and the mutual reinforcement of probiotics and prebiotics in synbiotic compositions in vitro tests have to be applied at least in the first stage of development, when the number of combinations is significant. At last time, the co-culturing of probiotic and pathogenic bacteria are used. Nevertheless, the final count of pathogens does not reflect the specific of interaction. The criteria for prebiotic activity are based on comparison of specific growth rates of probiotic and non-probiotic bacteria, and presumably this approach can be applied for synbiotics too. Synbiotic effect can be connected with intensification of metabolites formation. But what the difference in these metabolites action to pathogen growth and how can it be took into account? In this study the yields of short chain fatty acids and the inhibition constants of antagonist growth were combined as the measure of action forces and reaction forces, respectively. This interaction was described by the quantitative model and the model was examined. The oligofructose (Orafti®P95) was used as prebiotic standard. *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703^T was applied as probiotic strain with good growth on oligofructose. *Bacillus cereus* ATCC 9634 and *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824T are not commonly accepted as pathogens, but these strains are characterized with better growth patterns, compared with the most of pathogens. This could be considered as the most important to estimate the competition interactions. The inhibition constants were determined in pure cultures. The experimental data of bacteria count were obtained for two co-culture (bifidobacterium + clostridium and bifidobacterium + bacilli). To examine the model the kinetics of antagonistic bacteria growth was predicated using the experimental data as the parameters of model. Additionally, the model was tested with glucose (as non-prebiotic) and different starting counts of bacilli. The comparison of experimental and calculated data showed good predictive value of the developed model. The criteria for synbiotic effect estimation were derived from the model equations, which allow to compare the action of different synbiotic composition on different pathogens in future. Herewith, the study of the growth kinetics is not necessary.

Present study was sponsored by Russian Science Foundation (Project № 17-79-20365).

The purification of phages for clinical applications

Kiljunen S., Hietala V., Carron A., Horsma-Heikkinen J., Skurnik, M.

Department of Bacteriology and Immunology, Research Programs Unit, Immunobiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

The production of phages for therapeutic purposes demands the development of fast, efficient, and scalable purification procedures. The purity requirements for medical products vary depending on the route of application; parenteral medicines are controlled more stringently than orally or topically given products.

Phage lysates produced in different hosts have a wide range of impurities: bacterial DNA, proteins, and polysaccharides. Of these, the most strictly regulated molecules are lipopolysaccharides (LPS or endotoxins) of gram-negative bacteria. The highest allowed endotoxin concentration for parenterally applied medicines is 5 EU/kg/h. Gram-positive bacteria, on the other hand, may produce toxins that can be harmful in large quantities. For example, many *Staphylococcus aureus* strains produce staphylococcal enterotoxins (SEs) that are small and very stable proteins. SEs are resistant to heat, acid, and gastrointestinal proteases, they are emetic, and may cause food poisonings and toxic shock syndrome. Less than 1 µg can cause disease, and concentrations below 0.5 ng/ml have been associated with outbreaks.

We are developing purification methods for phages of both gram-negative and -positive bacteria. As model phages, we have mostly used *Escherichia coli* phage vB_EcoM_fHoEco02 and *S. aureus* phage vB_SauM_fRuSau02. The parameters we measure during the purification process are phage titer, bacterial DNA, endotoxins for phages of gram-negative bacteria and SEs for phages infecting *S. aureus*.

We have tested several methods and combinations of these for phage purification: ultrafiltration, ion exchange chromatography (IEX), octanol extraction, and commercial endotoxin removal columns. Ultrafiltration with 100K cut-off efficiently removes bacterial DNA, small proteins like SEs and some endotoxin. The combination of ultrafiltration and IEX results in highly purified phage preparation, in respect to both SEs and endotoxins, but the drawback of IEX is that it needs a lot of hands-on time. In our hands, the optimal way to remove endotoxins is ultrafiltration combined with commercial endotoxin columns, as this procedure is both fast and efficient.

Phage MS2 – oncochemotherapy target cargo

Kolesanova E.F., Bolshakova T.N., Ribalkina E.U., Sivov I.G.

Gamaleya FSRC EM., Orechovich FSRC BioMedChem, RI of carcinogenesis, Biotechnology LLC, Moscow, Russia

We are suggested MS2 bacteriophage particles to treat solid tumors. To this end, it has been filled with

salts of monovalent thallium with simultaneous modification of their surface by conjugation of iRGD peptides obtained by chemical synthesis of peptides. Peptide, obtained by solid state synthesis, cyclically due to S-S-and a covalent bridge was conjugatively bonded to the protein capsid of the phage via spacer. Thallium salts were used to overcome the drug resistance of tumor cells, iRGD peptides – for highly affine binding of particles to the surface of the pathological circulatory system of the tumor.

Control the amount of thallium was carried out by fluorescence with Quaternary sodium salt of pyrene-1,3,6,8-tetrakisulfonic acid, the purity and the structure of synthesized iRGD peptide was controlled by the methods of HPLC and mass spectroscopy. The effectiveness of the obtained particles was confirmed by experiments on cell cultures (line MCF7 – hormone – dependent breast cancer-BC, or MDA-MB – 231 – hormone-independent BC) or on «Nude» mice, MCF7-or MDA-MB-231-xenographs. According to the results of experiments on animals, the therapeutic index was about 15,000, and the total concentration of $TiNO_3$ for therapeutic effect was less than LD50 500,000 times.

Histological preparations were scanned on the ScanScope CS2 (histological specimens in bright-field), and the resulting digital images researched on the subject of the relationship of the necrosis areas tissue of the tumor to the treated and untreated mouses, correspondingly. Experiments on animals with the obtained particles were controlled in experiments with particles without filling or with particles without chemical modification by ligands. It is shown that the tumor mass decreases under the action of the obtained particles by at least 2.5 times ($p < 0.01$).

The obtained results allow us to positively assess the effect of amplification of the action of salts of ml-kovalentnaja of thallium in target preparations prepared on the basis of phage MS2.

This work was funded by the the Ministry of education and science RF (№ 14.N08.11.0188 от 27.11. 2017 and «Human Proteome» grant № 14.621.21.0017)

Phage peptide libraries as a tool for studying the specificity profile of antibodies

Kolosova E.A.^{1,2}, Murashkin D.E.^{1,2}, Morosov I.V.³, Ilyichev A.A.¹, Chapoval A.^{1,2}, Shcherbakov D.N.^{1,2}

¹State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR, Koltsovo, Russia;

²Altai State University, Barnaul, Russia;

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

Various pathological processes in the body cause a change in the specificity profile of circulating antibodies. Most successfully, this peculiarity is used for serological diagnosis of infectious diseases, and the least – for the diagnosis of auto-immune diseases. In recent years, there have been numerous reports of a similar relationship between the antibody profile and the tumor types. The existence of such a connection,

combined with the introduction of methods of high-performance sequencing, creates the prerequisites for creating methods for universal serological diagnosis based on the analysis of the specificity profile of antibodies. Phage peptide libraries exhibiting a huge variety of random peptides are almost an ideal tool for obtaining a specificity profile for polyclonal antibody preparations.

The classical biopanning procedure involves the selection of individual phage clones and the determination of the amino acid sequences of their peptides using Sanger sequencing.

The use of new generation sequencing methods makes it possible to obtain data on the totality of peptides exposed on the bacteriophages of the entire library or its reduced versions obtained in the biopanning process. This approach was used on breast cancer sera.

The material of the study was panels of sera from patients with breast cancer and healthy individuals. We used a phage peptide library exhibiting, in the composition of the main surface protein pVIII, randomized foreign peptides 6, 8, 10, 12 a.o. in length, as well as peptides of the ring structure c6c, c8c, c10c, c12c. We conducted one round of biopanning. Biopanning was performed on magnetic particles with protein A for reduce the number of nonspecific interactions. After collecting the eluates, the bacteriophage titer was determined by the Gratia method. The concentration was varied between 10^4 – 10^8 pfu /ml.

Using PCR, amplification of the DNA portion encoding the amino acid sequences of the foreign peptide was performed. To do this, primer indexes were used, including sequences of barcode for sequencing.

Analysis of the set of sequences showed the presence of a set of peptides with which antibodies of sera from patients with breast cancer interact and not interacting with antibodies of healthy sera.

Bacteriophages and probiotics in correction of intestinal dysbiosis at food allergy

Kosyakova N.I., Andreeva L.A.

Hospital RAS of Pushchino Research Center, Pushchino, Russia

Over the last10 years it has been marked a significant increase of food allergy both in children and adults, followed by intestinal dysbiosis, that makes the search for new approaches to the treatment of these conditions is rather relevant. Attempts to correct such disorders of intestinal tract function only with probiotics or phages do not always lead to the intended effect. To solve the problem of improving the efficient treatment of intestinal dysbiosis at food allergy, clinical, experimental, immunoserological, molecular biological, microbiological, and biochemical studies were carried out among 108 patients aged from 1 to 65 years with a certain disease of food allergy, which were accompanied by intestinal dysbiosis during remission of skin and respiratory manifestations. Among reasonably significant allergens sensitization to wheat allergen, cow milk proteins, egg albumin, apple and other

drupaceous fruits, dust mites were revealed. Cross-allergy has been also taken into account. It has been shown experimentally more efficient influence of the combined use of probiotic "Bifidumbacterin" manufactured by the "Partner" Company, Russia and "Sextaphag", manufactured by the "Microgen" Company, Russia, with the culture *E. coli*-lactose positive, *E. coli*-lactose negative, *E. coli* 0142 and *Proteus vulgaris*. The patients were divided into 4 groups by simple randomization: 1st group – standard therapy treatment ($n = 25$); 2nd group – standard therapy + Bifidumbacterin ($p = 22$); 3^d group – standard therapy + Sextaphag ($n = 22$); 4th group - standard therapy + Bifidumbacterin and Sextaphag ($n = 39$). According to clinical criteria, microbiological and biochemical studies of feces to estimate the level of dysbiosis, the best results were obtained in the group 4 patients. More pronounced positive dynamics of the indices of cytokine profile in blood serum and coprofiltrates (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4 and IL-10) was also marked at the same group. In group 2 and 3, when compared them with each other, according to the period of remission, clinical manifestations, quality of life, correction of intestinal dysbiosis and cytokine status, statistically insignificant differences at the treatment both of standard therapy + Bacteriophage and standard therapy + Bifidumbacterin were obtained. Thus, clinical and experimental studies have shown that to improve the effectiveness of food allergy treatment it is advisable to carry out Bacteriophage therapy together with Bifidumbacterin against the background of the standard basic treatment of food allergy.

Freezing of plaques as a novel method for long term storage of bacteriophage

Kubala A.E., Pehinec T.M., Swift B.M.C., Rees C.E.D.

The University of Nottingham, Nottingham, Great Britain

The recent interest in isolation of novel phage for both genomic and therapeutic purposes means that there is a need to store large numbers of different phage in lab collections in a stable state. Genetic stability, the risk of contamination and viability have always been concerns when storing bacteriophage. However, a high loss of viability is usually encountered when bacteriophage are frozen and lyophilisation also results in phage inactivation. Hence the aim of this work was to develop a novel method for the long-term storage of bacteriophage. In this study five different well characterized bacteriophage (D29, TM4, PRD1, BP and B1) were frozen embedded in agar (e.g. material extracted directly from plaque), which resulted in a much smaller loss of viability compared to results gained when these phage were frozen in liquid suspension. "Artificial" plaques were also created by adding high titre phage stock to molten agar. This also resulted in much higher numbers of bacteriophage being retained when frozen. We hypothesized that the carbohydrate structure of the agar polymer produces this cryoprotective effect. To test this hypothesis, we embedded bacteriophage into gelatine and tested whether phage viability after freezing is comparable to that of bacteriophage frozen embedded into an agar matrix. We found that this was not the case and gelatine does not have any cryoprotective properties. Freezing bacteriophage in plaques provides a simple solution for enhanced phage survival during long term storage.

First clinical results of individualized phage therapy in the field of cardiovascular surgery

Kühn C., Rubalskii E., Rümke S., Salmoukas C., Haverich A.

Hannover Medical School, Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Hannover, Germany

Cases of inefficiency of antibiotic therapy against bacterial infections appear more often in surgical practice. Different mechanisms of antibiotic resistance and antibiotic tolerance make conventional antibacterial drugs insufficient for pathogen eradication in a number of patients. Phage therapy is one of the viable alternative or additional approach that can be a lifesaving option for these patients. However currently phage therapy is only possible as an *ultima ratio* therapy (therapy of last resort) according to article 37 of the Declaration of Helsinki in a majority of European legislations. We successfully applied bacteriophages as a therapy of last resort in patients after cardiovascular surgery which developed infections caused by multi- and pan-resistant bacteria. Individualized phage preparations showed their efficacy in different cases of implant associated infections and infections associated with a drug-induced immunosuppression caused by the following bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*.

Altered O-antigen length confers *E. coli* a resistance to RB49-like phage

Kulikov E.E.¹, Golomidova A.K.¹, Ivanov P.A.¹, Knirel Yu.A.², Letarov A.V.^{1,3}

¹*Winogradsky Institute of Microbiology, FRC "Fundamentals of biotechnology", RAS, Moscow, Russia;*

²*N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow, Russia;*

³*Biology faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Using clinical material, an uropathogenic *E. coli* strain UP1 was isolated in our lab in 2016. LPS of UP1 was profiled by NMR, PAGE and LPS-specific silver staining. UP1 belongs to O155 group. We also isolated an RB49-like phage PF17.6 infecting UP1 (O155), K12 C600 (rough, no LPS) and a number of other *E. coli* strains independent of their LPS type. A number of UP1 natural mutant variants resistant to PF17.6 phage was isolated. All these strains featured the resistance-associated altered LPS profiles with O-antigen molecules shortened in comparison with UP1 wt O-antigen. LPS of these mutants was studied by NMR, and this study showed that the chemical unit structure of O-antigen was preserved just as in wt strain. A wt allele of wzzB (LPS chain length determinant protein) gene cloned on a pGEM-3 plasmid fully restored the phenotype of UP11 mutants to wild type, including their phage sensitivity and LPS patterns.

We propose a new hypothesis for the mechanism of RB49-like phage infection. In RB49-like phages, gp38 receptor-binding protein caps a distal part of a thin needle-like long tail fiber.

We assume that the distal loops of gp38 could penetrate to their receptor through LPS layer, and their interaction with a receptor triggers a baseplate rearrangement. Then short tail fibers (gp12) get released and deployed, penetrating to their receptors through LPS layer by physical force. In this view we can assume that phage infection largely depends on this initial interaction of gp38 being properly positioned against its receptor. This strategy explains the fact that T-even related phages can infect many hosts, despite that their adhesins are not specifically recognizing or degrading host O-polysaccharides. The shortened O-polysaccharide variant preserving its chemical structure but changing spatial relations between host outer membrane and phage appears to be an efficient barrier preventing phage infection, so this way of phage resistance may be useful against a number of T-even-like phages.

Work supported by RSF grant 15-15-00134P

Detailed characterization of intestiphage and pyophage as a step toward broader clinical research in phage therapy

Kutter E., Langevin S., Parker D., Kroupa A., Vananzo S., Leister L., Gunther J., Pratt A., Pousson A., Foster B., Glassbrook D.

Evergreen State College, Olympia, USA

Carrying out successful double blinded clinical trials of potential therapeutic phage preparations has turned out to be extremely difficult, despite many years of study and careful preparation. This is due largely to the complexities of the human microbiome and most medical targets, the high specificity of phage-host interactions, and the wide variations of the pathogens and underlying microbiomes involved. At the same time, much emphasis has been placed on the high long-term successes achieved in a variety of contexts, particularly those using the very complex, long-standing and extensively evolved Georgian and Russian cocktails, Intestiphage and Pyophage, widely available in each of those countries. The PhageBiotics Research Foundation is now taking advantage of rapidly-improving metagenomic tools to thoroughly explore the make-up of these long-evolving cocktails. Understanding the cocktail composition will help us support detailed analysis of the resulting changes in microbial patterns during their implementation in appropriate individual cases, as well as facilitating getting regulatory permission for compassionate use applications. We are also using the well-studied ECOR (*E. coli* Collection of Reference) to help in efficiently isolating and characterizing individual coliphages, exhibiting different host ranges. For example, this has let us test the ability of individual isolates to provoke the recently-reported “superspreading” of plasmids carrying antibiotic resistance elements; encouragingly, no “superspreaders” strains have been found. The plan is to make the resultant findings widely available, helping support approval of these long-tested cocktails for a wide range of compassionate-

use applications and aiding those clinicians and researchers trying to develop effective phage-based therapeutic products and protocols that can be rigorously tested for more widespread applications.

Experience in the use of a lytic bacteriophage SE40 for biocontrol of salmonella enteritidis at a poultry farm

Laishevcev A.I.^{1,2}, Aleshkin A.V.¹, Kiseleva I.A.¹, Kaminskii V.V.¹, Zul'karneev E.R.¹

¹*G.N.Gabrichesky Research Institute For Epidemiology And Microbiology, Moscow, Russia;*

²*All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Y.R.Kovalenko, Moscow, Russia*

The use of antibiotics to suppress the growth of pathogenic flora in veterinary medicine has provoked the formation and widespread distribution of antibiotic-resistant strains in agriculture, which in turn increases the risk of non-treatable sporadic cases and outbreaks of foodborne infections. Bacteriophages, as highly specific antibacterial agents, can become an effective biocontrol tool for these pathogens, both in veterinary practice and in the medical field.

The aim of the study was to develop and adapt the scheme for the use of an effective phage preparation in enterprises with outdoor poultry keeping.

The test was conducted in poultry plants of the Russian Federation, during which Salmonella Enteritidis was detected during 2017. For work, a lytic bacteriophage SE40 isolated from a soil sample of the Moscow region was used. The bacteriophage before the use on industrial birds successfully passed all preclinical tests and proved its safety and effectiveness in laboratory conditions and in vivarium conditions.

In our research, a chicken was used, which was kept in an outdoor manner in the number of 120,000 animals from the age of 70 days, the tests were carried out for 4 months. Poultry treatment was carried out by means of a phage preparation with a titer of 10^9 pfu / ml, the single dose per bird was 10^8 pfu. Since the bird was kept in a floor manner, in order to decontaminate the litter, in alternation with the drinking, it was recommended to aerosol phage treatment of all premises containing the bird. The use of antibiotics during the tests was minimized.

The bacteriophage was evaluated using monthly bacteriological monitoring, for which the following samples were taken: cloacal swabs – 5 swabs from the building (5 heads per swab); step-samples – 2 pairs from the case; building dust – 1 combined sample from the building; samples from the floor and incubation eggs – 1 sample (from 10 eggs); samples from the egg processing tape – 1 sample from the building.

Since the beginning of the use of bacteriophages in the fields of intestine and cloacal swabs, Salmonella Enteritidis has not been found, which proves the effectiveness of bacteriophage use. When sowing step-samples, there were cases of allocation of Salmonella Enteritidis, which is explained by the presence of a high layer of litter at the time of the beginning of the experiment.

Physiology of interaction of bacteriophage AMP1 with its *Burkholderia* host. Possible implication in natural control of melioidosis incidence

Letarov A.V.^{1,2}, Morozov A.Y.³, Ivanov P.A.¹, Galyov E.E.³, Bogdan V.I.^{1,2}, M.R.J. Clokie³

¹Winogradsky institute of Microbiology, RC Biotechnology RAS, Moscow, Russia;

²Biology faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

³University of Leicester, Leicester, UK

Bacteriophages of *Burkholderia mallei/pseudomallei/thailandensis* complex are associated with their hosts in the tropical soils and water in the regions endemic for melioidosis such as North-East Thailand. Interestingly, the vast majority of the bacteriophages isolated from soils are closely related to each other and are distantly related to bacteriophage T7. The typical representative of these viruses is bacteriophage AMP-1. This virus is equally active against a dangerous pathogen *B. pseudomallei*, a causative agent of melioidosis, and against *B. thailandensis* that been genetically very close to *B. pseudomallei* is harmless. It has been shown that phage AMP1 behaves as a virulent phage if infects the host at 37°C. At the same time the EOP of this phage is 6–7 orders of magnitude lower at 25°C. It has been reported that infected host survival at low temperatures is associated with formation of a long lasting complexes with the host cells or even true lysogens that are unstable at higher temperature and thus are not virulent for the animals.

We performed mathematical modelling of phage-host dynamics in the water of NE Thailand rice fields using realistic phage life cycle parameters estimated experimentally. The modelling suggests that the prevalence of phage free bacteria will strongly depend on non-predictable environmental factors such as water turbidity that may explain the fact that neighbour regions in Thailand with an identical climate and the agricultural cycle may exhibit different seasonal dynamics of melioidosis incidence.

Our experimental analysis of AMP1 interactions with *B. thailandensis* in the laboratory conditions revealed that cold sensitive phenotype is dependent on the phage gene with unknown functions. At the same time we could not confirm the formation of culturable lysogens upon low temperature infection. Moreover we discovered that phage infectivity is controlled not only by temperature but also by ionic strength of the medium. We conclude that the paradigm of phage AMP1 interactions with its host should be profoundly revised.

Metastable (pseudolysogenic) associations of virulent coliphages and their hosts

Letarova M.A.¹, Letarov A.V.^{1,2}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, RC Biotechnology RAS, Moscow, Russia;

²Biology faculty, Lomonosoff Moscow State University, Moscow, Russia

Bacteriophages can be considered to be ultimate survivors in natural environments, successfully coping with long periods of survival when their host bacteria are in scarce supply. Temperate phages achieve this by integrating into bacterial genomes, but the mechanisms of virulent phages long term persistence are largely unknown.

We characterized the metastable associations that we termed pseudolysogenic associations (PA) of three coliphages: a siphovirus 9g (Kulikov, et al., 2014) and N4-related podoviruses G7C (Kulikov, et al. 2012) and St11Ph5 (Golomidova et al., 2018) with their cognate host strains of *E. coli*.

In all the cases we were able to obtain long lasting cultures producing the phage active against the parental bacterial strain by 20 passages and longer. In all the cases we observed in situ evolution that gave rise to bacterial strains with highly reduced sensitivity to the original phage and to the phage strains with reduced activity against the parental host but infecting more effectively the evolved hosts. The PFU/CFU ratio in PAs were higher in 6–10 passages and gradually decreased in most of the PAs in later passages that coincided with increase of bacterial clones resistant to all types of the phage present in PA. Eventually this increasing resistance should lead to complete cure of the bacterial population from phage highlighting metastable nature of PA.

However the subcloning of PAs unexpectedly revealed that many of the cells (from 5% in G7C-*E. coli* 4s to almost 100% in 9g-*E. coli* C600) present in them form colonies producing phage. This result indicates the existence of a mechanism of tight association of the individual cells with virulent coliphage that may ensure proliferation of PA.

The work supported by RSF grant #15-15-00134-P

High density *Chlorobium phaeovibrioides* population in the meromictic Lake Trekhtzvetnoe (Murmansk region, Russia) is associated with bacteriophages

Letarova M.A.¹, Savvichev A.S.¹, Boldyreva D.I.^{2,3}, Babenko V.V.², Krasnova E.D.⁴, Letarov A.V.^{1,3,5}

¹Winogradsky Institute of Microbiology, Research Centre of Biotechnology RAS, Moscow, Russia;

²Federal Medical Biological Agency, FCRC of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia;

³Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudnyi, Russia;

⁴Nikolay Pertsov White Sea Biological Station, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Poselok Primorskiy, Republic Karelia, Russia;

⁵Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The Trekhtzvetnoe Lake is one of the smallest meromictic lakes known. This water body was formed due to separation of a small coastal line invagination of the Kandalaksha Bay (The White Sea, Russia) from the sea due to upwelling of the continental platform. A sharp halocline formed in this lake allowed a sharp stratification to form over a very short water column (the average lake depth is about 3.5 m). The bacterial plate layer (BPL) situated at 2 m depth is heavily dominated by an anoxygenic phototrophic bacterium *Chlorobium phaeovibrioides*, which reaches a density of 2×10^8 cell ml⁻¹ and almost completely intercepts H₂S current from the anoxic monimolimnion.

Metagenomic analysis demonstrated very low diversity of *Chl. phaeovibrioides* population in the BPL that is near to homogeneity. The *Chlorobium* population was associated with bacteriophages. Four bacteriophage contigs had a coverage 4 times higher than that of *Chl. phaeovibrioides*. The genetic contents and other features of these contigs suggest that they represent a genome of a single myovirus. The CRISPR arrays found in the host contained several spacers matching the phage contigs. This confirms that the detected bacteriophage is indeed a parasite of the dominant BPL bacterial strain and suggests that phage predation exerts considerable selective pressure over the host population in this ecosystem.

Another highly covered metagenomic contig represented a plasmid that was present in *Chlorobium* population in integrated form and in the form of an episome. The integration of this plasmid within restriction-modification genes cluster, and the presence on the plasmid of a potential restriction enhancer protein and of two putative abortive infection antiviral systems are indicative for potential involvement of the discovered plasmid into the interactions of high density *Chlorobium* population with associated bacteriophages.

These features make the ecosystem of the Trekhtzvetnoe Lake a valuable model for studying regulation and evolution processes in natural high-density microbial systems.

Phage-specific l,d-peptidases of the M15 family: structure, regulation, distribution and biotechnological prospects

Mikoulskaia G.V.¹, Chernyshov S.V.¹, Zimin A.A.², Prokhorov D.A.³, Shadrin V.S.¹, Molochkov N.V.³, Kutysenko V.P.³

¹Branch of Shemyakin & Ovchinnikov's Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino, Russia;

²Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS, Pushchino, Russia;

³Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Russia

Endolysins of bacteriophages are enzymes that destroy the peptidoglycan of the host bacterium cell wall at the stage of cell lysis for the release of phage progeny. Of particular interest to them is associated with potential use as antibacterial agents that can serve as an alternative to antibiotics in the therapy of bacterial infections.

We identified and characterized a number of homologous endolysins of lytic coliphages belonging to the families Siphoviridae and Myoviridae. By their substrate specificity, these enzymes are M15 peptidases that hydrolyze the bond between l-alanine and d-glutamic acid in peptidoglycan belonging to A1 γ type. Phylogenetic studies have shown that orthologous sequences are widely represented in the genomes of lytic phages that primarily infect Gram-negative hosts. We can assume a large role of the horizontal gene transfer in the variable regions of genomes between unrelated phages having a common ecological niche.

The spatial structure of endolysin of bacteriophage T5 (EndoT5) in solution was determined by high-resolution NMR. It was shown that this is a globular protein belonging to the $\alpha+\beta$ class; its hydrophobic core is represented by three α -helices and four antiparallel β -folds forming the β -sheet. EndoT5 and its homologues, EndoRB43 and EndoRB49, in the active site have catalytic zinc coordinated by two conservative histidines and two aspartic acid residues. In addition, EndoT5 is activated by calcium ions, which is not typical for its homologs from myoviruses. The enzymes studied differ in their biochemical properties (specific activity, pH-optimum, sensitivity to ionic strength and buffer compounds), but all of them are characterized by thermal resistance, annealing the structure and restoring activity after heating to 90°C.

Enzymes of this group effectively lyse in vitro peptidoglycan of living cells of a number of bacteria, including Gram-negative ones (in the presence of permeabilizing agents), which is accompanied by osmotic lysis and cell death. Small size, high activity and conformational stability open up for these proteins perspectives of application as a biomedical preparation.

The work was partially supported by RFBR grant No. 18-04-00492.

Bacteriophages for biocontrol of Soft-Rot potato bacteriosis

Miroshnikov K.A.^{1,2}, Kabanova A.P.^{1,2}, Shneider M.M.¹, Barannik A.P.¹, Vasiliev D.M.², Korzhenkov A.A.³, Miroshnikov K.K.⁴, Toschakov S.V.^{3,4}, Ignatov A.N.²

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia;

²PhytoEngineering Research Center, Rochachevo, Moscow region, Russia;

³I.Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia;

⁴Fundamental Biotechnology Federal Research Center, Winogradsky Institute of Microbiology, RAS, Moscow, Russia

Pectolytic Enterobacteria (*Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.), causing soft rot and black leg (Soft Rot Pectobacteriaceae, SRP) is a reason for substantial losses in the vegetation and storage of potatoes. Recent investigations reveal a substantial genetic diversity of SRP, including an establishment of new subspecies and species. Precise diagnostics and differentiation of causative agents of potato bacteriosis is necessary for development of new methods for disease control and prevention. Systematization of most abundant representatives of *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. into 15 gene groups based on RAPD, BOX-PCR, MLST profiling, as well as complete genome sequencing enabled us to rationalize the selection of specific lytic bacteriophages. In the course of the presented project we have designed enrichment cultures composed of strains representing each gene group, that allow to isolate target bacteriophages from pathogenic plant tissues and sewage water. The current collection of specific bacteriophages characterized morphologically and by infection range includes above 60 phage units. 15 genomes are sequences and deposited to the NCBI GenBank. Based on bacteriophage panel we have designed experimental cocktails demonstrating high activity against target pathogens *in vitro* and in biological models.

The project is supported by Russian Science Foundation grant # 16-16-00073

Genomic characterization of lytic *Yersinia pestis* bacteriophages fEV-1 and fD1

Pajunen M.I., Happonen L.J., Jaakkola S.T., Mattinen L., Nawaz A., Trivedi M.-M., Skurnik M.

Department of Bacteriology and Immunology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

Lytic bacteriophages fD1 and fEV-1 infecting *Yersinia pestis*, the causative agent on plague, were isolated from the sewage treatment plant of Turku, Finland, using *Y. pestis* strains D27 and EV-76, respectively, as hosts. As last cases of plague in Finland were reported in 1711, we anticipate that their present time natural host is not *Y. pestis*. Here we report the complete genome sequences and morphological characterization of the phages. Transmission electron microscopy revealed that both phages have the morphology of myoviruses. Phage fD1 is a T4-like myovirus with a 167-kb dsDNA

genome (accession number HE956711) and phage fEV-1 is a Dwarf myovirus with a 38-kb dsDNA genome (accession number LT992259). Annotation of fEV-1 genomic sequence revealed that most of the potential genes had no homologs in the databases. We also determined their host ranges in several species of Enterobacteriaceae and one-step growth curves. We additionally identified virion-associated phage and host proteins via LC-MS/MS. Further attempts to identify their host receptors could improve their potential use in phage therapy, including treating infections caused by *Y. pestis*.

In silico analysis of tail fiber proteins of streptomyces phage phiC31

Patlevicova A., Sramkova Z., Godany A.

Institute of Molecular Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia;

Faculty of Natural Sciences, University of Ss. Cyril and Methodius in Trnava, Bratislava, Trnava, Slovakia

The first interaction between bacteriophages and their host bacteria is the recognition of receptors found on bacterial cell walls by tail fiber proteins of bacteriophages (Perry, 2015). In order for an infection to occur, physical contact between tail fiber proteins and receptors on bacterial surface must result in the formation of a reversible bond. In the second step, bacteriophage adsorbs to the host cell wall resulting in irreversible binding (Abedon, 2010).

Receptor molecules located on the cell walls of host bacteria have a specific character determined by the chemical composition of bacterial cell wall. The specificity of interaction between bacteriophages and bacteria is not only determined by the nature of the cell wall receptors but also by the nature of bacteriophage's tail fiber proteins. Some bacteriophages tail fiber proteins are able to recognize a wide spectrum of bacterial receptors, on the contrary, other proteins can interact with a certain specific receptor only (Rakhuba, 2010). Such bacteriophages have a very limited host spectrum (Godany et al., 2007).

The aim of this work was a bioinformatic analysis of genes coding for the tail fiber proteins of bacteriophage ΦC31 by means of comparative analyzes of annotated proteins of tail fibers of bacteriophages infecting bacteria from *Streptomyces* and other various actinophages. By modeling protein-protein and protein-ligand interactions, it is possible to detect the interaction mechanism between bacteriophage tail fiber proteins and receptors located on host cell walls, and to predict the active site of bacteriophage tail fiber proteins.

Acknowledgement: This research was financially supported by grant VEGA 2/0099/16

Abedon, S.T. - Abedon, C.,T.: *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010, vol. 11, no. 1, p. 28-47

Godány, A., et al.: *Folia Microbiologica*. 2007, vol. 52, no. 4 p. 347-358

Perry, E.B. - Barrick, J.E. - Bohannan, B.J.M.: *PLoS ONE*. 2015, vol. 10, no. 6, e0130639

Rakhuba, D.V., et al.: *Polish Journal of Microbiology*. ISSN: 2010, vol. 3, no. 59, p. 145-155

Endolysins of bacteriophages infecting *Bacillus cereus* and *Enterococcus faecium*

Pilgrimova E.G.^{1,2}, Baicher S.D.^{1,3}, Kulyabin V.A.^{1,3}, Shadrin A.M.^{1,4}

¹G.K.Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, RAS, Pushchino, Russia;

²Vyatka State University, Kirov, Russia;

³Moscow State University, Moscow, Russia;

⁴Pushchino State Institute of Life Sciences, Pushchino, Russia

Endolysins of bacteriophages are specific enzymes synthesized at the final stage of bacteriophage life cycle. The biological function of endolysins is the destruction of the bacterial cell wall in purpose to release mature phage particles. Unlike traditional antibacterial drugs, endolysins can act on dormant forms of bacteria. According to the World Health Organization for 2017, two antibacterial biological compounds based on endolysins were on the second stage of clinical trials. Both compounds were developed against bacteremia caused by methicillin-resistant staphylococci. In this work, we describe the purification of endolysins and their primary biochemical characteristics: optimal reaction conditions, thermostability and specificity.

The reported study was funded by RFBR and Moscow oblast according to the research project № 17-44-500067 p_a

Unusual interactions of *Pseudomonas aeruginosa* virulent phages and their host-bacteria

Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Krylov S.V., Bourkal'tseva M.V., Krylov V.N.

I.I.Mechnikov Research Institute for Vaccines & Sera, Moscow, Russia

The increasing interest to the use of phage therapy enforces the need for a transition from individual phage selection for each patient to developing more general approaches that exclude, at the same time, the possibility of different species phages interaction with undesirable consequences. We have substantiated and proposed the development and use of mono-species phage mixtures. The *in vitro* test of the activity of PB1-like species phage and their recombinants mixture against a group of *Pseudomonas aeruginosa* strains randomly selected from a large collection of clinical isolates confirmed a high (about 80%) killing activity of the mono-species mixture of PB1-like phages. The reasons for the phage-resistance of the remaining strains were studied. Besides the adsorption failure and intracellular development suppression, other causes of resistance have been identified and discussed. From this point of view, the efficiency and safety of phage therapy in the treatment of infections caused by *P. aeruginosa* is considered.

References:

- Pleteneva, E.A.; Shaburova, O.V.; Burkaltseva, M.V.; Krylov, S.V.; Kaplan, A.M.; Chesnokova, E.N.; Polygach, O.A.; Voroshilova, N.N.; Mikhailova, N.A.; Zverev, V.V.; Krylov, V.N. Novel approach to composition of bacteriophage mixtures for antibacterial therapy. *Zh. Mikrobiol. Immunol. (Moscow)*, 2016, 5, 3-11.
- Krylov, V.; Shaburova, O.; Pleteneva, E.; Bourkaltseva, M.; Krylov, S.; Kaplan, A.; Chesnokova, E.; Kulakov, L.; Magill, D.; Polygach, O. Modular Approach to Select Bacteriophages Targeting *Pseudomonas aeruginosa* for Their Application to Children Suffering With Cystic Fibrosis. *Front. Microbiol.* 2016, 13, 7:1631. eCollection 2016. Review. PubMed PMID: 27790211; PubMed Central PMCID: PMC5062033.
- Krylov, V.N., Bourkaltseva, M.V., Magill D.J., Kulakov, L.A., Pleteneva, E.A., Shaburova, O.V., Krylov, S.V., Mikhailova, N.A., Zverev, V.V. Optimising Phage Therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections through the construction of Modular Monospecies Phage Cocktails. *Viruses* (in print)

Host recognition by podoviruses G7C and Alt

Prokhorov N.S., Nazarov S., Riccio C., Guerrero-Ferreira R., Golomidova A.K., Zdrovenko E.L., Knirel Y.A., Letarov A.V., Leiman P.G.

University of Texas Medical Branch, Galveston, USA

The O22 *E. coli* strain 4s is a host to a number of bacteriophages that compete and, possibly, help each other to survive in the complex and dense microbiological environment of the lower intestine of a horse. N4-like phages G7C and Alt are close relatives with essentially identical genomes, except for a single gene the product of which is responsible for host recognition and forms a tailspike on the phage particle. We used a combination of X-ray crystallography and cryo-electron microscopy to determine the structure of G7C tail in atomic details. It carries twelve copies of two different tailspikes that form a branched structure. The long tailspike has a remarkable multidomain structure and bear an attachment platform for the other spike. This protein is identical in both phages. The short spikes of G7C and Alt have a set of nearly identical N-terminal domains that interact with the long one and strikingly different C-terminal receptor-binding domains. The short spike of Alt is a lyase. It degrades the *E. coli* 4s O-antigen into small fragments. In contrast, the short spike of G7C keeps the backbone of the same O-antigen polymer intact but removes one O-acetyl group per its repeating unit. G7C and Alt utilize non-homologous domains and different types of enzymatic activities to recognize and bind to the same cellular receptor molecule. Functional analysis of host recognition by G7C, Alt, and their viable tailspike mutants revealed that O-antigen binding and modification are critically important for infection. Moreover, the kinetics of O-antigen processing by the tailspikes appears to control the transition from primary host recognition to irreversible adsorption and subsequent DNA release. Our findings demonstrate that phages with identical particle structure and tail architecture can utilize strikingly different biochemical mechanisms to efficiently recognize, bind, and infect host cells.

Genomic characterisation of a negativicutes prophage containing ACI-1 beta-lactamase

Rands C.M.¹, Starikova E.V.², Brüßow H.³, Kriventseva E.V.¹, Govorun V.M.², Zdobnov E.M.¹

¹Department of Genetic Medicine and Development, University of Geneva Medical School and Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Switzerland;

²Department of Molecular Biology and Genetics, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russian Federation;

³KU Leuven, Department of Biosystems, Laboratory of Gene Technology, Leuven, Belgium

Negativicutes bacteria are a part of healthy human and animal gut microbiota, however, some Negativicutes species were connected to infections, i.e. vaginosis. Resistance to beta-lactam antibiotics was previously described for *Acidaminococcus intestini*, encoded by ACI-1 class A beta-lactamase resistance gene. However, it is not known how ACI-1 emerged and its prevalence among other Negativicutes bacteria wasn't known as well. We have studied the genomic context and prevalence of ACI-1 gene in gut and vaginal metagenomes of humans and ruminal animals, as well as in sequenced bacterial genomes.

We have discovered in *A.intestini* and *Megasphaera elsdenii* genomes that ACI-1 is flanked by a number of mobile elements inserted into a prophage. In the other Negativicutes genomes analyzed, ACI-1 gene's copies are surrounded by various transposons, that might indicate recent mobile element rearrangements. We have discovered ACI-1 gene in a number of human and ruminal animal metagenomes flanked by transposon-like elements, sometimes inserted into a prophage with a clear genomic structure characteristic of tailed phages. That prophage is the first prophage described for *A. intestini* and *M.elsdenii*, and one of the first ones described for Negativicutes. After analyzing the coverage of the corresponding genome segments we can presuppose that both one of the transposons and the bacteriophage might be active in the samples analyzed.

The work was made possible by the financial support of RFBR (grant No. 16-52-21012)

Local drug-delivery system for bacteriophages

Rubalskii E.^{1,2}, Rümke S.^{1,2}, Salmoukas C.^{1,2}, Aleshkin A.³, Bochkareva S.³, Modin E.⁴, Boyle E.C.^{1,2}, Haverich A.^{1,2}, Kühn C.^{1,2}

¹Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Hannover Medical School, Hannover, Germany;

²Lower Saxony Centre for Biomedical Engineering, Implant Research and Development, Hannover, Germany;

³Gabrichesky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

⁴CIC nanoGUNE, Donostia-San Sebastian, Spain

A number of bacterial complications required prolonged local drug delivery. In age of the antibiotic resistance application of lytic bacteriophages is one of the most promising antibacterial alternatives. However a local delivery of phages to the infected site have to be established. Our aim was to use fibrin glue as clinically relevant carrier for bacteriophages. Scanning electron microscopy demonstrated structural features of phage-loaded fibrin glue samples in comparison with the control ones. The samples of fibrin glue polymerized in presence of bacteriophages showed constantly high phage release profile during 11 days of their incubation at the liquid medium. The released phages had the same stability of lysis as the intact ones. We assume that the fibrin glue is a promising local drug-delivery system for bacteriophages in clinical setting.

Prospects for design of phage-containing compositions against staphylococcal biofilms

Rubalsky O.V.¹, Galimzyanov Kh.M.¹, Rubalsky M.O.¹, Dosmukhanova E.G.¹, Demina Yu.Z.¹, Krasilova E.V.^{1,2}

¹Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia;

²N.N.Silishcheva Regional Children Clinical Hospital, Astrakhan, Russia

Despite the fame of virulent staphylococcal bacteriophages until now it has been studied in details only their ability to lyse planktonic forms of bacteria. The researches aimed at assessing the efficacy of virulent staphylococcal bacteriophages against biofilms are limited to study of the preventive action or does not take into account a growth phase of a biofilm. However it is known that bacteria incorporated in mature biofilms are most tolerant to an etiotropic therapy. Our research is aimed at the analysis of known strains of staphylococcal bacteriophages in order to identify factors potentially providing complete eradication of mature biofilms of *Staphylococcus aureus* included those formed by lysogenic staphylococci, as well as isolation and characterization of new strains of virulent bacteriophages which have host range activity against circulating isolates and strains of *S. aureus* capable to form mature biofilms.

Prospectives of phage therapy in Western medicine

Saperkin N.V., Scholten R.J.P.M., Chanysheva R.F.

Utrecht Universiteit, Utrecht, Netherlands

The beginning of “post-antibiotic era” poses a plenty of the urgent questions concerning a set of medical and epidemic risks. Since 1950-60s, in the Western medicine attention to the phage therapy was markedly substituted by the great success of antibiotic treatment. Nevertheless, the scientific work in this field did not stop in the former Soviet Union (notably, now in Russia and Georgia) and in Poland. Nowadays, clinical and public health-related potential of bacteriophages capture imagination again. WHO defined bacteriophages as a “new therapeutic approach” and an alternative to control infections by infecting and destroying bacterial pathogens. This problem is being widely discussed now both in the scientific circles and in mass media of all kinds. The use of phages for the control and treatment of infection undoubtedly requires critical even-handed appraisal regarding the principles of evidence-based medicine.

In the 21st century one of the first attempts to critically appraise this therapeutic approach in Europe is likely to be the Russian clinical recommendations for the rational usage of bacteriophages in clinical and anti-epidemic practice. The Dutch report made by RIVM can be another remarkable example of it. The principles and obstacles of applying bacteriophages against bacterial infections, including HCAI, were comprehensively described in these documents.

The factors determining development of phage therapy (and prophylaxis) in the Western medicine are the following. They are regulation challenges, moral and ethical concerns, opinion of farm industry (big pharma); misunderstanding the terminology and the bacteriophage functional features by physicians and other stakeholders; possible lack of data about safety, cytotoxicity of an individual phage as well as a given phage preparation, a need for sufficiently powered and well-designed RCTs; negative image of a style of the Soviet scientific publications despite of instructive information contained in it; limiter access (or its absence) to the original abstracts and texts of studies which were performed in Russia and the former USSR;

Presently, a lot of empirical clinical information is available from different countries but some current reports at hand are uncontrolled or anecdotal trials. These obstacles can be a serious problem preventing from effective implementation of bacteriophage therapy outside the Eastern Europe countries, even inspite of its clear clinical and epidemic advantages. All the factors above mentioned can be met during systematic reviewing the primary studies dedicated to phage treatment.

Molecular techniques for diagnostics and monitoring of antimicrobial resistance of bacterial infection agents – capabilities of their practical application

Savochkina Yu.A., Timoshina O. Yu., Guschin A.E.

Central Research Institute for Epidemiology (CRIE), Moscow

Antimicrobial resistance (AMR) is identified by the WHO as one of the three most important problems for human health. The worst situation is connected with multidrug resistant (MDR) and extensively resistant (XDR) Gram-negative bacteria (GNB) causing nosocomial infections. The XDR strains of GNBs are generally resistant to all beta-lactams including carbapenemes and co-resistant to other antibiotic groups. The key role for the rising resistance of GNBs to beta-lactams plays the spread of ESBLs and carbapenemases and the last group presents the most important threat in this context at the last decade. Concerning MDR Gram-positive bacteria the main groups are presented by methicillin resistant *Staphylococcus spp* (MRSA and MRCNS) and vancomycin resistant *Enterococcus spp* (VRE).

Molecular techniques are recognized as effective and reliable for detection of a number of most important AMR mechanisms and allow reduce significantly the time of detection of resistant bacteria comparing with standard phenotype based methods. The real-time PCR based technique is available and widely used in diagnostic laboratories in healthcare institutions in RF. Taking into account these items we have developed previously in the Department of molecular diagnostics of CRIE and established a number of multiplex real-time PCR based assays for the detection of most important resistance genes, including main groups of acquired carbapenemase (KPC-, OXA-48-like, MBL of VIM-, NDM- and IMP-groups) genes, and *mecA* gene, determining resistance to β -lactams in MRSA and MRCNS. With use of fluorogenic-probe based technique they allow simultaneous detection of targeted resistance genes groups with their differentiation. These assays are produced by CRIE and are available for use in diagnostics (IVD marked). Several real-time PCR based assays developed later allow the detection of ESBL genes of main CTX-M-group (including CTX-M-1, CTX-M-2-, CTX-M-8/25- and CTX-M-9-like), 3 groups of OXA-carbapenemase genes related to *Acinetobacter baumannii*, *vanA* and *vanB* genes determining acquired resistance to vancomycin in VRE. The mentioned above PCR-assays are used for diagnostics, microbiological monitoring and for epidemiological studies in a number of large healthcare institutions in RF. Main results of some of these epidemiological studies will be included into oral presentation.

Molecular assays based on real-time PCR allow rapid and effective detection of most important antibiotic resistance determining genes groups. The PCR- and DNA sequencing based techniques can be effectively used for improved monitoring of AMR concerning both healthcare and food safety areas.

Personalized phage therapy of healthcare-associated infections

Shkoda A.S.¹, Aleshkin A.V.², Bochkareva S.S.², Ershova O.N.³, Mitrokhin S.D.¹, Kiseleva I.A.², Zul'karneev E.R.², Rubalskii E.O.^{2,4}, Kühn C.⁴, Haverich A.⁴, Novikova L.I.²

¹L.A.Vorokhobov Municipal Clinical Hospital No 67, Moscow, Russia;

²G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

³Academician N.N. Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Moscow, Russia;

⁴Hannover Medical School, Department of Cardiothoracic, Transplantation and Vascular Surgery, Hannover, Germany

Phage therapy of intestinal and respiratory infections caused by community-acquired antimicrobial resistant pathogens can be successfully performed by mass-produced bacteriophages in comparison with healthcare-associated infections (HAIs). The latter require an approach consider rapid changes in circulating bacterial isolates, formation of anti-phage immunity, phage pharmacokinetics, etc. We have developed a personalized phage therapy algorithm for intensive care unit patients suffering from HAIs. This approach increases the efficacy of phage therapy by 40 per cent and consists of three consecutive stages:

- Determination of sensitivity of target bacterium to bacteriophage preparation;
- Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of IgG-antibodies in the patients' sera active against the phages used;
- Selection of pharmaceutical form and route of administration based on the preliminary phage pharmacokinetics study.

Sound and safe update of phage compositions, used against HAI-pathogens, requires development of an up-to-date collection of phenotypically and genetically characterized bacteriophages that expect to be included into ready-to-use pharmaceutical forms on the first demand of a hospital.

Novel T-even phage AM101 infecting *Acinetobacter baumannii*

Shneider M.M., Popova A.V., Timoshina O.Yu., Shagin D.A., Mikhailova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Obratsova E.A., Kulikov E.E., Miroshnikov K.A., Edelshtein M.V., Kozlov R.S.

Shemyakin and Ovcinnikov IBCH RAS, Moscow, Russia

Acinetobacter baumannii is gram-negative non-fermenting aerobic coccobacilli, the causative agent of a variety of nosocomial infections. Dangerous does *A. baumannii* high genome plasticity and the ability to natural transformation, as a consequence actual clinical strains have a significant number of genes encoding antibiotic resistance. There are often pan-resistant strains. One possible treatment for infections caused by *A. baumannii*, – the use of phage therapy and, optionally, in combination with antibiotic treatment. The first results of the use of phage therapy for infection caused by panoresistant strain *A. baumannii*, received in the US, are encouraging.

Experience shows that to obtain therapeutic effect is necessary to use cocktails consisting of several phages, which obviously using different types of receptions on the surface of a bacterial cell. But bacteriophages, infecting *A. baumannii*, at the moment studied insufficiently. We isolated a new bacteriophage *A. baumannii*, belonging to the group of T-even phages, which we named AM101.

At the moment, only one single T-even phage *A. baumannii* was characterized in detail – ZZ1. Phage AM101 was isolated from the water of the Moscow River, which indirectly shows, that the bacterium is the inhabitant of flowing reservoirs in an urban environment. It was demonstrated that phage infects a number of clinical strains of *A. baumannii*. The genome of the phage consists of 166487 nucleotides encoding 250 open reading frames and 10 tRNA. According to genomic phage data, AM101 does not differ from classical T-even phages. We detected a specific type of structural protein fibrin, which is predicted with a high probability having deacetylase at the C-terminal domain. It could mean that fibrin takes part in the reception of phage on the surface of bacterial cells, and at the same time performs processing of the surrounding carbohydrates. Recently it has been shown that a number of phages are used for the protective modification of DNA by arabinose covalently attached to the residues of hydroxymethyl cytosine and the key genes responsible for this process have been identified. We found homologies of these genes in the genome of phage AM101. We revealed two genes that encoding for glycosyltransferases homologous to each other, obviously directly responsible for the transfer of arabinose residues to DNA. We suppose that T-even phages should be a part of cocktails for the treatment of *A. baumannii* infections.

Work was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-15-00403).

Age dynamics of the titer of bacteriophages of *E. coli* in intestinal microbiocenosis of chickens during the first 38 days from the birth

Skoblikov N.E.¹, Osepchuk D.V.¹, Moskalenko E.A.¹, Zimin A.A.²

¹Krasnodar Scientific Center of Zootechnics and Veterinary, Krasnodar, Russia;

²G.K.Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia

The study of changes in titer of *E. coli* bacteriophages (coliphages) of the 15 chickens intestinal microbiocenosis sampled in the first 45 days was carrying out. The faeces were sampling from each bird individually, 6 times with an interval of 6–8 days. The total number of samples was 120.

After sampling the samples were weighed, resuspended in buffer with the addition of bacterial growth inhibitors, and centrifuged. Series of 100-x dilutions were performed from obtained supernatant. Seeding on the laboratory *E. coli* B strain culture by agar overlay method using hard and soft agar medium LB was carrying out. The calculation of phage titer

in the sample (expressed in lg PFU/ml) was carrying out after the registration of formed plaques on the plates.

The study reflects the dynamics of coliphages of chickens during the first 38 days of life. It is the new data, useful both for the general understanding of the formation of intestinal microbiocenosis of birds in ontogeny, and for determination of the critical periods of development while veterinary drugs are applied.

The reported study was supported by RFBR and administration of Krasnodar region, research project No. 16-44-230855-r_a.

Interesting findings on Yersinia phages

Skurnik, M.

University of Helsinki, Helsinki, Finland

YerA41 is a myovirus that infects *Yersinia ruckeri* (Yr). Several attempts to determine its gDNA-sequence using traditional and next generation sequencing technologies failed, indicating that the phage genome carries a novel nucleotide modification rendering it unsuitable as a template for any DNA-polymerase used for sequencing or PCR. To determine the genome sequence we have carried out RNA-seq of phage-infected Yr cells and after removing host-genome specific reads, the remaining reads were de novo assembled. This resulted in a total phage-specific sequence of 145 kb. Annotation revealed 192 potential genes most of which found no homologs in the databases, however, three putative phage-encoded DNA polymerases were identified and are being functionally characterized. Proteome and transcriptome studies were also carried out.

φR1-37 is a 262 kb myovirus that has replaced completely thymidines in its genome by deoxyuridine. It infects *Yersinia enterocolitica* (Ye) serotype O:3 using as a receptor the outer core hexasaccharide of LPS. It also uses structurally different LPSs of other Ye serotype strains as well as strains of *Y. intermedia* O:52,54 and *Y. similis* O:9 as receptors. Efficiency of plating (EOP) assays showed a wide range of efficiencies between ~0.5 and ~10⁻⁷. The data suggests that the phage has several receptor binding specificities and /or the phage receptor binding proteins (RBP). The putative tail fiber protein encoding gene and its associated chaperone, g298 and g297, respectively, were cloned and expressed simultaneously to produce a recombinant tail fiber protein complex with N-terminal His-tag fused to Gp298. The final purified product had both Gp298 and Gp297. The recombinant protein blocked the binding of φR1-37 onto YeO3-R1 bacteria confirming that Gp298/297 was the RBP.

Experience of joint use of bacteriophages and probiotics in treatment of combined gynecological and gastroenterological pathology

Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zhirnov V.A., Ivanova T.P.

Federal Budget Institution of Science «I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology», Nizhny Novgorod, Russia

According to the scientific literature, bacteriophages are used as monotherapy or in combination with antibiotics and sorbents to treat a wide range of diseases associated with bacterial infection. There are scientific publications describing the combined use of phages and probiotics, but in almost all cases the work performed in two stages – the first stage – phagothrapy, and the second one – use of probiotics to colonize the sanitized ecological niche. The high efficiency of simultaneous joint application of these biopreparations was shown in farm animals.

Works on the joint use of phages and probiotics in treatment of women with nonspecific vaginitis and concomitant gastroenterological pathology were performed in NNRIEM named after I.N.Blokhina. Sixty two (62) women with chronic nonspecific vaginitis and gastroenterological pathology (gastritis, gastroduodenitis) accompanied by intestine and vagina dysbiosis, degree II–III, were selected. Bacteriophages (coliprotein, staphylococcus, pseudomonas) and author's symbiotic "LL-complex" in the form of intravaginal douches were jointly used in treatment of women referred to the main group (32 persons). At the same time, the patients orally took phages (intestinal, coliprotein, pyobacteriophage) and probiotic "LB-complex". The time interval between admission was 6 hours.

It is shown that clinical implications of vaginitis disappeared and vagina and intestine microflora was normalized in all patients of the main group. In the compared group, 68% of women showed vaginal dysbiosis of I-II degree due to decrease in the number of lactic-acid microorganisms; and as for the intestine – along with normalization of lacto- and bifidoflora – a significant growth of the same opportunistic pathogens was observed (just like at primary examination) in 73% of patients. Thus, high efficiency of joint application of bacteriophages and liquid author's probiotics in treatment of overlapping gynecological and gastroenterological pathology is shown.

MALDI-TOF Mass Spectrometry for identification of *Staphylococcus* bacteriophages

Stverakova D., Sedo O., Benesik M., Zdrahal Z., Doskar J., Pantucek R.

Masaryk University, Brno, Czech Republic

Objectives: *Staphylococcus aureus* is a major causative agent of infections associated with community and hospital environments, where antibiotic-resistant strains have emerged

as a significant threat. Phage therapy could offer a safe and effective alternative to antibiotics. Necessary safety requirements for phage preparations are still being discussed as well as production control technologies. This study was conducted to develop and evaluate a rapid and reliable method for identifying staphylococcal bacteriophages, based on detecting their specific proteins using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) profiling. MALDI-TOF MS is among the suggested methods for meeting the regulations of pharmaceutical authorities.

Methods: Five different phage purification techniques were tested in combination with two MALDI-TOF MS matrices. The mass spectral quality, in terms of the number of peaks detected, the signal-to-noise ratio and reproducibility, was assessed on 37 phage specimens classified to the Kayvirus genus of Myoviridae family, the Podoviridae family and the Siphoviridae family including three genera, Triavirus, Phietavirus and Biseptimavirus, respectively. In addition, phages were identified in three commercial preparations.

Results: Our findings suggest that MALDI-TOF MS could be used not only for identification of laboratory cultured phages but also in the verification of phages in ready-to-use preparations. The identification success rate is dependent mostly on phage titres, while the cultivation conditions and sample purity do not play a key role. The peak lists obtained were compared to a custom database containing 37 bacteriophage profiles using a data treatment approach common to routine bacterial identification using Biotyper software. Similarities in the experimental mass spectra to the individual database entries were expressed by the log(score) thresholds of 1.700 and 2.000 indicating also bacterial species identification at lower and higher confidence levels, respectively. All staphylococcal phage preparations were assigned to database entries of strains of the Kayvirus genus.

Acknowledgements: This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic (16-29916A) and the Czech Science Foundation (18-13064S).

Bacteriophages for modulating mammalian microbiome: the Phagebiotix™ approach

Sulakvelidze A.

Intralix, Inc., Baltimore, USA

Bacteriophages (or phages) are bacterial viruses that are arguably the oldest (ca. 3-billion-years-old) and most ubiquitous organisms (ca. 1030-1031 phage particles/virions) on Earth. Lytic phages have remarkable bactericidal potency against their specific bacterial host strains; moreover, phages are very specific: they only attack their targeted bacterial hosts, which makes targeted bacterial killing possible. Because of this remarkable and specific antibacterial efficacy, there has been an increased interest in the West in using bacteriophages for various applications ranging from food safety to human therapeutics. However, while most public attention has focused on the use of phages for treating human infections, there are no FDA-approved phage products available yet for human therapeutic applications. It is anticipated that such products will be gradually approved and marketed over the

next several years. In the meantime, lytic bacteriophages are already improving our health by enhancing our food safety; e.g., several FDA-approved phage products are currently on the market for “phage biocontrol” applications. Moreover, application of bacteriophages as dietary supplements / probiotics is also gaining an increased attention, as phages are increasingly being considered for targeted fine-tuning of the mammalian microbiota for health benefits. The approach of using lytic phages as probiotics is similar to that used for bacteria-based probiotics that act by favorably conditioning the microflora of the gut, mouth, skin, etc. The key difference between bacterial probiotics and lytic phage-based probiotics (“phagebiotix”) is that the former use nonpathogenic bacteria to interfere with the ability of pathogenic bacteria to colonize and cause disease; whereas, the latter use lytic phage to kill specific pathogenic bacteria while preserving the commensal community. Phagebiotix are expected to have a very gentle effect on the overall microflora, which may further enhance their protective effects. Also, they are expected to be compatible – and, in fact, synergistic – with bacteria-based probiotics. Thus, the phage-based probiotic approach may serve as a platform technology for developing a new class of “phagebiotix” or “super-probiotics” / supebiotix™ for modulating mammalian microbiome and improving animal (including human) health.

Polysaccharide-depolymerases of capsule-specific bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae*

Volozhantsev N.V.¹, Solovieva E.V.¹, Krasilnikova V.M.¹, Myakinina V.P.¹, Verevkin V.V.¹, Borzilov A.I.¹, Shpirt A.M.², Knirel Y.A.²

¹*State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;*

²*N.D.Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia*

To overcome the carbohydrate barrier of bacterial cells, many bacteriophages use specific enzymes, polysaccharide-depolymerases, which break down polysaccharide compounds, thereby ensuring the adsorption of the phage at the outer membrane receptors, phage DNA penetration, and bacterial cell lysis. Phage depolymerases are an attractive and promising means to control pathogenic bacteria, such as *K. pneumoniae*, whose main virulence factor is a pronounced polysaccharide capsule.

The aim of the work is to identify and clone genes of polysaccharide depolymerases (Ps-dep) of bacteriophages *K. pneumoniae* and the characteristics of their products.

As a result of the studies, genes Ps-dep of phages KpV71, KpV74 and KpV79 lytic for *K. pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsule types, respectively, were cloned and expressed in *E. coli* cells. Products of cloned genes, proteins Dep_kpv71, Dep_kpv74, and Dep_kpv79, were isolated and purified. PS-degrading activity of recombinant proteins was shown. The spectrum of PS depolymerase activity was determined by using *K. pneumoniae* strains of different phenotypes and genotypes. The data obtained indicated that recombinant proteins have more strong specificity to capsular polysaccharides in comparison with “parent” phages.

It was found that the depolymerases Dep_kpv74 and Dep_kpv79 are specific glucosidases that cleaves the *K. pneumoniae* polysaccharides of capsular types K2 and K57 by β -glucoside and β -galactoside bonds, respectively, to form monomers and dimers of the tetrasaccharide-repeating unit of the polysaccharide. Depolymerase Dep_kpv74 is a bifunctional protein and, in addition to β -glucosidase activity, determines, as expected, the association of the bacteriophage with the primary receptors, the capsular polysaccharide.

In vitro and *in vivo* experiments showed that cultivation of virulent hypermucoviscous K2-type *K. pneumoniae* strains with Dep_kpv74 leads to a significant decrease in their virulence in mice. Due to anti-virulent effect, the depolymerase ensures the survival of mice infected with a lethal dose of hypervirulent *K. pneumoniae* strain.

The obtained data testify to the possibility of using PS-depolymerases of *K. pneumoniae* capsule-specific phages for determining capsular types of a microbe, as well as to the perspectives of their use as a therapeutic agent.

The work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 15-15-00058P).

Bacteriophages, specific to bacteria of Genus *Klebsiella*

Ushakova T.A., Morozova V.V., Kozlova Yu.N., Tikunov A.Yu., Yunusova A.Yu., Fofanov M.V., Bokovaya O.V., Tikunova N.V.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Bacteria of the genus *Klebsiella* belong are pathogenic and can cause pneumonia, sepsis, local abscess and infection of the respiratory tract. Genus *Klebsiella* is able to form capsules and biofilms, and often possesses multiple antibiotic resistance, therefore *Klebsiella* infections are poorly treated by antibiotics and belong to the most common nosocomial infections. Alternative method may be complex treatment with antibiotics and bacteriophages or only phage treatment using *Klebsiella* bacteriophages.

23 potentially therapeutic *Klebsiella* bacteriophages were selected from various resources. The ranges of bacterial strains hosts for these phages were studied using more than 60 clinical isolates (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Raoultella planticola* and *Raoultella terrigena*) from the Collection of extremophilic microorganisms and typical cultures of ICBFM SB RAS. Eleven phages had a broad range of lytic activity, the rest were highly specialized. Fifteen bacteriophages had a different spectrum of host strains than the therapeutic phage preparations on the market.

Electron microscopy investigation revealed that all studied bacteriophages belong to families *Myoviridae* and *Podoviridae*.

High stability, fast adsorption on cells, short latent period and high productivity for four bacteriophages specific to pathogenic strains of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* were shown.

Complete genomes of five phages were similar to the genomes of phages of the genus Kp32virus, (family *Podoviridae*), genomes of the other two phages – to the genus Jd18virus

(*Myoviridae*) and genus N4virus (*Podoviridae*), respectively. It should be noted that *Klebsiella* phages belonging to the genus N4virus previously had not been previously described.

As a result, the studied bacteriophages have good lytic properties, a wide range of activity, do not contain undesirable genes in genomes and can potentially be used for the treatment of infections caused by *Klebsiella* and *Raoultella* pathogens.

Current problems and prospective lines of phage therapy and phagoprophylaxis

Zakharova J.A., Fedotova O.S.

Yekaterinburg Research Institute of Viral infections of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Yekaterinburg, Russian Federation

It is hard to imagine containment of antibiotic resistance spread in health facilities with a high concentration level of infectious agent sources, wide use of antibiotics, antiseptics and disinfectants, active accumulation and spread of hospital microorganism strains and risk cohort growth without effective antimicrobial remedies such as bacteriophages.

Therapeutic use of bacteriophage preparations is conditioned by their high specific activity and ability to penetrate biofilms. At the same time, there are unwanted effects related to poor effectiveness of empirical phage therapy and formation of resistance to medications.

Transfer of virulence and antibiotic resistance genes by bacteriophages is the hottest issue. In this context, optimization of preparation control techniques at all the manufacturing stages is the primary goal. Techniques that determine specific activity of experimental and production batches call for standardization. Whole genome and chromatographic analysis are necessary for passporting of commercial off-the-shelf preparations. Along with the conventional biological tests on the animals and humans, it is necessary to study the possibility of approving sensitive cell lines and specific test systems that will open new possibilities of organ-preserving technologies and enable us to solve the ethical issues.

Broad perspectives of phagoprophylaxis are determined by its effect on the source of infectious agents, interruption of transmission routes and factors and, by affecting susceptible organisms (focal and preventive decontaminating equipment).

One of the promising innovational trends is the opened-up opportunities for phage engineering so that in the long view they will be applied for therapy of bacterial diseases including oncological ones. Inactivation technologies based on ecologically pure biodegradable products will alleviate concerns with the safety of such artificially created biological modules.

In summary, bacteriophage preparations have a high potential provided that their manufacture is properly managed and they are put to rational use. Development of a technology that would minimize the above risks, further effectiveness studies of these promising prevention-and-treatment-and-prophylactic preparations is a tool of preemptive effect on the incidence and a constituent for provision of epidemiological security within the frame of the current biosafety-of-the-state conception.

The role of probiotics in maintaining the health of modern man

Zhilenkova O.G.

*Federal Budget Institution of Science Gabrichevsky
Moscow Research Institute of Epidemiology
and Microbiology, Moscow, Russia*

The use of modern omic technologies in the last two decades has allowed to obtain new data on the importance of symbiotic microflora in the formation and maintenance of modern human health and the emergence of many diseases. It is shown that the microflora is a kind of extracorporeal organ of the macroorganism, which includes billions of microorganisms (mainly anaerobic) and performs both a regulatory function and a significant contribution to human anatomy and physiology. In natural conditions of dwelling there is no biochemical process, any function of living organisms which would be carried out without direct or indirect participation in them symbiotic (probiotic) microorganisms. More than 90% of Russians have various micro-ecological disorders (dysbacteriosis) and there is a tendency to their constant growth, it becomes obvious how important it is to stop the further destruction of the health of the inhabitants of our country.

The wide practical use of found techniques of correction of the microbial ecology of man through the appointment of probiotics, prebiotics, simbiotics of metabiotics.

For the first time the term "probiotics" as an antagonist of "antibiotics" was introduced in 1954 by F. Vergio, who in his monograph "Anti – und Probiotika" compared various compounds that have both antimicrobial and positive effects on the intestinal microflora. According to GOST R 52349-2005 probiotic (probiotic) is a functional food ingredient in the form of beneficial for humans (non – pathogenic and non-toxic) living microorganisms, which provides a systematic use of food in the form of drugs or as part of food products a beneficial effect on the human body as a result of the normalization of the composition and (or) increase in the biological activity of normal intestinal microflora.

For use in the manufacture of functional food and dietary supplements permitted GOST R 555777-2013 types, which are justified from the point of view of evidence-based medicine recommended bifidobacteria (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. breve*), lactobacilli (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*) and yogurt live culture (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*). Annex 7 of the technical regulations of the Customs Union 021/2011 limits the list of permitted strains to probiotics isolated only from a person who is not able to cause disease and carry out or mediate the transfer of antibiotic resistance genes.

The systematic use of probiotic drugs, dietary supplements and food strengthens the immune system, prevents the development of autoimmune disorders, allergic and atopic pathologies, inflammatory bowel diseases, normalizes the pool of histamine, neurotransmitters and oxalic acid, has hypocholesterolemic antitumor and other positive effects on humans.

The intestinal microbiota forms colonization resistance

to potentially pathogenic microorganisms due to the formation of bacteriostatic low-molecular metabolites (short-chain fatty acids (SCLC), nitric oxide, glutamate, histamine, serotonin, muramyl dipeptide, etc.), participates in the degradation of bacterial toxins, deconjugation of bile acids, production of a wide range of antimicrobial substances of the bactericidal family. Deficiency of bifidobacteria and lactobacilli, synthesizing deconjugate, which transforms cholesterol into insoluble forms, it is from the colon absorbed into the blood, which is accompanied by hypercholesterolemia, and hypertriglyceridemia, resulting in hyperalert is formed of bile and hepatic steatosis and other non-communicable diseases.

CCC (acetic, propionic, oil, milk) maintain optimal pH values in the lumen of the colon; normalization of hemodynamics; block receptors of epithelial cells; regulate gastrointestinal motility (stimulation of peristalsis of the small and large intestine, gastric emptying, reducing food transit time). Normoflora is involved in the synthesis of essential nutrients: b vitamins (thiamine, Riboflavin, pyridoxine, cyanocobalamin, folic, Pantothenic, nicotinic acids), Biotin, vitamin K, such important amino acids as arginine and glutamine; in metabolism of drugs, hormones and carcinogens, including digoxin sulfasalazine and estrogens.

Currently, the most complex molecular and genetic mechanisms of protection of the body from aggressive environmental factors are actively studied. The main principle of operation of protective mechanisms that control the colonization of the gastrointestinal tract, consists in the ability to distinguish the non-pathogenic elements (bacteria-commensals, food) from enteropathogenic. When applying bifidobacteria for 3 weeks showed an increase in the number of T-lymphocytes, T-helper cells, activated T-lymphocytes (CD25+) and NK lymphocytes in peripheral blood. Phagocytic activity of neutrophils and blood monocytes also increased.

Thus, indigenous intestinal flora plays an important role in the formation of the immune response, prevention of inflammatory diseases, regulation of homeostasis.

In our country and abroad, developed a large number of both mono and complex probiotics consisting of several (2 to 30) of different living microorganisms present in the liquid phase and freeze-dried. To create an enriched use of probiotics combined with prebiotic poly – and oligofructose, soybean oligosaccharides, galactooligosaccharides isolated from natural sources or obtained by biotechnological or synthetic methods, as well as various blockers of adhesion and growth inhibitors of pathogenic and opportunistic microorganisms (lectins, antiadhesive, modulators of the synthesis of secretory immunoglobulins, and defensins are various types of, structural components of probiotic microorganisms, their metabolites, etc.), vitamins, minerals.

Many years of experience in the use of probiotics shows that even with prolonged use, the positive effect in individuals is often transient in nature, and sometimes completely absent. There were some reports of the occurrence of long-term use of live probiotic microorganisms, various complications (lactic acidemia in infants, autoimmune diseases, allergic manifestations, opportunistic infections, dysbiotic conditions due to the appointment of large doses of probiotic drugs, etc.). One of the main reasons for this may be the alien nature of the human

microorganisms included in their composition, insufficient consideration of the high species, individual and anatomical specificity of the autochthonous microflora of persons to whom these means of correction of microecological disorders are prescribed.

Based on this, the creation and rational use of probiotics is considered as a strategic direction of alternative medicine aimed at maintaining and restoring human health and increasing its active longevity.

Monitoring of residues antimicrobial substances in meat and management of risks connecting with the production and use of meat products

Yushina Yu.K., Ph.D., Bataeva D.S, Ph.D., Zayko E.V.

V.M. Gorbатов Federal Research Center for Food Systems of RAS

Presently, one of the most acute problem in the meat-processing industry is using of antimicrobial substances and antibiotics. The presence of antibiotics in raw materials makes it difficult to implement a number of technologies up to impossibility of production of some food. Safety requirements (including sanitary-epidemiological, hygienic and veterinary) for food products (including meat) circulating in the territory of the Russian Federation are contained in the Technical Regulations of the Customs Union "On Food Safety" TR TS 021/2011 and TR TS 034/2013 "On the safety of meat and meat products".

These documents establish control of contents the most often used medicinal and feed antibiotics in livestock and veterinary for meat raw materials such as levomycetin, tetracyclic ohmic group Grisinum, bacitracin.

At the same time, at present, more than 2,000 veterinary products are used in veterinary practic, of which about 500 have antimicrobial activity.

According to the Federal State Statistics Service, the production of feed antibiotics is increasing every year, so in total throughout Russia, about one hundred tons of products were produced in 2016 and this indicator only increases every year.

It is absolutely clear that such a control system needs to improve and change both the order of research and extension of the list of antibiotics with established maximum permissible levels of their residues in unprocessed food products of animal origin.

On August 14, 2018, the decision of the Collegium of the Eurasian Economic Commission (ECE) No. 28 of February 13, 2018 came into force, which expanded the list of recommended veterinary medicines for control and fixed the maximum permissible levels of drug residues in unprocessed food products, including meat.

Seventy-two, the most frequently used veterinary drugs (pharmacologically active substances) in the countries of the Customs Union are included in this list with recommended methods of researches their residual quantities.

In production conditions, it isn't possible to conduct researches of incoming raw materials on presence of all the listed antibiotics.

Thus, the basic problem of determining the presence of antibiotics in meat is the lack of a unified rapid detection method.

In this regard, improvement of the methodology of monitoring antibiotics in meat is the actual and perspective direction of a research

The purpose of this study was screening of meat raw materials for the presence of antibiotics and improvement of the existing methodology

The screening researches have shown high percent of presence of antibiotics and antimicrobial agents in meat and meat products.

So, most often the presence of antibiotics is detected in chicken meat (42.9% of the samples studied), the number of positive samples for pork is 35.3%, in beef – 26.7%.

Сравнительный анализ конвертирующих профагов семейства *Siphoviridae* в геномах штаммов *Staphylococcus aureus*, изолированных при вспышках стафилококковых инфекций в России

Абаев И.В., Скрыбин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Дятлов И.А.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk, Российская Федерация

Умеренные бактериофаги и лизогенная конверсия, ассоциированная с определенными факторами вирулентности, играют важную роль в эволюции патогенных бактерий. Для *Staphylococcus aureus* вследствие фаговой конверсии формируется специфический фенотип штаммов-возбудителей стафилококковых токсикоинфекций. Накопление полногеномных данных по возбудителям стафилококковых токсикоинфекций, изолированных на территории России, дало возможность провести сравнительное исследование структуры конвертирующих профагов с учетом клинической и эпидемиологической информации.

Задача исследования заключена в установлении специфических особенностей нуклеотидных последовательностей профагов семейства *Siphoviridae*, ассоциированных с такими формами стафилококковых токсикоинфекций, как эксфолиативный дерматит новорожденных и пищевые токсикоинфекции.

Для исследования использовали результаты полногеномного секвенирования 36 штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита новорожденных и пищевых токсикоинфекций, изолированных в 2013–2016 гг. на территории России. Регионы возможных профагов в геномах *S. aureus* определяли с помощью сервиса PHASTER. На основе определения сайтов интеграции и генов интеграз идентифицировали полноразмерные последовательности двух различных типов профагов семейства *Siphoviridae*, ассоциированных с продукцией эксфолиативного токсина А и энтеротоксина А. Каждый тип профагов включает несколько структурных вариантов. Проведен сравнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей конвертирующих профагов с использованием полногеномных последовательностей *S. aureus*, представленных в GenBank. Для профагов, кодирующих ген эксфолиативного токсина А, выявлено три варианта нуклеотидной структуры, специфичных для клональных групп *S. aureus* CC121, CC15 и CC8. Для профагов, кодирующих ген энтеротоксина А, показано наличие двух вариантов, которые ассоциируются с клональными группами *S. aureus* CC1 и CC30. Показана высокая консервативность нуклеотидной последовательности профагов, кодирующих ген энтеротоксина А, в пределах структурных вариантов, ассоциированных с определенной клональной линией *S. aureus*.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора

Микробиологический мониторинг фагорезистентности условно-патогенной микрофлоры у детей с дисбиозами

Алексанина Н.В.

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Растущее число дисбиотических нарушений микрофлоры кишечника у детей, сопровождающееся выделением большого количества антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных бактерий (УПБ) определяет необходимость использования в качестве альтернативных средств антимикробной терапии бактериофаги. Цель исследования: определение циркуляции и распространенности фагорезистентных штаммов среди УПБ, выделенных от детей с дисбактериозом кишечника. Изучена чувствительность к отечественным препаратам бактериофагов 1370 штаммов УПБ, изолированных из содержимого толстого кишечника детей, проживающих в г. Ростове-на-Дону, в процессе изучения кишечной микробиоты (2015–2017 гг.). Литическую активность бактериофагов изучали методом «стерильного пятна» в отношении *K. pneumoniae* – 233 штамма, *Staph. aureus* – 297, непатогенных стафилококков – 233, *Proteus (vulgaris и mirabilis)* – 205, *E. coli* (L- и Гем+) – 217, *P. aeruginosa* – 185. Выявлен высокий уровень фагорезистентных штаммов (43,5 + 1,8)% и штаммов с низкой чувствительностью к фагам – (10,7 + 1,2)%. Наиболее высокий процент устойчивости зафиксирован у непатогенных стафилококков (66,7 + 4,2)%, у *Proteus* – (53,6 + 4,8)%, *K. pneumoniae* – (51,7 + 4,6)% и *P. aeruginosa* – (41,0 + 4,8)%. Выделение фагорезистентных штаммов УПБ чаще всего регистрировалось из микробных и микробно-грибковых ассоциаций, что особенно характерно для клебсиелл, протеев и кишечных палочек, у которых из ассоциаций выделялось в 1,5–3 раза больше фагоустойчивых культур. Необходимо отметить, что доля устойчивых или с низкой чувствительностью к фагам штаммов среди непатогенных стафилококков была в среднем в 2–3 раза больше, чем у *Staph. aureus* и составила 78,9%. Штаммы большинства исследованных УПБ, за исключением *K. pneumoniae*, были резистентны к Секстафагу, тогда как были чувствительны к соответствующим препаратам монофагов. Таким образом, в нашем исследовании выявлен высокий процент фагорезистентных штаммов среди УПБ, составляющий 54,2% с наибольшей циркуляцией среди коагулазоотрицательных стафилококков, протеев, клебсиелл (более 50%) и с наименьшим среди золотистых стафилококков (менее 20%). Установлена значительная распространенность фагорезистентных штаммов УПБ, выделенных от детей с нарушенным микробиоценозом кишечника, что свидетельствует о необходимости предварительного определения их чувствительности к фагам для решения вопроса о возможности фаготерапии.

Профаги в составе генома клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*

Алексеева А.Е.¹, Бруснигина Н.Ф.¹, Гординская Н.А.²

¹Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация;

²Приволжский медицинский исследовательский университет, Нижний Новгород, Российская Федерация

Цель работы – характеристика профагов, обнаруженных в геноме карбапенем-устойчивых клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae*, принадлежащих сиквенс-типу 395, по результатам полногеномного секвенирования. Полногеномное секвенирование трех изолятов клебсиелл проводили на приборе MiSeq с использованием набора Nextera XT для подготовки ДНК-библиотек. С помощью программы SPAdes проводили выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей de novo. Геномы аннотировали с использованием сервера RAST. Поиск гомологичных последовательностей профагов проводили с помощью сервисов BLASTN и BLASTP.

В геноме исследуемых штаммов *K.pneumoniae* обнаружено наличие нескольких участков, содержащих последовательности профагов. Два изолята характеризуются одинаковым набором и составом профагов. Так, у каждого изолята выявлено 5 участков, два из которых на основании анализа структуры капсидного белка отнесены к P2-подобным фагам семейства *Myoviridae*, а три являются НК97-подобными и принадлежат семейству *Syphoviridae*. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности профагов выявил высокий уровень их сходства. Первая пара P2-подобных профагов характеризуется полной идентичностью с профагом штамма *K.pneumoniae* Goe 62629 (NZ_CP018364.1), вторая пара представлена консервативными P2-подобными профагами, присутствующими в геноме более 50 штаммов клебсиелл, депонированных в базе данных RefSeq NCBI. Третья пара НК97-подобных профагов обладает наибольшим уровнем идентичности (98%) с профагом штамма *K.pneumoniae* k2254 (NZ_FLFR01000017.1), уровень покрытия составил 82%. Четвертая пара НК97-подобных профагов характеризуется лишь 99%-ной идентичностью между изолятами и профагом штамма *K.pneumoniae* Goe 62629. Пятая пара НК97-подобных профагов при полной идентичности имеет 99%-е сходство с последовательностью профага штамма *K.pneumoniae* isolate 23 (NZ_CP016926.1).

У третьего штамма *K.pneumoniae* выявлено лишь 2 участка, содержащих последовательности P2- и НК97-подобных профагов, обладающих 99–100% идентичностью нуклеотидным последовательностям профагов первых двух исследуемых изолятов *K.pneumoniae* (вторая и четвертая пара P2- и НК97-подобных профагов соответственно).

Таким образом, характеристика набора и состава профагов в геноме бактерий расширяет возможности типирования эпидемически значимых штаммов – возбудителей нозокомиальных инфекций.

Иммунологические аспекты фаготерапии

Алешкин В.А.¹, Бочкарева С.С.¹, Ершова О.Н.², Савин И.А.², Бляхер М.С.¹, Алешкин А.В.¹, Фёдорова И.М.¹, Новикова Л.И.¹, Митрохин С.Д.³, Котелева С.И.¹, Киселева И.А.¹, Зулькарнеев Э.Р.¹, Шкода А.С.³

¹Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского, Москва, Российская Федерация;

²Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко, Москва, Российская Федерация;

³Городская клиническая больница № 67 им. Л.А. Ворохобова Москва, Российская Федерация

Борьба с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи (ИСМП), является актуальной проблемой современной эпидемиологии и клинической практики. Алгоритм индивидуализированной фаготерапии может рассматриваться как перспективное направление терапии таких состояний.

В период 2017–2018 гг. были обследованы 28 пациентов с ИВЛ-ассоциированной пневмонией, катетер-ассоциированной инфекцией мочевыводящих путей, инфицированными кистами головного мозга и различными раневыми поверхностями головы, находящиеся в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Штаммы патогенных микроорганизмов высевались из 35 локусов (эндотрахиальный аспират, кровь, моча, ректальный мазок, содержимое кист и отделяемое раневых поверхностей). Вирулентные оригинальные бактериофаги подбирались индивидуально для каждого больного в зависимости от микробной этиологии заболевания (были получены препараты бактериофагов, лизирующие *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *S.aureus*, *K.pneumoniae*). Стерильные фильтраты фаголизатов бактериофагов применялись путем внутрижелудочного введения через зонд, инстилляций в мочевой пузырь, перорального приема, введения в кисту через дренажную систему, а также путем промывания раневой поверхности. У 6-ти пациентов проводилось от 2 до 4 курсов фаготерапии. Для каждого следующего курса подбирался новый, ранее не использованный, штамм бактериофага, активный в отношении выделяемого возбудителя.

В результате проведенной фаготерапии выявлено, что микробиологическая эффективность, выражающая в полной санации или значимом снижении титра возбудителя в инфицированном локусе, была достигнута в 74% случаев. Улучшение клинического состояния было зафиксировано у 21 пациента, причем 10 из них были переведены из отделения ОРИТ. Отсутствие санации локусов наблюдалось у 7 пациентов, однако у 3 из них зафиксировано улучшение клинического состояния.

У 16 пациентов были оценены параметры клеточного (иммунный и интерфероновый статус, продукция цитокинов) и гуморального (наличие антифаговых антител) иммунитета на фоне фаготерапии. Выявлены разнонаправленные изменения показателей иммунного и интерфероновый статуса больных, а также увеличение продукции

как провоспалительных (ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10), так и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10). При проведении повторных курсов фаготерапии в крови больных зафиксировано наличие штаммоспецифических антител.

Оценка эффективности комплексной коррекции нарушения состава микробиоты кишечника у детей бактериофагами, пробиотиками, лактоглобулином

Алешукина А.В., Полищук И.С., Алешукина И.С., Голошва Е.В., Твердохлебова Т.И.

Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель: подобрать схему эффективной коррекции нарушений состава микробиоты кишечника у детей раннего возраста.

Материалы и методы. Обследованы дети (206). Изучение состава микробиоты кишечника проводилось с использованием дифференциально-диагностических сред (НПЦ Оболенск) в соответствии с ОСТ 2003. Микроорганизмы идентифицированы на базе Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics). Для коррекции использовали препарат лактоглобулина против условно-патогенных бактерий и сальмонелл (ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии Роспотребнадзора (ЛГ-УПБС); бактериофаги (Бф) (Микроген), пробиотики (Пр) (бифилиз, бифидумбактерин, и др.).

Результаты и обсуждение. Дизайн исследования: дети были рандомизированы на 4 группы: 1-я – дети с незначительным повышением содержания условно патогенных микроорганизмов (УПМ) (24 случая); 2-я – дети с повышением *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* с измененными свойствами (41 сл.); 3-я – дети до 6 мес, с нарушениями состава микробиоты кишечника за счет увеличения УПМ (70 чел.); 4-я – дети старше 6 мес с длительными декомпенсированными нарушениями микробиоты кишечника (71 сл.). 1-я группа получала курс ЛГ-УПБС, затем последовательно курс Пр. 2-я группа – курс Бф, затем курс Пр. 3-я группа – курс ЛГ-УПБС, затем Бф и следом курс Пр. 4-я группа – курс одновременно ЛГ-УПБС и Бф и следом Пр. Выявление *Staphylococcus sp.* у детей сопровождалось снижением содержания лакто- и бифидобактерий ($44 \pm 2,1$ и $96 \pm 0,8\%$ соответственно). УПБ ассоциировались со *Staphylococcus sp.* в $30,1 \pm 1,9\%$; *Klebsiella sp.* – $17,8 \pm 1,6\%$; *Proteus sp.* – $10,9 \pm 1,3\%$; *Pseudomonas sp.* – $1,4 \pm 0,5\%$. Было обнаружено, что при сочетанном применении ЛГ-УПБС и Бф эффективность коррекции достоверно выше, чем при использовании этих препаратов отдельно. Применение Бф достоверно снижало *S.aureus* ($16,5 \pm 1,5\%$ случаев). После коррекции в $47,2 \pm 2,1\%$ стафилококки не определялись. В $16,4 \pm 1,5\%$ был необходим повторный курс лечения. Стабилизация содержания бифидобактерий и лактобацилл происходила у всех детей.

Т.о. назначение иммунного препарата лактоглобулина в комплексе с бактериофагами и пробиотиками способствовало стабилизации состава микробиоты кишечника у детей раннего возраста при разных степенях выраженности нарушений.

Разработка состава лекарственной формы бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний наружного уха

Анурова М.Н.¹, Алешкин А.В.², Бахрушина Е.О.¹, Бочкарева С.С.², Киселева И.А.², Воробьев А.М.¹

¹Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация;

²Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Наружный отит занимает особое место в структуре воспалительных заболеваний ЛОР-органов. Одной из основных причин развития острого наружного отита является условно-патогенная грамотрицательная бактерия *Pseudomonas aeruginosa*. В ряде случаев данная бактерия вызывает злокачественный наружный отит, тяжелое заболевание при котором летальность составляет до 10%. Инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*, плохо поддаются антибактериальной терапии в связи с множественной резистентностью, она устойчива к действию многих аминогликозидов, цефалоспоринов и фторхинолонов, что затрудняет эффективность лечебных мероприятий у больных.

Применение местных препаратов позволяет достичь более высокой концентрации антибактериального препарата в очаге инфекции, а благодаря отсутствию длительного воздействия на бактериальный агент лекарственного вещества в субтерапевтической дозе сводится к минимуму возможность развития резистентности.

Целью данной работы является разработка состава лекарственного препарата для местного лечения инфекционных заболеваний наружного уха. Действующими веществами разрабатываемого препарата являются бактериофаги, лизирующие бактериальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*: РА 5 и РА 10. Для местной терапии отитов наиболее оптимальной лекарственной формой служат капли.

В качестве растворителей и формообразующих веществ изучали возможность использования смесей воды очищенной и глицерина (ХИММЕД, Россия) в соотношениях 1/2,5 и 1/1,25, макрогола 400 (ХИММЕД, Россия) в соотношении 1/2,5 и смеси макрогола 6 и глицерил каприлокапрата марки Softigen 767 (Cremer, Германия) в соотношении 1/2,5. В качестве антиоксиданта вводили этилендиаминотетрауксусную кислоту, в качестве консерванта использовали парабены. У полученных экспериментальных образцов ушных капель определяли следующие показатели качества: pH, устойчивость бактериофагов в составе лекарственной формы в процессе хранения, агрегативную стабильность, вязкость.

В результате исследования получен состав лекарственной формы с бактериофагами для местного лечения инфекционных заболеваний наружного уха.

Бактериофаги для купирования вспышки, вызванной *Klebsiella pneumoniae*, в отделении реанимации новорожденных

Асланов Б.И., Любимова А.В., Долгий А.А.

Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Введение. В сложившихся условиях одной из актуальных задач современного здравоохранения, в том числе в рамках борьбы с устойчивостью к антибиотикам, является разработка и применение эффективных альтернативных антибактериальных препаратов. Без сомнения, такими средствами могут быть препараты бактериофагов.

Klebsiella pneumoniae является одной из наиболее проблемных возбудителей ИСМП, особенно в условиях реанимации, часто вызывая вспышки, которые трудно поддаются купированию традиционными мерами инфекционного контроля.

Материалы и методы. Для купирования вспышки ИСМП, вызванной *K.pneumoniae*, в отделении реанимации новорожденных применяли коммерческий препарат бактериофага «Секстафаг, пиобактериофаг поливалентный жидкий» ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России. Бактериофаг использовался однократно в день в течение 5 дней путем обработки кожных покровов и слизистой оболочки полостирта и перорально в количестве 1 мл. Чувствительность штамма, вызвавшего вспышку оценивалась методом спот-тестов.

Результаты. В одном из отделений реанимации новорожденных Санкт-Петербурга вспышка началась с двух случаев заноса инфекции, вызванной *K.pneumoniae*. В последующем из 79 пациентов, находившихся в отделении реанимации на период вспышки (июль–август), у 15 развилась внутрибольничная инфекция (ВБИ), вызванная данным штаммом *K.pneumoniae* (частота инфекции составила 19,0 (95% ДИ = 11,0–29,4) на 100 пациентов). Рутинные меры инфекционного контроля, направленные на купирование вспышки, оказались безуспешными. В качестве противоэпидемического средства был использован коммерческий комбинированный препарат бактериофага «Секстафаг», к которому штамм, вызвавший вспышку, оказался высокочувствительным.

После использования препарата бактериофага по описанной выше схеме, удалось полностью элиминировать штамм, вызвавший вспышку в отделении реанимации. В результате фаготерапии частота внутрибольничного инфицирования *K.pneumoniae* снизилась до нуля и оставалась на этом уровне больше месяца, когда вновь начали происходить заносы инфекции в отделение.

Заключение. Представленные результаты убедительно свидетельствуют о высокой противоэпидемической эффективности бактериофагов. Высокая специфичность и безопасность бактериофагов позволяет рекомендовать их в качестве эффективного средства купирования вспышек ИСМП, особенно в условиях неуклонно растущей устойчивости возбудителей к антибиотикам.

Специфичность бактериофагов рода *Providencia*

Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Специфичность характеризуется наличием или отсутствием литической активности бактериофагов в отношении гетерологичных бактерий.

Изучение специфичности бактериофагов рода *Providencia* проводили на плотном питательном агаре методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры (Ганюшкин, 1988; Золотухин, 2007). Изучение специфичности бактериофагов F-67 УГСХА, F-67 УГСХА проводили по отношению к представителям следующих видов: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, а так же *Streptococcus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*

На поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 3–4 капли 18-часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды стерильным шпателем. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15–20 мин. После чего на чашках размечали маркером два сектора: на первый сектор засеянного агара легким прикосновением пипетки наносили капли исследуемого бактериофага; на второй сектор по центру в качестве контроля наносили стерильный МПБ. Чашки наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37°C. Оценку результатов проводили через 18–24 часа. Установлено, что селекционированные фаги неактивны по отношению к представителям бактерий других родов и видов.

Бактериофаги *Providencia*, используемые для создания биопрепарата по деконтаминации пищевых продуктов

Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Работа посвящена определению спектра литической активности бактериофагов *Providencia*. Бактерии рода *Providencia* удавалось чаще выделять на свиноводческих, реже на молочных фермах. Бактерии данного вида были обнаружены в продуктах питания: газированной воде в Греции в 2005 г.; куриных яйцах в США; устрицах из реки Кокоса в Бразилии; рыбе – окуне пойманной в реке Волга; колбасе салями из домашней птицы в Словакии. Следовательно, данные бактерии могут вызывать пищевые инфекции.

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры

в жидких или плотных питательных средах. Активность по методу Аппельмана выражается максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки литической активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема по методу Грациа.

В качестве исследуемых культур использовали 28 (2 референс штамма и 26 выделенных нами «полевых») штаммов бактерий рода *Providencia*.

В результате проведенных исследований нами установлено, что изученные фаги обладали разным диапазоном литической активности. Широким диапазоном по отношению к изучаемым культурам обладают фаги F-73 УГСХА и F-17 УГСХА – 60,7%, F-20 УГСХА, F-1 УГСХА и F-28 УГСХА – 64,3%, F- 9 УГСХА и F-41 УГСХА – 53,6%, F-67 УГСХА – 85,7%, F-87 УГСХА – 82,1%.

Для дальнейшего изучения отобрали два бактериофага с наибольшим диапазоном по отношению к изучаемым культурам – фаг F-87 УГСХА, который лизировал 82,1% и фаг F-67 УГСХА – 85,7% штаммов бактерий рода *Providencia*, а в сумме фаги проявили литическое действие в отношении 96,4% всех исследованных культур.

Проведенные исследования показали, что наибольшим спектром литической активности обладали два бактериофага *Providencia*, это F – 67 УГСХА и F – 87 УГСХА. Данные штаммы фагов были отобрали для конструирования диагностического биопрепарата.

Бактериофаги *Providencia*

Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Бактерии рода *Providencia* широко распространены в природе, их выделяют из воды, почвы, фекалий и мочи животных и человека. Эффективность лечебных мероприятий во многом зависит от своевременности диагностики болезни, поэтому совершенствованию методов лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых указанными микроорганизмами, является актуальной проблемой.

Источником для выделения бактериофагов служили сточные воды. В качестве индикаторных культур были использованы 26 патогенных штаммов рода *Providencia*. Селекцию штаммов фагов производили методом пассирования штаммов на индикаторных культурах с последующим клонированием однородных негативных колоний, типичной для каждого изолята. Активность выделенных фагов определяли по методам Грациа и Аппельмана.

В результате проведенных исследований нами было выделено 16 термостабильных изолята бактериофагов, образующих прозрачные колонии различного диаметра от 1,0 до 5,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм. Литическая активность выделенных фагов по методу Аппельмана составляет от 10^{-6} до 10^{-9} , по методу Грациа – от $2,1 \times 10^8$ до $1,2 \times 10^{11}$ фаговых корпускул в 1 мл среды. Изучение специфичности

двух бактериофагов (F-67 УГСХА, F-87 УГСХА), имеющих высокую активность и широкий диапазон литического действия проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*. Нами было выделено и селекционировано 16 термостабильных изолятов фагов, активных в отношении бактерий вида *Providencia rettgeri*.

Отобраны два специфичных штамма фагов с наиболее выраженными биологическими свойствами, которые позволяют использовать их для изготовления диагностических биопрепаратов. Индикаторные бактериофаги F-87 и F-67 УГСХА представляют собой прозрачную жидкость желтоватого цвета (цвет засеянной среды), без посторонних примесей, осадка и имеют титр не ниже 10^8 .

Эти показатели биологических свойств соответствуют требованиям, предъявляемым к производственным штаммам фагов, поэтому мы их использовали для конструирования диагностического биопрепарата.

Оценка чувствительности к бактериофагам эквоаров коагулазонегативных стафилококков, циркулирующих в детском стационаре

Беляева Е.В., Борискина Е.В., Ермолина Г.Б., Шкуркина И.С., Кряжев Д.В.

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

Применение бактериофагов в лечебных целях является известной альтернативой использования антибиотиков. В 2016–2017 гг. в детском стационаре г. Н.Новгорода были выделены 344 культуры коагулазонегативных стафилококков (КНС) из глаз, ушей, зева, носа и кожных складок новорожденных, а также из крови и с интубационных трубок пациентов ОРИТ и из смывов с манипуляционных столиков и с рук медперсонала. Среди КНС основную долю составляли *S.epidermidis* (133 штамма), *S.haemolyticus* (157 штаммов) и *S.hominis* (24 штамма), отличавшиеся полирезистентностью к антибиотикам.

Цель работы – изучение чувствительности к бактериофагам эквоаров КНС, циркулирующих в детском стационаре г. Н.Новгорода.

Литическую активность бактериофагов производства НПО «Микроген» оценивали методом «стерильного пятна» с учетом результатов по пятибалльной шкале (от «–» до «++++»).

Тестирование культур на чувствительность к бактериофагам показало, что большинство исследованных нами штаммов устойчиво к их действию. Так, к пиобактериофагу поливалентному (г. Уфа) и секстафагу (г. Пермь) были резистентны $53,3 \pm 13,3\%$ и $33,3 \pm 12,6\%$ штаммов *S.warneri*, $55,5 \pm 17,6\%$ – *S.lugdunensis*, $69,6 \pm 3,3\%$ и $66,5 \pm 3,4\%$ – *S.epidermidis*, $77,4 \pm 7,6\%$ и $71,0 \pm 8,9\%$ – *S.hominis*, $82,4 \pm 2,8\%$ и $76,9 \pm 3,1\%$ – *S.haemolyticus*, соответственно. К интести-бактериофагу (г. Н.Новгород) были устойчивы от 77,8 до 96,8% всех исследованных культур КНС, к пиобактериофагу комплексному

(г. Н. Новгород) – от 72,8 до 87,1% штаммов *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, однако культуры *S.lugdunensis* и *S.warneri* лишь в 22,2 ± 14,7% и 46,7 ± 13,3% случаев, соответственно. К выше перечисленным бактериофагам были устойчивы также 4 из 5 культур *S.simulans*. Наиболее чувствительны исследованные штаммы КНС были к стафилококковому бактериофагу (г. Нижний Новгород): от 0% (*S.lugdunensis*) до 35,5 ± 8,7% (*S.hominis*) резистентных штаммов. Устойчивыми к действию всех пяти тестируемых бактериофагов оказались 29,0 ± 8,9% штаммов *S.hominis*, 20,9 ± 3,0% – *S.epidermidis*, 17,6 ± 2,8% – *S.haemolyticus* и 1 из 5 штаммов *S.simulans*.

Таким образом, штаммы *S.haemolyticus*, *S.epidermidis* и *S.hominis*, доминирующие среди циркулирующих в детском стационаре КНС, обладали не только полирезистентностью к антибиотикам, но и высокой устойчивостью к фаговым препаратам, что выдвигает проблему своевременного обновления применяемых бактериофагов.

Эффективность повторной фаготерапии экспериментальной клебсиеллезной инфекции у мышей

Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Мякина В.П., Верёвкин В.В., Красильникова В.М., Соловьева Е.В., Воложанцев Н.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Российская Федерация

Бактериофаги являются «оружием» направленного действия в борьбе с бактериальными инфекциями. Возрастающий интерес к ним со стороны исследователей и практических врачей связан прежде всего с поиском путей преодоления лекарственной устойчивости бактерий. Природное свойство фагов специфически взаимодействовать с бактериальной клеткой позволяет избегать негативного влияния на нормофлору организма. Однако бактериофаги могут восприниматься макроорганизмом как чужеродные антигены, против которых включаются механизмы иммунного ответа, способные нейтрализовать их.

Цель исследования – оценка эффективности повторного применения бактериофага KpV289 для лечения летальной рецидивной инфекции у мышей, обусловленной штаммом *Klebsiella pneumoniae* KPM9.

Клебсиеллезную инфекцию моделировали на аутбредных белых мышах. На первом этапе животных заражали внутримышечно (левое бедро) культурой гипермукоидного штамма KPM9 в дозе 4×10^3 КОЕ. Через три часа начинали лечение фагом KpV289, который вводили мышам внутривентрально один раз в сутки в течение пяти дней в количестве 10^8 БОЕ. Через две недели после окончания лечения выживших животных делили на две равные группы, одну из которых вновь заражали летальной дозой штамма KPM9 и повторно лечили фагом по описанной выше схеме.

В результате проведенных экспериментов установлено, что после первого курса фаготерапии экспериментального

клебсиеллёза выживает 90% животных при гибели 100% мышей в контрольной группе. Все выжившие животные оказались санированными от возбудителя инфекции. После повторного внутримышечного заражения культурой *K. pneumoniae* KPM9 и последующего курса фаготерапии выжило 100% мышей. Бактериологический анализ показал отсутствие в их организме клеток патогена. Мыши из контрольной группы погибали в период с 3 по 5-е сутки. Титр антител (IgG) к фагу KpV289 в сыворотках крови мышей после первого курса терапии составлял от 1 : 800 до 1 : 1600, а после повторного – возрастал до 1 : 32 000 – 1 : 512 000. В экспериментах *in vitro* показано, что несмотря на высокие титры IgG, антифаговая сыворотка не оказывала существенного нейтрализующего действия на бактериофаг KpV289.

Таким образом, бактериофаг KpV289 обладает выраженным терапевтическим эффектом как при однократном, так и при повторном курсовом использовании для лечения летальной инфекции у мышей, вызванной *K. pneumoniae* KPM9.

Работа выполнена по проекту РНФ 15-15-00058П.

Актуальные проблемы применения бактериофагов в практике

Брусина Е.Б.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Российская Федерация

Глобальное распространение мульти- и панрезистентных к антимикробным средствам штаммов микроорганизмов определяет необходимость более широкого применения бактериофагов для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. Вместе с тем, существует целый ряд проблем, препятствующих применению бактериофагов в практике. Прежде всего, должна быть гарантирована безопасность бактериофагов с позиций возможного присутствия генов факторов вирулентности, генов антибиотикорезистентности, продуктов жизнедеятельности бактерий, эндо и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток, что требует полногеномного секвенирования используемых фаговых штаммов, применения надежных методов очистки. Для повышения эффективности бактериофагов необходимы сбор актуальных клинических штаммов бактерий и адаптация к ним фагов в процессе производства. С одной стороны, действующее санитарное законодательство не позволяет бактериологическим лабораториям медицинских организаций хранить культуры бактерий, с другой – существует недостаточная заинтересованность производителя к преодолению этой проблемы. Для обеспечения эпидемиологической безопасности пациентов препарат должен быть в упаковке на одного пациента, формы его должны быть разнообразны, в том числе в виде аэрозоля. Необходима разработка экспресс-метода определения эффективности применения бактериофага. Недостаточен и спектр препаратов бактериофагов. Необходимы коммерческие монофаги против *Acinetobacter spp.*, *Serratia spp.*,

Burholderia cepacia complex. Одним из существенных препятствий являются недостаточные знания докторов о бактериофагах, что может быть преодолено включением в программы непрерывного медицинского образования соответствующих тем. Кроме того, из-за отсутствия многоцентровых исследований эффективности бактериофагов невозможно составить систематический обзор или мета-анализ, позволяющие получить доказательные данные, необходимые для клинических рекомендаций. Важным аспектом является отсутствие исследований безопасности бактериофагов для новорожденных детей с низкой и экстремально низкой массой тела. Все эти многочисленные проблемы препятствуют применению бактериофагов в практике.

Антибиотикограмма бактерий рода *Klebsiella* и *Staphylococcus aureus* под влиянием специфических бактериофагов

Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.

Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Тюмень, Российская Федерация

История применения антимикробных препаратов в лечении инфекционных заболеваний продемонстрировала возможность адаптации многих штаммов микроорганизмов к антибиотикам. Одним из способов решения проблемы антибиотикорезистентности возбудителей гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной природы является использование бактериофагов. Учеными разработаны схемы лечения с применением бактериофагов как в монотерапии, а также в комбинации с антибиотиками. Опубликованы данные, подтверждающие эффективность лечения при совместном использовании фаго- и антибиотикотерапии. Но необходимо помнить, что бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и приобретении ими новых свойств, благодаря феномену фаговой или лизогенной конверсии.

В ходе исследования проведено изучение чувствительности бактерий рода *Klebsiella* и *Staphylococcus aureus* к различным антибактериальным препаратам до и после суточного взаимодействия специфического бактериофага и штамма.

Сравнительная характеристика антибиотикограммы стафилококков показала, что после взаимодействия с фагом увеличилось количество штаммов, резистентных к оксациллину и цефалоспорином (цефалексиму, цефуроксиму), а также к гентамицину и офлоксацину. При этом статистически значимые различия выявлены только по гентамицину (критерий Мак-Немара).

Под влиянием бактериофага клебсиелл поливалентно на чувствительность к антибиотикам бактерий рода *Klebsiella* установлена тенденция к увеличению количества чувствительных штаммов к антимикробным препаратам (гентамицину, тетрациклину, офлоксацину, ампициллину, цефотаксиму и цефтазидиму). При этом статистически

значимые отличия регистрируются только по тетрациклину, отношение шансов возрастает в два раза. Минимальные отличия в антибиотикограмме, скорее всего, являются проявлениями фенотипической вариабельности экспрессии одного из механизмов резистентности.

Таким образом, проведенные исследования влияния специфических коммерческих бактериофагов, производства АО НПО «Микроген» на чувствительность бактериальных культур к антибиотикам свидетельствуют о разнонаправленных взаимодействиях в различных популяциях бактерий *in vitro*. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости дополнительного изучения данного вопроса с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования.

Использование бактериофагов PP16 и PP17 против *Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum* в защите картофеля

Васильев Д.М.¹, Воронина М.В.¹, Бугаева Е.Н.¹,
Кабанова А.П.², Мирошников К.А.², Игнатов А.Н.¹

¹Исследовательский центр «ФитоИнженерия»,
с. Рогачево, Московская обл., Российская Федерация;

²Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

В последнее время наблюдается быстрое распространение бактериозов картофеля, вызываемых различными видами энтеробактерий рода *Pectobacterium*. Применение химических пестицидов в защите картофеля ограничено их неэкологичностью или невысокой эффективностью. В Исследовательском Центре «Фитоинженерия» входящем в группу компаний Индустриального парка «Рогачёво» (МО) с 2012 г. ведется разработка и применение эффективных бактериофаговых препаратов против возбудителей бактериозов картофеля в период хранения и предпродажной подготовки.

В 2017 г. мы провели оценку биологической эффективности применения штаммов бактериофагов PP16 и PP17 для защиты растений картофеля от поражения пектолитическими бактериями в поле. В предварительных исследованиях бактериофаги PP16 и PP17 показали высокую вирулентность к преобладающим штаммам *P. carotovorum subsp. carotovorum* (Pcc). Бактериофаги применяли для предпосадочной обработки клубней. В исследовании использовали среднеустойчивый к бактериозам сорт картофеля Айл оф Джура. Обработку проводили распылением на клубни рабочего раствора (фунгицид + микроудобрение) и препарата бактериофагов (10^9 – 10^{10} БОЕ/мл). Контролем считали вариант без бактериофагов. Препарат бактериофага представляет собой смесь очищенных фаголизатов Pcc. Эффективность действия препарата определяли по степени снижения развития бактериоза при оценке популяций патогенных бактерий микробиологическими, молекулярными методами, а также по положительному влиянию на всхожесть клубней и урожайность растений в фазе технической спелости.

Первоначальный инфекционный фон Pcc в посадочном материале составлял в среднем 121,7 тыс. КОЕ/клубень. В собранном урожае, в контрольном варианте данный

показатель составил 2,5 млн. бактерий на клубень. В опытном варианте с применением бактериофагов концентрация Рсс снизилась в 10 раз и составила 233,3 тыс. КОЕ/клубень. Применение бактериофагов оказало положительный эффект на всхожесть клубней, повысив ее больше, чем в 5 (85% по сравнению с 15% в зараженном контроле). Урожайность в контроле составила 0,7 кг/м², в опытном варианте 4,65 кг/м², таким образом прибавки составила 567,5%.

Применение бактериофагов для предпосадочной обработки семян позволяет повысить всхожесть клубней, что, в свою очередь, обеспечивает повышение урожайности по сравнению с контролем, а также снижает заражение пектолитическими бактериями клубней картофеля нового урожая.

Эффективность комплексной коррекции лямблиоза пробиотикотерапией

Васюнин А.В., Куимова И.В., Краснова Е.И., Гаврилова Н.И., Сурдина Т.Г., Кибирева Е.Н.

Новосибирский государственный медицинский университет, Новосибирск, Российская Федерация;
Детская городская клиническая больница №3, Новосибирск, Российская Федерация

Инфицированность лямблиями населения Земного шара является достаточно высокой (90% и более в течение года). Клиническая симптоматика возникает не более, чем у 1/3 пациентов. По рекомендациям ВОЗ лечение лямблиоза целесообразно проводить пациентам с наличием клинической симптоматики.

Цель исследования. Оценить эффективность комплексного лечения лямблиоза у детей от 1 до 3 лет в амбулаторных условиях.

Материал и методы исследования. Под наблюдением находилось 32 пациента в возрасте от 1 до 3 лет. Все дети получали терапию в течение 1 мес (последовательно курсами по 10 дней) – *Saccaromyces boulardii* по 1 капсуле 2 раза в день, далее бак-сет беби по 1 порошку 2 раза в день и в заключении лактобактерии ацидофильные+грибки кефирные по 1 капсуле 3 раза в день. Кроме этого, с 11 по 17-й день дети получали лигнин гидролизный по ½ таблетки 2 раза в день. Диагноз лямблиоза подтверждался обнаружением цист лямблий в копрограмме и антител в сыворотке крови методом ИФА. Кроме этого, до и после коррекции проводили посев кала на дисбактериоз кишечника.

Результаты исследования. У всех пациентов имели место клинические проявления. Диспептические проявления в виде снижения аппетита, метеоризма, расстройства стула (разжижение). Синдром сыпи имел место у 1/3 пациентов, абдоминально-болевой синдром у 2/3 больных (боль в околопупочной области). До коррекции из кала высевалось 2,8 условно-патогенных микробов в повышенном диагностическом титре, после коррекции высевалось 0,4 микроба на 1 пациента. Нарушения нормофлоры имели место у всех пациентов, в конце наблюдения состав нормофлоры восстановился. Исчезли клинические

проявления. Цисты лямблий после коррекции через 1 месяц обнаруживались у 8 (25%) пациентов, через 1,5 мес – у 2 (6,3%), через 2 мес – не обнаруживались.

Выводы. Таким образом, восстановление состава и количества нормофлоры кишечника способствует освобождению макроорганизма от лямблий. Пробиотикотерапия оказывает нормализующий эффект на нормофлору кишечника, санирующий эффект в адрес условно-патогенной микрофлоры.

Полисахарид-деполимеразы капсулоспецифичных бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*

Воложанцев Н.В.¹, Соловьева Е.В.¹, Красильникова В.М.¹, Мякина В.П.¹, Верёвкин В.В.¹, Борзилов А.И.¹, Шпирт А.М.², Книрель Ю.А.²

¹Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск, Новосибирск, Российская Федерация;

²Институт органической химии имени Н.Д.Зелинского, Москва, Новосибирск, Российская Федерация

Для преодоления углеводного барьера бактерий многие бактериофаги используют специфические ферменты – полисахарид-деполимеразы, которые расщепляют полисахаридные соединения, обеспечивая тем самым адсорбцию фага на рецепторах наружной мембраны, проникновение фаговой ДНК и лизис бактериальной клетки. Фаговые деполимеразы являются привлекательным и перспективным средством для контроля таких патогенных бактерий, как *K. pneumoniae*, основным фактором вирулентности которых является ярко выраженная полисахаридная капсула.

Цель работы – выявление и клонирование генов полисахарид-деполимераз (Ps-dep) бактериофагов *K. pneumoniae* и характеристика их продуктов.

В результате проведенных исследований клонированы и экспрессированы в клетках *E. coli* гены Ps-dep фагов KpV71, KpV74 и KpV79, лизирующих *K. pneumoniae* капсульных типов K1, K2 и K57, соответственно; выделены и очищены продукты клонированных генов – белки Dep_kpv71, Dep_kpv74 и Dep_kpv79; показана ПС-деградирующая активность рекомбинантных белков. Определен спектр активности ПС-деполимераз по отношению к штаммам *K. pneumoniae* разных фено- и генотипов. Показано, что рекомбинантные белки обладают более выраженной (по сравнению с «родительскими» фагами) специфичностью по отношению к полисахаридам соответствующих типов.

Установлено, что деполимеразы Dep_kpv74 и Dep_kpv79 являются специфическими глюкозидазами, расщепляющими полисахариды *K. pneumoniae* капсульных типов K2 и K57 по β-глюкозидным и β-галактозидным связям, соответственно, с образованием мономеров и димеров тетрасахаридного повторяющегося звена полисахарида. Протеин Dep_kpv74 является бифункциональным белком и кроме β-глюкозидазной активности определяет, как предполагается, связь бактериофага с первичными рецепторами – полисахаридами капсулы.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что обработка вирулентных гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* K2-типа деполимеразой Der_kpv74 приводит к существенному снижению их вирулентности для мышей и обеспечивает выживаемость животных при развитии острого *K. pneumoniae*-сепсиса.

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования ПС-деполимераз капсулоспецифичных фагов *K. pneumoniae* для определения капсульных типов микроба, а также о перспективах их использования в качестве терапевтического средства.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 15-15-00058П).

Отбор холерных бактериофагов для создания экспериментального профилактического препарата

Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожова М.П.

Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени Научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Новосибирск, Российская Федерация

Угроза возникновения масштабных эпидемий и вспышек холеры на различных континентах мира определяет необходимость постоянного мониторинга холеры, предотвращения ее распространения, подчеркивает важность оптимизации современной профилактики и терапии.

Всемирная организация здравоохранения рекомендует профилактические меры включающие массовые вакцинации против холеры. Но, у вакцины есть противопоказания: аллергия, возраст, беременность и грудное вскармливание. Несмотря на то, что химиопрофилактика с антибиотиками эффективна при холере, побочные реакции на антибиотики хорошо известны. В сложившейся ситуации альтернативу антимикробным препаратам в профилактике бактериальных инфекций могут составить бактериофаги.

В связи с этим целью нашей работы было подобрать перспективные холерные бактериофаги для создания профилактического фагового препарата.

Нами была проведена *in vitro* оценка бактериофагов холерных вибрионов из коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора с целью подбора наиболее эффективных штаммов фагов. При отборе фагов учитывались следующие показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов. Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (pH 7,6 – 7,8).

В работу были отобраны 3 холерных фага, лизирующие вибрионы O139 и O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor, из которых создана новая фаговая композиция,

в соотношении 1 : 1 : 1. Спектр литической активности одного из фагов имеет широкий диапазон, включающий холерные вибрионы биоваров Classical (64,6%) и El Tor (56%). Диапазон литической активности второго фага распространяется только на холерные вибрионы биовара El Tor, но в высоком проценте (70%). Третий бактериофаг обладает высокой литической активностью в отношении *V. cholerae* O139 серогруппы (50%).

По данным электронно-микроскопического исследования №1 и №2 холерные бактериофаги относились к семейству *Podoviridae*, фаг №3 к семейству *Inoviridae*.

Таким образом, нами показана перспективность разработки новой фаговой композиции для профилактики заболевания холерой. В настоящее время работа в данном направлении продолжается.

Применение бактериофагов в программе лечения больных с гнойно-некротическими заболеваниями легких и плевры

Гостищев В.К., Горбачева И.В., Золотарев Д.В., Теляшов А.Д.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

В связи с ростом ИСМП вызываемой мультиустойчивой флорой интерес представляет применение бактериофагов в комплексном лечении пациентов с гнойно-некротическими заболеваниями легких и плевры. С 2013 по 2018 гг. в ГКБ им. И.В.Давыдовского (базе кафедры общей хирургии ПМГМУ им. И.М.Сеченова) было пролечено более 300 больных с острой и хронической эмпиемой плевры, абсцессом легкого. В опыте смена автохтонной флоры на нозокомиальную наступает уже через 2–3 сут с полным замещением к 9 суткам, а пациенты с данной патологией находятся на госпитализации 2 недели и более. Мы использовали комбинированный препарат из коммерческих бактериофагов. В случае длительного предоперационного нахождения больного в стационаре, где уже имеется какой-либо из перечисленных нозокомиальных штаммов, комбинированный препарат позволяет бороться с уже присутствующей инфекцией и предупредить смену доминирующего возбудителя. Ежедневно после санации плевральной полости физиологическим раствором вводился препарат, активный в отношении нозокомиальной флоры, в концентрации 10⁷–200,0 мл через дренажную трубку с экспозицией около 2 ч. В дальнейшем дренирование плевральной полости проводилось пассивно. Если больные находились в стационаре более 3 сут, то антибактериальная терапия включала антибиотики активные в отношении внутрибольничной флоры в комбинации с энтеральным введением бактериофагов. В случае терапии абсцессов легкого при отсутствии сообщения с плевральной полостью препарат вводился при бронхиальных санациях объемом не более 10 мл и энтеральным путем. Возможно

использование ингаляционного метода введения препарата. При использовании бактериофагов, ни в одном случае не отмечено присоединения внутрибольничной флоры из группы *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* и *Escherichia coli*. Использование активных бактериальных вирусов позволяет предупредить инфицирование органов в результате бактериальной транслокации нозокомиальной флорой в 69,2% случаев. Идеальная фаготерапия – типоспецифичные фаги для каждого стационара с учетом своего собственного внутрибольничного микробного пейзажа. Критериями прекращения использования бактериофагов являются купирование ССВР, устранение источника инфицирования, микробиологически верифицированное снижение внутриплевральной контаминации ниже 10^5 КОЕ/мл. Общая продолжительность терапии бактериофагами составила в среднем 10 дней.

Вклад Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной в фундаментальные и прикладные исследования в области создания и применения бактериофагов

Григорьева Г.И., Соловьева И.В.

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

История конструирования и производства, изучения эффективности бактериофагов, создания алгоритмов их использования для диагностики лечения и профилактики кишечных инфекций в институте берет свое начало с 1935 года. В это время были запланированы две темы НИР «Эпидемиологическое значение водного дизентерийного и тифа-паратифозного бактериофага» и «Изучение эффективности дизентерийных прививок и бактериофагопрофилактика» Первые результаты исследования были опубликованы в 1940 году. В этом же году организуется производственный отдел с «бактериофаговым» отделением. На основе маточных фагов, полученных из Московского и Тбилисского НИИ начинают производиться дизентерийный и брюшнотифозный бактериофаги. В 1942 г. на основе рас фагов, полученных из лаборатории Ермольевой З.И. был налажен производственный выпуск жидкого монофага (холерный бактериофаг). Всего в период Великой Отечественной войны было изготовлено более 56 тысяч литров дизентерийного и холерного бактериофага, что помогло справиться с распространением этих инфекций на фронтах и в тылу. Начиная с 50-х годов прошлого века, в соответствии с основным профилем института, систематически проводилось изучение этиологии кишечных инфекций, расширялись представления о роли сальмонелл, энтеропатогенных кишечных палочек и протеев в патологии человека. Так было улучшено качество дизентерийного бактериофага, созданы бактериофаги тифимуриум «Бреслау фаг» (1957), сальмо-неллезный группа АВСДЕ

(1960), коли-протейный (1959). Изучено и показано их лечебное, saniрующее и профилактическое действие. В 1975 г. был создан таблетированный, сухой, адаптированный, поливалентный дизентерийный бактериофаг с ацидорезистентным покрытием, а в 1979 году таблетированный сальмонеллезный. Фаги, как и любые иммунологические препараты, требуют постоянной работы с ними для увеличения валентности. В связи с этим, начиная с 50-х годов создаются и пополняются коллекции рас фагов и патогенных микроорганизмов, циркулирующих в регионе.

На основе результатов фундаментальных исследований по изучению метаболизма бактерий, проводимых в институте, разрабатывались новые питательные среды, методы культивирования, то есть модернизировался технологический процесс производства.

С 1954 по 1987 гг. было опубликовано более 80 печатных работ, защищено 2 докторские и 7 кандидатских диссертации, посвященных разработке, технологии производства и изучению эффективности бактериофагов.

В настоящее время в институте проводятся исследования геномов бактериофагов клинических изолятов энтеробактерий и микроорганизмов группы так называемых неферментирующих грамотрицательных бактерий, а также создание алгоритмов комплексного применения автоторских пробиотиков и бактериофагов.

Оценка состояния микробиоценоза кишечника при различных нарушениях микробного и ферментного пищеварения по критерию резистентности микроорганизмов к бактериофагам

Гудова Н.В., Оганесян А.С., Затевалов А.М., Селькова Е.П., Волчецкий А.Л.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Цель исследования: оценить наиболее часто встречающиеся типы нарушений пищеварения в зависимости от вида изолируемых микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам.

Материалы и методы. Сравнивалась частота встречаемости заболеваний с нарушением микробного и ферментного пищеварения в зависимости от вида фагочувствительных микроорганизмов, выделенных из кала. Выполнено бактериологическое исследование фекалий с определением чувствительности изолированных штаммов условно-патогенной микрофлоры к бактериофагам.

Результаты и выводы. Оценивалась частота встречаемости нарушений ферментного и микробного пищеварения у пациентов в зависимости от вида изолированных штаммов условно-патогенной микрофлоры, чувствительной к бактериофагам. Исследуемая выборка была разбита на группы в соответствии с типом нарушения ферментного и микробного пищеварения. По данным

анализа факторных соответствий были получены следующие результаты:

1. Максимальное значение (0,107) относительных частот встречаемости фагорезистентной микрофлоры отмечалось при нарушении желчеотделения, а меньшее значение (0,0921) – при энтероколите. Следующее значение по убывающей (0,0649), отмечалось для фагочувствительной *E.coli* при нарушении желчеотделения.

2. В рамках данной выборки при нарушении желчеотделения и дисбиозе не встречались чувствительные к бактериофагам *Enterococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* При аллергии и гастрогенном синдроме не встречался фагочувствительный микроорганизм *Proteus spp.*, при цекальном синдроме – *Proteus spp.* и *Enterococcus spp.*, при энтероколитах – *Staphylococcus spp.*, при колите – *Enterococcus spp.*

3. Достоверное снижение частоты встречаемости фагочувствительной микрофлоры отмечено для *E.coli* при нарушении желчеотделения (37,15%), а для *Proteus spp.* при колите (8,33%).

Определение бактериофагов с помощью мини-антител методом электроакустического анализа

Гулий О.И.^{1,2}, Зайцев Б.Д.³,
Караваева О.А.¹, Бородина И.А.³

¹Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Российская Федерация;

²Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов, Российская Федерация;

³Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А.Котельникова РАН, Саратов, Российская Федерация

Вирусы бактерий представляют собой прекрасный природный материал для изучения поливалентных взаимодействий со специфичными антителами (Ат), поэтому широко используются для разработки методов детекции вирусных частиц. К распространенным методам определения бактериофагов относятся иммунологические методы, основанные на определении вирусных антигенов с помощью физических методов анализа. Пьезоэлектрические резонаторы с поперечным электрическим полем представляют особый интерес для исследования свойств биологических жидкостей, поскольку характеризуются высокой чувствительностью и возможностью анализа биологических объектов непосредственно в жидкой фазе. В практике получения Ат все большее применение находит технология, заключающаяся в представлении высокоаффинных фрагментов Ат на поверхности нитевидных фагов (технология фагового дисплея Ат). Полученные нами ранее данные позволили использовать технологию фагового дисплея для разработки мини-Ат, специфичных к бактериофагам. Оптимальным носителем выбрана мембрана western s, количество антигена не менее $\times 10^{12}$ бактериофагов/мл. Показана возможность определения бактериофагов с помощью специфичных фаговых мини-Ат методом электроакустического анализа на примере бактериофагов, выделенных

из клеток *Azospirillum lipoferum* SR65. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора с суспензией бактериофагов и соответствующими антителами значительно отличались от зависимостей резонатора с контрольной суспензией вирусов без добавления мини-Ат. Содержание бактериофагов ФАI-SR65 в анализируемой суспензии варьировалось от $\sim 10^{10}$ до 10^6 фагов/мл, а время анализа не превышало 5 мин. Оптимально информативным параметром для получения достоверной информации являлось изменение реальной или мнимой частей электрического импеданса на фиксированной частоте вблизи резонанса при внесении в исследуемую суспензию специфичных мини-Ат. Таким образом, применение технологии фагового дисплея позволило получить мини-Ат, специфичные к бактериофагу ФАI-SR65, и показать возможность их применения для регистрации взаимодействия с бактериофагами для определения вирусов методом электроакустического анализа. Результаты открывают перспективы разработки биологического датчика для определения вирусов в жидкой фазе.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ № 16-07-00818 и № 16-07-00821.

Разработка биопрепарата полифага в качестве дезинфицирующего средства бактериальных инфекций

Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зинина Н.Н.,
Сармыкова М.К., Конбаева Г.М., Алиханов К.Д.,
Исабеков С.С., Досанов К.Ш., Шестаков А.Г.,
Васильев Д.А.

НИИ проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский, Казахстан

Сдерживающими факторами развития животноводства и птицеводства являются инфекционные болезни, среди которых лидирующие места по степени распространения в Казахстане занимают бактериальные инфекции: бруцеллез, псевдотуберкулез, сальмонеллез, колибактериозе, диарейные болезни молодняка вызываемых условно-патогенной микрофлорой.

Среди ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на предупреждение заразных болезней сельскохозяйственных животных и борьбу с ними, важное место занимает дезинфекция. Можно констатировать, что применение дезинфицирующих препаратов в настоящее время не приводит к столь значительному эффекту. Одной из причин, снижающих эффективность применения антимикробных препаратов, является то, что вследствие неадекватного применения, формируются полиантибиотикорезистентные штаммы микроорганизмов, при обретающих все новые патогенные свойства, что приводит к их чрезвычайно широкому распространению. В настоящее время растет интерес к дезинфицирующим препаратам, обладающим высокой эффективностью и низкой токсичностью, в этой связи поиск новых высоко-

эффективных средств для дезинфекции, профилактики и лечения особо актуален на фоне экологических изменений окружающей среды.

Одним из наиболее перспективных подходов для поиска эффективных средств является использование естественных антагонистов бактерий, каковыми являются литические бактериофаги и разработка дезинфектантов на их основе.

В отделе микробиологии НИИ проблем биологической безопасности проводятся исследования по разработке новых композиций из выделенных различных бактериофагов.

Проведенные испытания показали эффективность био-препарата полифага для подавления роста большого ряда микробов, что свидетельствует о возможности практического его применения в животноводстве, птицеводстве и пищевой промышленности.

Распространенность фагорезистентности среди условно-патогенных бактерий в кишечном микробиоценозе у лиц с проявлениями дисбиотических нарушений

Завгородняя Е.Ф.

Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии Роспотребнадзора, Хабаровск, Российская Федерация

Проблема нарушения кишечной микробиоты продолжает оставаться актуальной. Проведен анализ данных по распространенности фагорезистентных условно-патогенных бактерий (УПБ) в кишечной микробиоте пациентов, обследовавшихся на выявление дисбактериоза. Изучена чувствительность к бактериофагам 1 616 штаммов УПБ, в том числе 460 – *S.aureus*, 369 – *Klebsiella pneumoniae*, 212 – *Klebsiella oxytoca*, 263 – *E.coli* (лак -), 171 – *E.coli* (гем+), 39 – *Citrobacter spp.*, 18 – *Enterobacter spp.*, 40 – *Proteus vulgaris* и 44 – *Proteus mirabilis*. Литическая активность бактериофагов определялась методом «стерильного пятна». Использовались отечественные бактериофаги производства «Микроген» (Н. Новгород и Пермь) и «Иммунофермент» (Уфа).

Установлено, что в период 2016–2018 гг. у 80,0% обследованных лиц дисбиотические нарушения были обусловлены увеличением УПБ; в 2014 г. этот показатель не превышал 50,0%. Фагорезистентность выявлена у 54,1% УПБ, что выше уровня предыдущих лет (46,2%). По-прежнему остается высокой распространенность фагорезистентности у *Proteus spp.*, *Klebsiella pneumoniae* и *oxytoca* (77,2; 75,9 и 74,5% соответственно). В течение последних трех лет остается высоким уровень резистентности у *E.coli* (лак -) – 34,9%. Против этого же периода увеличилась до 53,2% циркуляция *E.coli* (гем+).

Распространенность фагорезистентных штаммов у *S. aureus*, *Enterobacter spp.* и *Citrobacter spp.* составила 30,0; 38,8 и 48,7% соответственно. Таким образом, установлена значительная, возрастающая в динамике, циркуляция фагорезистентных штаммов УПБ при дисбактериозе кишечника.

Оценка резистентности микроорганизмов к бактериофагам при различных нарушениях микробного и ферментного пищеварения

Затевалов А.М., Селькова Е.П., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Волчецкий А.Л.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Цель исследования: оценить наиболее часто встречающиеся виды изолируемых микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам при различных нарушениях пищеварения.

Материалы и методы. 521 пациент в возрасте от 18 до 86 лет с заболеваниями ЖКТ. Сравнивалась частота встречаемости фагочувствительных микроорганизмов в зависимости от синдрома нарушения ферментного и микробного пищеварения. Выполнено бактериологическое исследование кала с определением чувствительности изолированных штаммов условно-патогенной микрофлоры к бактериофагам.

Результаты и выводы. Оценивалась частота встречаемости нарушений микробиоценоза кишечника с изолированными штаммами условно-патогенной микрофлоры, чувствительными к бактериофагам, превышающие 10% от титра всех изолированных условно-патогенных микроорганизмов. Вся исследуемая выборка была разбита на группы по виду микроорганизмов. При сравнении типов нарушений микробного и ферментного пищеварения в анализируемых группах были отмечены следующие тенденции:

1. Для различных типов ферментного и микробного пищеварения не отмечалось достоверных отличий в частоте обнаружения фагочувствительной микрофлоры. Частота встречаемости микроорганизмов, чувствительных к бактериофагам у пациентов с энтероколитом была минимальна и составила 43%, а с гастрогенным синдромом-максимальна (83%).

2. Во всех исследуемых группах присутствовали фагочувствительные микроорганизмы, такие как *E.coli* и *Klebsiella spp.*, а также отмечалась фагорезистентная условно-патогенная микрофлора. Максимальное значение частоты встречаемости фагочувствительной *E.coli* отмечалось при нарушении желчеотделения, *Klebsiella spp.* и *Enterococcus spp.* при гастросиндроме, *Staphylococcus spp.* при аллергиях, *Proteus spp.* при колите.

3. Достоверное снижение частоты встречаемости (12,5%) фагорезистентной микрофлоры отмечено при гастрогенном синдроме, а максимальное (43,3%) – при энтероколите.

Актуальные проблемы и перспективные направления фаготерапии и фагопрофилактики

Захарова Ю.А., Федотова О.С.

Екатеринбургский НИИ вирусных инфекций
Роспотребнадзора, Екатеринбург, Российская Федерация

Сдерживание распространения антибиотикорезистентности в медицинских организациях, где высок уровень концентрации источников возбудителей инфекций, широко применяются антибиотики, антисептики и дезинфектанты, идет активное накопление и распространение госпитальных штаммов микроорганизмов, увеличиваются контингенты риска, трудно представить без эффективных антимикробных средств – бактериофагов.

Использование препаратов бактериофагов с лечебной целью обусловлено их высокой специфической активностью и способностью проникать в биопленки. Вместе с тем, существуют нежелательные эффекты, связанные с низкой эффективностью эмпирической фаговой терапии, формированием устойчивости к препарату.

Наиболее актуальной является проблема переноса бактериофагами генов вирулентности и антибиотикорезистентности. В этой связи, оптимизация методов контроля препаратов бактериофагов на всех этапах производства является первоочередной задачей. Требуют стандартизации методы определения специфической активности экспериментальных и производственных серий. При паспортизации готового коммерческого препарата – полногеномный и хроматографический анализ. Наряду с традиционными биологическими пробами на животных и человеке необходимо изучить возможность апробации чувствительных линий клеточных культур и специфических тест-систем, что откроет новые возможности органосберегающих технологий и приблизит к решению этических проблем.

Широкие перспективы фагопрофилактики обусловлены их воздействием на источник возбудителя инфекции, прерыванием путей и факторов передачи, воздействием на восприимчивый организм (средства очаговой и профилактической дезинфекции).

Одним из перспективных инновационных направлений являются открывшиеся возможности по созданию генно-инженерных фагов, которые в перспективе могут применяться в терапии небактериальных заболеваний, включая онкологические. Уменьшить опасения в безопасности таких искусственно созданных биологических модулей помогут технологии инактивации на основе экологически чистых биоразлагаемых продуктов.

Таким образом, препараты бактериофагов при должном производственном контроле и рациональном применении обладают высоким потенциалом. Разработка методологии по минимизации указанных выше рисков, дальнейшее изучение эффективности применения этих перспективных лечебно-профилактических препаратов является инструментом упреждающего воздействия на заболеваемость и одной из составляющих обеспечения эпидемиологической безопасности в рамках современной концепции биобезопасности государства.

Бактериофаг *Dickeya* PP35: строение поверхностного полисахарида бактерии обеспечивает инфекцию альтернативного бактериального хозяина

Кабанова А.П.^{1,2}, Шнейдер М.М.¹, Корженков А.А.³, Мирошников К.К.⁴, Здоровенко Э.Л.⁵, Тошаков С.В.^{3,4}, Игнатов А.Н.², Книрель Ю.А.⁵, Мирошников К.А.^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

²Исследовательский центр «ФитоИнженерия», с. Рогачево Московская обл., Российская Федерация;

³Балтийский Федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Российская Федерация;

⁴Федеральный исследовательский центр «Фундаментальная биотехнология», Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН, Москва, Российская Федерация;

⁵Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН, Москва, Российская Федерация

Ограничения на использование антибиотиков в сельском хозяйстве стимулируют развитие альтернативных стратегий борьбы с бактериозами растений. Недавно эволюционировавший вирулентный фитопатоген *Dickeya solani* представляет собой серьезную опасность для картофелеводства, использование бактериофагов для его контроля считается перспективным подходом. В представленной работе детально охарактеризован специфический *Limestonevirus* PP35, миовиридный бактериофаг *D.solani* с геномом размером 152048 пн. Подобные бактериофаги были выделены во многих регионах вспышек бактериозов *D.solani* в Великобритании, Нидерландах, Финляндии и Польше. Диапазон инфицирования PP35 определяется функцией белка хвостового шипа, gp156. Последовательность этого белка высоко консервативна у фагов семейства *Limestonevirus*, специфических к *Dickeya*. С помощью масс-спектрометрии показано, что рекомбинантный PP35 gp156 расщепляет О-полисахарид *D. solani* на октамерные фрагменты. Структура полисахарида, $\rightarrow 2$ - β -D-6-deoxy-D-altrose-(1 \rightarrow), уникальна среди мягкогнилостных *Pectobacteriaceae*. Однако идентичная структура была определена у непатогенной почвенной бактерии, чувствительной к инфекции фагом PP35. Альтернативный бактериальный хозяин *Lelliottia spp.* штамм F154 был генетически охарактеризован, и идентифицированы несколько генов, ответственных за биосинтез О-полисахарида, общих с *D.solani*. Непатогенные бактерии могут играть роль в поддержании пороговой популяции бактериофагов в почве. Также такие бактерии могут использоваться для промышленного производства терапевтических бактериофагов.

Исследование поддержано грантом
РНФ №16-16-00073

Физиологические особенности бактериофагов, заражающих *Bacillus cereus sensu lato*

Казанцева О.А., Пилигримова Э.Г., Загородный В.А., Кулябин В.А., Шадрин А.М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Российская Федерация

В середине 2000-х годов вновь возрос интерес к бактериофагам, который был обусловлен перспективными возможностями применения бактериофагов и их компонентов в медицинской диагностике, пищевой микробиологии и разработке новых противобактериальных средств. Бактериофаги и их факторы адсорбции (специфические белки, участвующие в распознавании целевых микроорганизмов) нашли применение в быстрой идентификации некоторых патогенных бактерий. Кроме того, бактериофаги позиционируются как средство для элиминации патогенных бактерий из пищевых продуктов. Препараты, разработанные на основе бактериофагов, применяются для борьбы с внутрибольничными инфекциями, вызванными бактериальными штаммами, имеющими множественную устойчивость к антибиотикам. Одно из перспективных направлений применения бактериофагов является использование их эндוליзинов. Наиболее известными представителями группы *Bacillus cereus* являются: *B. cereus*, вызывающий пищевые отравления; *B. thuringiensis*, использующийся для изготовления биоинсектицидов; а также *B. anthracis*, вызывающий сибирскую язву. Бактерии группы *B. cereus* способны к росту в пищевых продуктах при низких температурах, а поскольку эти почвенные бактерии повсеместно распространены, они являются одним из наиболее часто встречающихся этиологических агентов, вызывающих пищевые отравления. В этой работе мы описываем свойства трех ранее не охарактеризованных бактериофагов, выделенных на территории России, и их способность инфицировать *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. weihenstephanensis*. Выделенные бактериофаги проявляли литическую активность в широком диапазоне температур. Анализ частично секвенированных последовательностей геномов исследуемых бактериофагов позволил установить, что бактериофаги, выделенные из образцов почв г. Кирова и г. Ижевска, несмотря на различные физиологические характеристики, являются родственными бактериофагами, поскольку участки их геномов имеют высокую степень идентичности с геномами бактериофагов Tsamsa, PBC2, Troll. Участки ДНК бактериофага, выделенного при воздействии митомицином С на штамм *B. cereus* В-83, имели высокую степень идентичности с ДНК плазмид *B. thuringiensis* и *B. mycoides*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Министерства инвестиций и инноваций Московской области в рамках научного проекта № 17-44-500067 p_a

Разработка органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

Каминский В.В., Алешкин А.В., Зилькарнеев Э.Р., Киселева И.А., Ефимова О.Г., Емельяненко К.А., Емельяненко А.М., Бойнович Л.Б.

Московский НИИ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

В задачи настоящего исследования входило изучение антибактериальных свойств органо-неорганических гибридных покрытий на алюминиевом сплаве АМг2, включающих супергидрофильные и супергидрофобные нанотекстурированные металлические подложки с нанесением бактериофаговых частиц.

В ходе экспериментов оценивалась бактерицидная активность ($BA = ((K - Op) / K) \times 100\%$, где BA – бактерицидная активность, K – количество колоний на контрольных пластинах, Op – количество колоний на текстурированных пластинах) поверхностей после искусственной контаминации их 100 мкл бактериальной суспензии в титре 10^7 КОЕ/мл. Для повышения антибактериального эффекта пластин на их поверхность сорбировали бактериофаг в титре 10^9 БОЕ/мл, для фиксации его на поверхности использовали органический растворитель. Титр бактерий и бактериофагов определяли на 1, 4 и 6 сутки после контаминации.

В эксперименте использовали оригинальные вирулентные бактериофаги, представители семейств *Podoviridae* и *Myoviridae*, активные в отношении основных видов бактерий возбудителей ИСМП: *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *A. baumannii* и *P. aeruginosa*.

В результате проведенных экспериментов, моделирующих возможность распространения возбудителей ИСМП, можно сделать вывод о более высокой БА супергидрофильных поверхностей по сравнению с супергидрофобными, которая для *P. aeruginosa* 3086 составляла 99% и 45% на 1-е сутки эксперимента, для *A. baumannii* В-05 99% и 0% на 1-е сутки эксперимента, для *K. pneumoniae* 811 – к 6-суткам 99% и 91% соответственно.

Нанесение бактериофаговых частиц не предотвращает первичную колонизацию текстурированных металлических поверхностей использованными в опыте штаммами, однако, в ряде случаев повышает ее БА. Так, во второй серии экспериментов с *A. baumannii* В-05 и бактериофагом АМ24 БА супергидрофобных поверхностей выше практически на 100% к 6-м суткам исследования, в опыте с *K. pneumoniae* 811 и фагом КрV811 – выше на 7,5% к 6-м суткам, а в опыте с *P. aeruginosa* 3086 и бактериофагом РА10 БА выше на 46%, чем БА супергидрофобных пластин без сорбированных бактериофагов. На супергидрофильных поверхностях с бактериофагом КрV811 БА к 4-м суткам равнялась 100%, а на покрытиях без бактериофага составила 99%.

Стафилококковый бактериофаг SSP134 специфичный к широкому кругу коагулазо-негативных стафилококков

Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Ушакова Т.А., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

В последние годы коагулазонегативные стафилококки (CoNS) стали возбудителями инфекций у человека и домашних животных, в том числе они являются одной из причин внутрибольничных инфекций. Бактериофаг SSP134 был выделен из клинического образца. Круг хозяев фага SSP134 определяли, используя 175 штаммов бактерий рода *Staphylococcus* ранее изолированных от людей и животных и депонированных в Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Было протестировано восемьдесят девять коагулазо-положительных штаммов, относящихся к видам *S. aureus* и *S. pseudintermedius/intermedius*, и восемьдесят шесть коагулазо-отрицательных штаммов. Выяснилось, что бактериофаг SSP134 был активен против 26 штаммов, относящихся к видам *S. aureus*, *S. warneri*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. equorum*, *S. capitis*, и *S. succinus*. Таким образом, SSP134 является литическим фагом, который заражает широкий спектр стафилококков.

По данным электронной микроскопии бактериофаг SSP134 относится к семейству *Podoviridae*. Секвенирование ДНК фага выявило геном размером 18275bp. Геномный анализ последовательности выявил 20 потенциальных OPT. Геном был депонирован в GenBank [KY471386]. Согласно филогенетическому анализу генома SSP134 и сходных с ним последовательностей из базы данных GenBank фаг SSP134 был отнесен к роду P68virus.

Таким образом, фаг SSP134 обладает литическими свойствами, не содержит в геноме нежелательных последовательностей и может быть потенциальным кандидатом для терапии CoNS инфекций.

Бактериофаг MS2 – средство для таргетной химиотерапии опухолей

Колесанова Е.Ф., Большакова Т.Н., Рыбалкина Е.Ю., Сивов И.Г.

ООО «Биотехнология», Москва, Российская Федерация

Частицы бактериофага MS2 могут быть использованы для терапии солидных опухолей. С этой целью их наполняли солями одновалентного таллия с одновременной модификацией их поверхности конъюгацией iRGD пептидами, полученными методами химического синтеза пептидов. Пептид, получали методом твердофазного синтеза, циклизовали за счет S-S-мостика и ковалентно конъюгировали с белками капсида фага через спейсер. Соли таллия использовали для преодоления лекарственной устойчивости клеток опухоли, iRGD пептиды – для высоко аффинного связывания частиц с поверхностью патологической кровеносной системы опухоли.

Контроль количества таллия проводили методом флуоресценции с четвертичной натриевой солью пирен-1,3,6,8-тетрасульфоновой кислоты, чистоту и структуру синтезированных iRGD пептидов контролировали методами ВЭЖХ и масс-спектрологии. Эффективность действия полученных частиц подтверждена экспериментами на культурах клеток (линия MCF7 – гормон зависимый рак молочной железы – РМЖ, или MDA-MB-231 – гормон независимый РМЖ) или на мышах линии Nude, MCF7- или MDA-MB-231-ксенографы. По результатам экспериментов на животных терапевтический индекс составил около 15000, а суммарная концентрация TiNO3 для получения терапевтического эффекта была меньше LD50 в 500 000 раз.

Гистологические препараты отсканировали на ScanScore CS2 (гистологические образцы в светлом поле), а полученные цифровые изображения исследовали на предмет отношения площадей некротизированной ткани к общей площади опухоли. Эксперименты на животных с полученными частицами контролировали в экспериментах с частицами без наполнения, либо частицами без химической модификации лигандами. Показано, что масса опухоли снижается при действии полученных частиц не менее чем в 2,5 раза ($p \leq 0,01$).

Полученные результаты позволяют позитивно оценить эффект усиления действия солей одновалентного таллия в таргетных препаратах, приготовленных на основе фага MS2.

Работа выполнена в рамках Госконтракта с Минобрнаукой РФ № 14.N08.11.0188 от (27.11.2017) (уникальный идентификатор проекта 1717710539135771 00100100030807219241).

Пептид для направленного транспорта синтезирован с использованием оборудования ЦКП «Протеом человека», поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения соглашения № 14.621.21.0017 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62117X0017).

Псевдолизогения *Staphylococcus epidermidis* по SPβ-подобному бактериофагу

Корниенко М.А.¹, Купцов Н.С.¹, Манолов А.И.¹, Кострюкова Е.С.¹, Любасовская Л.А.², Припутневич Т.В.², Шитиков Е.А.¹, Летаров А.В.³, Ильина Е.Н.¹

¹ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА, Москва, Российская Федерация;

²Научно-исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии, Москва, Российская Федерация;

³ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт микробиологии им. Виноградского, Москва, Российская Федерация

Бактериофаги реализуют жизненные циклы двух типов: литический или лизогенный. Однако есть данные о «третьем способе» взаимодействия фагов и бактерий – псевдолизогении, при которой клетка, инфицированная фагом, продолжает расти и делиться, несмотря на репликацию генома фага; производство потомства фага

и/или лизис клетки при этом ингибируются. Нами были получены данные полногеномного секвенирования для трех штаммов *Staphylococcus epidermidis* (SE) (SE36-1, SE41, SE528), выделенных от новорожденных с синдромом позднего неонатального сепсиса. SE41 и SE528 были сходны с известными клиническими изолятами, а SE36-1 обладал уникальными особенностями: анализ сборки генома (APHS00000000) *de novo* показал наличие последовательности сходной с SPβ-подобным профагом штамма SE RP62A (позиции 1567637 – 1694334; NC_002976.3) с крайне высоким относительным покрытием (x30), что было подтверждено ПЦР в реальном времени. С помощью секвенирования по Сэнгеру фаговая последовательность в SE36-1 была замкнута в кольцо (127726 bp). При индукции митомицином С культуры SE36-1 выделены два вида фаговых частиц – StB20 и SPβ-подобные, названные phSt36-1. ДНК фаговых частиц phSt36-1 идентична последовательности SPβ, входящей в геном SE36-1. Электронная микроскопия ультратонких срезов SE36-1 морфологических изменений, связанных с репликацией ДНК фага не выявила. Тем не менее, активная репликация фаговой ДНК должна приводить к существенной физиологической нагрузке на клетку, что подтвердили данные о сниженной скорости роста SE36-1 по сравнению с SE41, SE528. Был проведен скрининг коллекции SE ($n = 63$) на присутствия фага phSt36-1 с использованием ПЦР-праймеров, дифференцирующих его интегрированное и внехромосомное состояние. Все изоляты, принадлежащие к сиквенс типам ST2 и ST22 ($n = 24$) были положительными как для интегрированной, так и внехромосомной ДНК-фага. Остальные изоляты ($n = 39$), не содержали этого профага. Так приобретение профага phSt36-1, по-видимому, является относительно недавним событием. В то же время только в штамме SE36-1 мы наблюдали псевдолизогению phSt36-1 фага, тогда как все остальные изоляты были классическими лизогенами. Универсальное распределение профага phSt36-1 в ST2 и ST22, вместе с уникальным характером штамма SE36-1, позволяет предположить, что псевдолизогенный штамм SE36-1 происходит от предка, аналогичного другому изоляту этих сиквенс типов.

Фаговые пептидные библиотеки как инструмент изучения профиля специфичности антител

Колосова Е.А.^{1,2}, Мурашкин Д.Е.^{1,2}, Морозов И.В.³, Ильичев А.А.¹, Шаповал А.И.², Щербаков Д.Н.^{1,2}

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Кольцово, Российская Федерация;

² Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация;

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Различные патологические процессы в организме вызывают изменение профиля специфичности циркулирующих антител. Наиболее успешно эта особенность используется для серологической диагностики

инфекционных заболеваний, и реже – для диагностики аутоиммунных заболеваний. В последние годы появились многочисленные свидетельства о наличии подобной связи между профилем антител и типом опухоли. Существование подобной связи в сочетании с внедрением методов высокопроизводительного секвенирования создает предпосылки для создания методов универсальной серологической диагностики на основе анализа профиля специфичности антител. Фаговые пептидные библиотеки экспонирующих огромное разнообразие случайных пептидов представляют собой практически идеальный инструмент для получения профиля специфичности поликлональных препаратов антител.

Классическая процедура аффинной селекции (биопеннинга) предполагает отбор единичных фаговых клонов и определение аминокислотных последовательностей их пептидов с использованием секвенирования по Сэнгеру. Использование методов высокопроизводительного секвенирования позволяет получить данные о совокупности пептидов, экспонируемых на бактериофагах всей библиотеки или ее редуцированных вариантов, получаемых в процессе биопеннинга. Было решено провести апробация этого подхода на образцах сывороток онкобольных.

Материалом исследования служили панели сывороток больных РМЖ и здоровых индивидуумов. В работе использовали фаговую пептидную библиотеку, экспонирующую в составе главного поверхностного белка рVIII, рандомизованные чужеродные пептиды длиной 6, 8, 10, 12 а.о., а также пептиды кольцевой структуры с6с, с8с, с10с, с12с. Проводили один раунд аффинной селекции. Для уменьшения количества неспецифических взаимодействий биопеннинг проводили на магнитных частицах с белком А. После сбора элюатов, определяли титр бактериофагов методом Грациа. Концентрация варьировалась 10^4 – 10^8 БОЕ/мл.

Для NGS анализа при помощи ПЦР проводили амплификацию участка ДНК, кодирующего аминокислотные последовательности чужеродного пептида. Для этого были использованы индекс-праймеры, включающие последовательности баркода для секвенирования.

Анализ множества последовательностей показал наличие набора пептидов, с которыми взаимодействуют антитела сывороток больных РМЖ и не взаимодействующих с антителами сывороток здоровых.

Бактериофаги и пробиотики в коррекции дисбиоза кишечника при пищевой аллергии

Косякова Н.И., Андреева Л.А.

Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, Российская Федерация

Попытки коррекции дисбиоза кишечника только пробиотиками или фагами не всегда приводят к желаемому эффекту. С целью повышения эффективности лечения пищевой аллергии проведены клинико-экспериментальные, иммуно-серологические, молекулярно-биологические,

микробиологические и биохимические исследования у 108 пациентов в возрасте от 1 года до 65 лет с верифицированным диагнозом пищевой аллергии, которая сопровождается дисбиозом кишечника в период ремиссии кожных и респираторных проявлений. Среди причинно-значимых аллергенов выявлена сенсibilизация к аллергену пшенице, белкам коровьего молока, овальбумину, яблоку и другим косточковым, клещам домашней пыли. Учитывалась и перекрестная аллергия. Экспериментально было показано более эффективное влияние совместного культивирования пробиотика «Бифидумбактерина» производства «Партнер» Россия и «Секстафага» производителя «Микроген» Россия с культурой *E.coli*-лактозопозитивной, *E.coli*-лактозонегативной, *E.coli* 0142 и *Proteus vulgaris*. Пациенты методом простой рандомизации были распределены на 4 группы: 1 гр. – лечение стандартной терапией ($n = 25$); 2 гр. – стандартная терапия + Бифидумбактерин ($n = 22$); 3 гр. – стандартная терапия + Секстафаг ($n = 22$); 4 гр. стандартная терапия + Бифидумбактерин и Секстафаг ($n = 39$). По клиническим критериям, микробиологическим и биохимическим исследованиям кала для оценки степени дисбиоза наилучшие результаты были получены у пациентов гр.4.

В этой же группе отмечена более выраженная положительная динамика показателей цитокинового профиля в сыворотке крови и копрофильтратах (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4 и IL10). В гр. 2 и 3, при сравнении между собой, по продолжительности ремиссии, клиническим проявлениям, качеству жизни, коррекции дисбиоза кишечника и цитокиновому статусу, статистически значимых различий при лечении, как стандартной терапией + Бактериофаг, так и стандартной терапией + Бифидумбактерин получено не было. Таким образом, клинико-экспериментальное исследование показало, что для повышения эффективности лечения пищевой аллергии целесообразна терапия Бактериофага совместно с Бифидумбактерином на фоне стандартной базисной терапии пищевой аллергии.

Фагорезистентность условно-патогенной флоры кишечника у жителей урбанизированного севера

Куяров А.А., Сайгушева Л.А., Дудко Е.Ф., Куяров А.В.

Сургутский государственный университет,
Сургут, Российская Федерация

Важным направлением в производстве бактериофагов для коррекции микрофлоры кишечника является информационный потенциал формирования фагорезистентности с учетом возрастных и региональных особенностей.

Цель работы. Определить диапазон фагорезистентности условно-патогенной флоры кишечника у жителей урбанизированного Севера.

Материалы и методы. Проведен анализ 585 результатов исследования кала на дисбактериоз и условно патогенную микрофлору кишечника у лиц в возрасте от 1 до 60 лет на базе БУ ХМАО–Югры «Сургутская городская клиническая поликлиника №1» (зав. лабораторией Е.Ф.Дудко). Исследования микробиоты и оценка результатов

проводились по стандартной методике, идентификация микроорганизмов проводилась методом времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS) с помощью анализатора микроорганизмов BioMerieux VITEK MS MALD1-TOF. Литическая активность бактериофагов изучалась методом «стерильных пятен» с использованием комплексного пиобактериофага (производитель ФГУП «НПО «Микроген» Минздрава России, г. Нижний Новгород) у 191 штамма *S. aureus* и 116 штаммов *Klebsiella pneumoniae*.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований установлено, что у детей 1 года и в возрасте от 2 до 7 лет среди изолятов *S. aureus* частота фагорезистентных штаммов составляла 28,7 и 29,0%, соответственно. В группе исследуемых 8–18 лет этот показатель имел тенденцию к увеличению (38,5% случаев) и был на уровне 25,0% в старших возрастных группах. Среди изолятов *K. pneumoniae* частота фагорезистентных штаммов у детей 1 года составляла 63,9% и увеличивалась до 75,0% у детей следующей возрастной группы. В возрасте от 8 и до 18 лет *K. pneumoniae* выделялись в единичных случаях. В старших возрастных группах у изолятов *K. pneumoniae* фагорезистентные штаммы наблюдались в 25,0% случаев, при этом в подавляющем большинстве случаев эти штаммы были резистентны к бактериофагу *S. aureus*. Важно отметить, что исследуемые штаммы условно-патогенных микроорганизмов выделялись при условиях биоценоза кишечника с дефицитом лактобацилл более чем в 90,0 % случаев.

Заключение. Установленный диапазон фагорезистентности наиболее часто идентифицированных условно-патогенных микроорганизмов при нарушении биоценоза кишечника у жителей урбанизированного Севера определяет условия применения фагокоррекции и возможность учета региональных особенностей в производстве бактериофагов.

Выявление эндогенных бактериофагов у реанимационных больных при бактериемии и сепсисе

Лазарева Е.Б.¹, Черненькая Т.В.¹, Шабанов А.К.¹, Евдокимова Н.В.¹, Жиленков Е.Л.², Петриков С.С.¹

¹НИИ скорой помощи им. Н.В.Склифосовского
Департамента здравоохранения г. Москвы,
Москва, Российская Федерация;

²ООО НПЦ «МикроМир», Москва, Российская Федерация

В настоящее время отсутствуют сведения о роли собственных эндогенных бактериофагов в профилактике и лечении гнойно-воспалительных осложнений.

Целью работы явилось изучение влияния эндогенных бактериофагов на частоту летальных исходов у реанимационных больных при бактериемии и сепсисе.

Материалы и методы. Обследовано 25 больных с тяжелой сочетанной травмой. Из них было 8 женщин и 17 мужчин. Средний возраст составил $48,3 \pm 18,3$ лет. Получено 28 проб крови. Посевы крови выполняли с помощью автоматического анализатора гемокультур *Bactec*-9050 (*Becton Dickinson*). Идентификацию выделенных микроорганизмов

проводили на автоматическом анализаторе WalkAway-40 (USA). Эндогенные фаги выделяли из проб крови и мочи. Работу с бактериофагами выполняли на основании традиционных вирусологических методов. Бактериофаги, извлеченные из зон лизиса после спот-тестирования, были исследованы на электронном микроскопе JEOL-1011 (Япония).

Статистическую обработку проводили с использованием показателя Х².

Результаты исследования. Бактериофаги были выделены у 10 больных. В крови этих пациентов присутствовали: в 4 случаях *Klebsiella pneumoniae*, в 3 – *Acinetobacter sp.*, в 2 – *Staphylococcus sp.*, и по одному – *S. aureus* и *Enterococcus faecalis*. Из группы больных, у которых выделили эндогенные фаги, умерло 4 человека (40%). При этом у 2 пациентов присутствовали собственные фаги, гомологичные *Staphylococcus aureus* и *S. epidermidis*, которые затем элиминировались. В дальнейшем у этих больных были выделены штаммы *K. pneumoniae*, к которой отсутствовали эндогенные фаги. Пациенты погибли на фоне этой инфекции. Из 15 больных, у которых отсутствовали бактериофаги, умерло 9 (60%). У этих 15 больных в крови присутствовали: в 5 случаях – *S. aureus*, в 2 – *Staphylococcus sp.*, в 5 – *K. pneumoniae*, в 2 – *Acinetobacter sp.* и в 1 – *Enterobacter aerogenes*.

Выводы. Летальные исходы достоверно чаще встречались у пациентов при отсутствии собственных эндогенных бактериофагов.

Опыт применения литического бактериофага SE40 для биоконтроля за *Salmonella Enteritidis* на птицеводческом хозяйстве

Лаишевцев А.И.¹, Алешкин А.В.², Киселева И.А.², Каминский В.В.², Зилькарнеев Э.Р.²

¹Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.Р.Коваленко РАН, Москва, Российская Федерация;

²Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Применение антибиотиков для подавления роста патогенной флоры в ветеринарии спровоцировало формирование и широкое распространение антибиотико-резистентных штаммов в сельском хозяйстве, что в свою очередь повышает риск возникновения неподдающихся лечению спорадических случаев и вспышек инфекций передающихся пищевым путем. Бактериофаги, как строго-специфичные антибактериальные агенты могут стать эффективным инструментом биоконтроля за данными патогенами как в ветеринарной практике, так и в медицинской.

Цель исследования заключалась в разработке и адаптации схемы эффективного использования фагового препарата на предприятиях с напольным содержанием птиц.

Испытание проводилось в условиях птицеводческих предприятий РФ, на которых в течение 2017 года обнаруживалась *Salmonella Enteritidis*. Для работы был использован

литический бактериофаг SE40 выделенный из образца почвы Московской области. Бактериофаг перед использованием на промышленной птице успешно прошел все доклинические испытания и доказал свою безопасность и эффективность в лабораторных условиях, и в условиях вивария.

В испытании была использована птица, содержащаяся напольным образом в количестве 120 000 голов начиная с 70-дневного возраста, испытания проводились в течение 4 мес. Обработка птицы проводилась посредством выпаивания фагового препарата с титром 10⁹ БОЕ/мл, разовая доза на птицу составляла 10⁸ БОЕ. Поскольку птица содержалась напольным образом, то с целью деконтаминации подстилки, в чередовании с выпойкой, была рекомендована аэрозольная обработка фагом всех помещений, содержащих птицу. Антибиотики с профилактической целью во время испытания не применялись.

Оценку эффективности использования бактериофага проводили благодаря ежемесячному бактериологическому мониторингу, для чего отбирались следующие образцы: клоакальные смывы – 5 свабов с корпуса (5 голов на сваб); степ-пробы – 2 пары с корпуса; корпусная пыль – 1 объединенная проба с корпуса; смывы с напольного и инкубационного яйца – по 1 пробе (с 10 яиц); смывы с ленты яйцесбора – 1 проба с корпуса.

С момента начала использования бактериофагов при посевах слепых отростков и клоакальных смывов *Salmonella Enteritidis* обнаружено не было, что доказывает эффективность использования фагового препарата. При посеве степ-пробы, были случаи выделения *Salmonella Enteritidis*, что объясняется наличием высокого слоя подстилки на момент начала опыта.

Потенциал для применения бактериофагов в антираковых стратегиях: мегапаттерновая кросс-презентация, вирус-подобные наночастицы, бактериальные оболочки

Лахтин В.М., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Байракова А.Л., Алешкин В.А.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Цель – оценка имэджевых стратегий твердофазного распознавания паттернов с возможностью применения бактериофагов (БФ) против опухолей. 1. Мегапаттерновая кросс-презентация. Анализ тарджетинговых антираковых стратегий с использованием лектиновых и других паттерно-распознающих рецепторов (ПРР) антигены-презентирующих клеток (АПК) врожденного иммунитета выявил новый потенциал рецепторных лектинов (РЛ, одного из классов ПРР) в сочетании с иммунорецепторами и другими типами ПРР. БФ характеризуются как протяженные (мега)паттерновые имэджи для кросс-презентации антигенов. Известны примеры сочетания БФ (филаментных и других) с РЛ (например, DEC205) в антираковых

стратегиях. 2. Вирус-подобные наночастицы (ВПНЧ). БФ-стратегии могут адаптироваться в соответствии с представлениями о конструкциях ВПНЧ с направленно нагруженными экспонированными ландшафтными паттернами. ВПНЧ и БФ могут действовать как сильные адьюванты, усилители кросс-презентации и ответов врожденного и адаптивного иммунитета. При этом мегпаттерны ВПНЧ и БФ распознаются/ считываются/ сканируются кофункционирующими (наведенными, адаптированными к каждому мегпаттерну) гомо/ гетеродимерными и более сложными контактными рецепторными ассоциатами (в том числе ковалентно закрепленными) с участием РЛ, других ПРР и CD. В результате на поверхности способных к фагоцитозу АПК адаптируются в межрецепторных криптах новые (мега)специфичности распознавания мегпаттернов ВПНЧ и БФ. Рециклическое многоазовое использование межрецепторных ассоциатов в процессах фагоцитоза, доставки в сомы и реинтеграции в клеточную поверхность лежит в основе мультиповторности/ мультикопийности распознавания. 3. Бактериальные оболочки. Бактериофаговые лизаты бактерий проявляют выраженное противоопухолевое действие. При этом паттерны оболочки бактерий могут меняться и контролироваться технологиями, как и в случае ВПНЧ. Для обеспечения специфического тарджетинга в клеточные слои, ткани и органы, где располагаются опухоли, их метастазы, микроокружение опухолевых клеток с помощью фаговых дисплеев, нагруженных пептидами тропизма (с RGD-обусловленной адгезией, действием пептидов хоминга), возможна доставка противоопухолевых средств. Заключение. Проведенный анализ расширяет и обосновывает противоопухолевой потенциал БФ, придает новый импульс перспективного применения БФ в антираковых стратегиях и разработке антираковых вакцин.

Разработка схемы фагоидентификации бактерий рода *Klebsiella*

Ляшенко Е.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р., Самойлов Д.А.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Метод фагоидентификации успешно применяется в ветеринарной и медицинской практике. С помощью специфических бактериофагов, многие исследователи идентифицировали большой процент патогенных культур в течение 48 часов.

Используя строгую специфичность отобранных бактериофагов К-10 и К-81 серии УГСХА по отношению к штаммам клебсиелл, мы разработали схему ускоренной идентификации данных микроорганизмов.

Подготовку и посев проб материала, подлежащего исследованию, проводили в соответствии с ГОСТами «Методы бактериологического анализа». В качестве материала для исследований использовали воду, комбикорм, мясо и фекалии контаминированные бактериями рода *Klebsiella* в концентрациях 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 м.к. в 1 мл.

Выделение и идентификацию чистых культур

микроорганизмов проводили в соответствии с правилами, изложенными в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии МСХ и П 11 октября 1999 года.

После этапа микроскопирования при обнаружении в мазках однородных мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, располагающихся единично парами или короткими цепочками, исследуемую бульонную культуру, подвергали фагоидентификации и идентифицировали по биохимическим свойствам. По результатам изучения биохимических свойств определили родовую принадлежность культур.

Фагоидентификацию проводили на плотном питательном агаре методом нанесения капель фагов на подсушенный газон 6–18-часовой исследуемой культуры. Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного штамма фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса фага. При отрицательном результате проводили изучение ферментативных свойств выделенных микроорганизмов.

По результатам фагоидентификации во всех исследуемых объектах установлено наличие бактерий рода *Klebsiella* в концентрации 10^4 м.к./мл. При исследовании фекалий чувствительность понижалась до 10^5 м.к./мл из-за обильной обсемененности посторонней микрофлорой.

Предложенная нами схема выделения и ускоренной идентификации бактерий рода *Klebsiella* с помощью специфических бактериофагов К-10 и К-81 серии УГСХА, позволяла сократить сроки исследования в два раза (48 часов). В то время как бактериологический метод исследования занимал 96 часов.

Способ выделения и параметры культивирования бактериофагов *Bacillus coagulans*

Мартынова К.В., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Алешкин А.В.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Проведенные исследования по выделению бактериофагов *Bacillus coagulans* из 18 проб пищевого сырья и продуктов питания (томатный сок и маринованные томаты домашнего и заводского изготовления, томатная паста, кетчуп, специи, морковь свежая, свекла свежая) позволили установить, что из исследуемых фильтратов методом нанесения «дорожки» на газон культуры было выделено 3 бактериофага, специфичных для штаммов *Bacillus coagulans*.

Установлено, что используя метод «смылов» негативных колоний выделенных бактериофагов и применение метода фильтрации с использованием мембранных фильтров фирмы Millipore (filter type: 0,1 и 0,22 μm GV) для очищения фаголизата от бактериальных клеток является

наиболее оптимальным методом выделения бактериофагов *Bacillus coagulans*.

Селекцию выделенных бактериофагов проводили десятикратным пассированием. Эмпирическим методом было подобрано оптимальное соотношение бактериофага и индикаторного штамма из следующих вариантов 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 и 1:5. Установлено, что это соотношение 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры.

Индикаторные культуры *Bacillus coagulans* хранились на полужидком МПА (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,3% бактериологического агара при температуре 2-40°C, которые пересеивались каждые 4 месяца. Для пассирования бактериофага использовали коммерческий МПБ (питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон) г. Оболенск Московская область Серпуховской район). Установлено оптимальное время пассажа – 6 часов инкубирования. Температурным оптимумом для культивирования бактериофага с индикаторной культурой была температура 35 ± 20°C.

Изучение специфичности выделенных бактериофагов позволило установить, что изучаемые бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *Bacillus coagulans* и не лизируют бактерии *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, и, в перспективе, могут входить в состав биопрепарата для индикации и идентификации возбудителя плоско-кислой порчи консервов.

Фагоспецифические L,D-пептидазы семейства M15: структура, регуляция, распространение и биотехнологические перспективы

Микулинская Г.В.¹, Чернышов С.В.¹, Зимин А.А.², Прохоров Д.В.³, Шадрин В.С.¹, Молочков Н.В.³, Кутышенко В.П.³

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук (Филиал), Пущино, Российская Федерация;

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Россия;

³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

Эндолизины бактериофагов – ферменты, разрушающие пептидогликан клеточной стенки бактерии-хозяина на стадии лизиса клетки для выхода фагового потомства. Особый интерес к ним связан с потенциальным использованием в качестве антибактериальных агентов, которые могут служить альтернативой антибиотикам в терапии бактериальных инфекций.

Мы идентифицировали и охарактеризовали ряд гомологичных эндолизинов литических колифагов, относящихся к таксонам *Siphoviridae* и *Myoviridae*. По своей субстратной специфичности эти ферменты – пептидазы семейства M15, гидролизующие связь между L-аланином и D-глутаминовой кислотой в пептидогликане типа A1γ.

Филогенетические исследования показали, что ортологичные последовательности широко представлены в геномах литических фагов, инфицирующих преимущественно грамотрицательных хозяев. Можно предположить большую роль горизонтального переноса данного гена в переменных участках геномов между неродственными фагами, имеющими общую экологическую нишу.

Пространственная структура эндолизина бактериофага T5 (EndoT5) в растворе была установлена методом ЯМР высокого разрешения. Было показано, что это глобулярный белок, относящийся к α+β классу; его гидрофобный кор образован тремя α-спиралями и четырьмя антипараллельными β-складками, образующими β-лист. EndoT5 и его гомологи, EndoRB43 и EndoRB49, в активном центре содержат каталитический цинк, координированный двумя консервативными гистидинами и двумя остатками аспарагиновой кислоты. Кроме того, EndoT5 активируется ионами кальция, что не характерно для его гомологов из миовирусов. Исследованные ферменты имеют отличия в биохимических свойствах (удельной активности, рН-оптимуме, чувствительности к ионной силе и компонентам буфера), однако все они характеризуются устойчивостью к воздействию температур, ренатурируя структуру и восстанавливая активность после нагрева до 90°C.

Ферменты данной группы эффективно лизируют *in vitro* пептидогликан живых клеток ряда бактерий, в том числе грамотрицательных (в присутствии пермеабиллизующих агентов), что сопровождается осмотическим лизисом и клеточной гибелью. Малый размер, высокая активность и конформационная стабильность открывают для этих белков перспективы применения в качестве биомедицинского препарата.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 18-04-00492.

Бактериофаги для контроля мягкогнилостных бактериозов картофеля

Мирошников К.А.^{1,2}, Кабанова А.П.^{1,2}, Шнейдер М.М.¹, Баранник А.П.¹, Васильев Д.М.², Корженков А.А.³, Мирошников К.К.⁴, Тоцаков С.В.^{3,4}, Игнатов А.Н.²

¹Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

²Исследовательский центр «ФитоИнженерия», с. Рогачево Московская обл., Российская Федерация;

³Балтийский Федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Российская Федерация;

⁴Федеральный исследовательский центр «Фундаментальная биотехнология», Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского РАН, Москва, Российская Федерация

Пектолитические энтеробактерии (*Pectobacterium spp.* и *Dickeya spp.*), вызывающие мягкую гниль и черную ножку (*Soft Rot Pectobacteriaceae*, SRP) – причина значительных потерь при выращивании и хранении картофеля. Исследования последних лет указывают на значительное генетическое разнообразие SRP, в том числе установлен

ряд новых таксонов на уровне подвидов и видов (ссылки). Точная диагностика возбудителей бактериозов картофеля требуется для разработки новых методов профилактики биологического контроля заболеваний. Систематизация наиболее распространенных бактерий *Pectobacterium* и *Dickeya spp.* на 15 геногрупп по результатам профилирования RAPD, BOX-PCR, MLST, а также полногеномного секвенирования позволила рационализировать подбор литических бактериофагов. В ходе представляемого исследования выполнено конструирование накопительных культур, включающих репрезентативные штаммы-представители каждой геногруппы, которые позволяют эффективно выделять целевые бактериофаги из образцов патогенного материала и сточных вод. В настоящее время коллекция специфических бактериофагов, охарактеризованных по морфологии и диапазону литического действия, составляет свыше 60 единиц, геномы 15 из которых секвенированы и депонированы в банк данных NCBI. На основе панели бактериофагов созданы экспериментальные препараты, демонстрирующие высокую активность против целевых патогенов *in vitro* и в биологических моделях.

Исследование поддержано грантом
РНФ №16-16-00073

Температурная устойчивость бактериофагов *E.coli* O157

Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Мерчина С.В., Кузьмина Н.С.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Степень устойчивости бактериофагов к инактивирующим факторам физического воздействия имеет таксономическое значение, поэтому при изучении биологических свойств фагов определение их чувствительности к таким агентам является обязательным.

Нами были проведены исследования по изучению термочувствительности селекционированных бактериофагов, которую проводили в питательном бульоне по методикам, предложенным М.Адамс (1961); Д.М.Гольдфарб (1961); И.М.Габрилович (1973).

Для изучения устойчивости бактериофагов к прогреванию исследования проводили по следующей методике: бактериофаги разводили 1:10 в МПБ (рН 7,4). Затем пробирки с разведенными фагами прогревали в ультратермостате при температуре от 60°C до 90°C с интервалом 2-3°C в течение 30 мин. Параллельно ставили контроль – фаги, разведенные 1:10 без прогревания. Количество негативных колоний определяли в 1 мл методом агаровых слоев.

В результате исследований было установлено, что селекционированные нами фаги обладали в основном одинаковой температурной устойчивостью. Прогревание фагов при 60-80°C не оказало заметного влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. На МПА в чашках отмечался полный лизис индикаторной

культуры. При прогревании фагов при 81-83°C их активность снижалась, на газоне роста индикаторной культуры формировался разреженный рост негативных колоний. При прогревании фагов при температуре 84-88°C количество негативных колоний насчитывалось от до 10 – 10² корпускул фага. При прогревании выше 88°C в 1 мл фаголизата активных корпускул фага по показателям негативных колоний не обнаружили. В контроле на фаг количество негативных колоний соответствовало концентрации 1x10⁸. Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости фагов к воздействию высокой температуры в 80 градусов Цельсия.

Индикация *Escherichia coli* O157 в воде с использованием РНФ

Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Мерчина С.В., Кузьмина Н.С., Шестаков А.Г., Маланина В.С.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

В последние годы исследователи уделяют большое внимание проблеме обнаружения патогенных микроорганизмов в водопроводной воде. Вода, подвергается постоянному загрязнению выделениями больных животных и людей, в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношении заслуживают особого внимания. По мнению ряда исследователей *E.coli* O157 не только длительное время сохраняют свою жизнеспособность в водопроводной воде, но и способны размножаться в них.

Поэтому разработка и внедрение в практику более простых и надежных методов обнаружения данного возбудителя в водопроводной воде не теряют своей актуальности.

В основу исследований по определению количественного показателя реакции, имеющее диагностическое значение была заложена методика РНФ, предложенная В.Я.Ганюшкиным.

Сущность РНФ заключается в том, что если в исследуемом материале присутствует искомым возбудитель, то добавленный к такому материалу гомологичный фаг, вступив во взаимодействие с ним, размножится, и последующее увеличение концентрации свободного внеклеточного фага укажет на присутствие в исследуемом материале гомологичного возбудителя. Для обнаружения *E.coli* O157 методом РНФ использовали образцы водопроводной воды.

Пробы водопроводной воды контаминировали *E.coli* O157 штамм РЛ и №51659 в концентрации 10⁵ 10⁴; 10³; 10²; 10¹ м.к./мл, заливали МПБ из расчета 10 мл бульона на 1 мл воды. Для контроля использовали пробы воды, не контаминированной бактериями *E.coli* O157. Ввиду того, что селекционированные нами фаги являются термостабильными, то инактивацию микрофлоры разведенных смесей проводили путем прогревания в водяной бане при температуре 58–60°C в течение 30 минут. После этого содержимое пробирок исследовали на определение числа корпускул бактериофага методом агаровых слоев.

По результатам проведенного опыта установлено, что увеличение титра фагов Е-61 УГСХА и Е-67 УГСХА более чем в 5 раз произошло уже при концентрации 10^3 микробных клеток эшерихий в 1 мл водопроводной воды.

Результаты исследований позволяют отнести РНФ к высокочувствительным методам ускоренного обнаружения патогенных бактерий в объектах внешней среды.

Группа новых протейных бактериофагов: выделение и характеристика

Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Курильщиков А.М., Бабкин И.В., Тикунов А.Ю., Боковая О.В., Юнусова А.Ю., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Из образцов от животных были выделены литические протейные бактериофаги PM75, PM85, PM93 и PM116, специфичные к клиническим штаммам *P. mirabilis*, обладающим множественной устойчивостью к антибиотикам. Согласно данным электронной микроскопии, исследуемые бактериофаги принадлежат к семейству *Podoviridae*. Три из этих бактериофагов (PM85, PM93, и PM116) обладают высокими литическими свойствами и являются потенциальными кандидатами на использование в фаготерапии протейных инфекций. Геномы и последовательности предполагаемых белков фагов PM85, PM93 и PM116 обладают высокой степенью сходства с соответствующими последовательностями бактериофага vB_PmiP_Pm5460 [KP890822], и согласно данным филогенетического анализа бактериофаги vB_PmiP_Pm5460, PM85, PM93 и PM116 образуют отдельную кладу внутри рода SP6-virus подсемейства Autographivirinae. Геномная последовательность фага PM75 близка к геному протейного фага PM16 [KF319020], при этом оба этих бактериофага обладают низким сходством нуклеотидных последовательностей с геномами других бактериофагов. Наиболее близкими к ним являются геномы фагов VP93 [NC_012662] и фага LIMelight [NC_019454], относящихся к phiKMV-подобным вирусам и геномные последовательности фагов рода KP34-virus. Согласно данным кластерного анализа полногеномных последовательностей и филогенетического анализа структурных белков, бактериофаги PM75 and PM16 отличны от других бактериофагов из phiKMV-подобных вирусов и могут быть выделены в отдельный род PM16-virus подсемейства *Autographivirinae*.

Выделение и биологическая характеристика бактериофагов от европейских зубров – *Bison bonasus* (L , 1758) и американских бизонов – *Bison bison* (L , 1758), с целью отбора штаммов для терапии этих животных

Никулин Н.А.^{1,2}, Землянко И.И.³, Сузина Н.Е.¹, Зимин А.А.^{1,4}

¹Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Российская Федерация;

²Вятский государственный университет, Киров, Российская Федерация;

³Приокско-Тerrasный государственный природный биосферный заповедник, Данки, Российская Федерация;

⁴Пущинский государственный естественно-научный институт, Пущино, Российская Федерация

В настоящее время зубр (*Bison bonasus*) – единственный дикий вид быков, обитающий на территории Европы. В настоящем исследовании были выделены, идентифицированы и частично охарактеризованы бактериофаги против *E.coli* из фекалий зубров и бизонов Центрального Зубрового питомника при Приокско-террасном государственном заповеднике Министерства природных ресурсов РФ. Бактериофаги, вирулентные по отношению к *E.coli*, актуальны в связи с баланопластитом и маститом у зубров, животных занесенных в Красную Книгу РФ и международные реестры особо охраняемых животных. Все изоляты были стабильными до 18 месяцев при 4°C. Фаги были охарактеризованы генетически по ограничению их роста на различных штаммах *E.coli* и с помощью ПЦР с праймерами, специфичными к генам 23 и hcs бактериофагов T4-типа. Были также определены титры фаговых популяций из фекалий зубров и бизонов на таких штаммах *E.coli* как C600, B и штамме *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Одновременно с помощью ТЭМ были охарактеризованы лизаты *E.coli* и *P.aeruginosa*, полученные на поверхности газона этих бактерий на твердой агаризованной среде. Были обнаружены с помощью ТЭМ в таких лизатах колифаги семейств *Myoviridae* и *Siphoviridae* морфотипов A1, A2 и B2, фаги псевдомонад семейств *Myoviridae* и *Inoviridae* морфотипов A1, A2 и F1. Также из фекалий быков был выделен ряд изолятов колиморфных бактерий, имеющих морфологические признаки *E.coli*. Характеристика этих изолятов с помощью масс-спектрометрии белков подтвердила это предположение. Из аналогичных проб были выделены и определены с помощью масс-спектрометрии некоторые бациллы, представители нормофлоры зубров. Определение физико-химических характеристик фагов, предназначенных для терапевтических целей предполагается провести на следующем этапе исследования. Изучение биоразнообразия фагов и бактерий зубров поможет рациональному выбору штаммов-кандидатов для последующего использования в фаговой и пробиотической терапии этих диких краснокнижных животных ООПТ.

Технологические аспекты разработки препаратов бактериофагов и эффективность их применения

Орлова Е.В., Ефимова М.Г., Функнер Е.В., Николаева А.М., Ковязина Н.А., Шитова О.И., Шилова Е.Г.

Филиал АО «НПО «Микроген» в г. Пермь «Пермское НПО «Биомед», Пермь, Российская Федерация

Расширение линейки поливалентных фаговых препаратов отвечает задачам Федеральной целевой стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в РФ на период до 2030 г., одной из которых является широкое применение бактериофагов в здравоохранении и ветеринарии, включение их в отраслевые стандарты. Единственным производителем препаратов бактериофагов в России является АО «НПО «Микроген».

В Пермском филиале разработана оригинальная технология получения бактериофагов с использованием универсальной питательной среды и очистки с помощью мембранных методов разделения. Технология признана лучшей в области импортозамещения. Поливалентный препарат Секстафаг® стал победителем национальной премии «Приоритет – 2017» в номинации «Фарма». С целью обеспечения эффективности препаратов бактериофагов постоянно актуализируются коллекции фаговых клонов и производственных штаммов. В филиале успешно проводятся работы по созданию новых лекарственных форм в виде суппозиторий, таблеток, капсул. Фармацевтическая композиция, входящая в состав современных лекарственных форм, обеспечивает пролонгированность действия и защиту фаговых компонентов от биологических жидкостей организма, что позволяет внедрить в производство уникальные препараты, не имеющие аналогов. Впервые в России создана технология получения комплексного препарата «Дифаг бактериофаг ацинетобактер-синегнойный» против неферментирующих грамотрицательных бактерий. На Секстафаг® в капсулах и Дифаг оформлены регистрационные досье, успешно проведена I фаза клинических испытаний (КИ), доказан высокий профиль безопасности. На основе бактериофагов и пробиотиков планируется создание комплексного препарата, являющегося альтернативой антибиотикам.

Подтверждена высокая эффективность бактериофагов при лечении панкреонекроза, гнойно-воспалительных осложнений синдрома «диабетической стопы», а также в хирургической, урологической, акушерской и гинекологической практике, стоматологии.

Конструирование и опыт применения средств на основе бактериофагов в стоматологии

Пашкова Г.С., Исаджанян К.Е., Никитин В.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л.

*ООО «А+Фа», Москва, Российская Федерация;
Российский университет дружбы народов,
Москва, Российская Федерация
ООО «Клиника Боско», Москва, Российская Федерация;
НПЦ «МикроМир», Москва, Российская Федерация*

Широкое и порой необоснованное назначение антимикробных средств в стоматологии может приводить к образованию устойчивых патогенных комплексов, способных вызывать воспалительные заболевания не только в полости рта, но и других органах и системах организма. Комплексное лечение воспалительных заболеваний полости рта, имеющих длительное хроническое течение, требует от специалиста понимания ответственности за проводимую антимикробную терапию.

Одним из естественных природных агентов, способных избирательно воздействовать на микроорганизмы, являются бактериофаги. В Российской Федерации на основе созданной учеными ООО НПЦ «МикроМир» коллекции бактериофагов, зарегистрированной в международной организации WFCC (инв. №986), разработаны лечебно-профилактические препараты с бактериофагами, действие которых направлено на патогены кожи, слизистой оболочки полости рта, желудочно-кишечного тракта, ЛОР-органов, мочеполовой системы.

Для борьбы с патогенами полости рта с доказанной ролью в развитии воспалительных заболеваний полости рта российскими микробиологами-вирусологами на базе НПЦ «МикроМир» создано профилактическое средство «Фагодент» на основе 56 видов вирулентных бактериофагов к 18 патогенным микроорганизмам.

При участии стоматологов разработана методика профессионального и индивидуального применения препарата «Фагодент». В целях изучения особенностей микрофлоры воспалительных очагов у 300 пациентов проведен забор содержимого пародонтальных карманов, идентификация культивируемых форм микроорганизмов с использованием масс-спектрометрии и ПЦР-диагностики. Проведен параллельный мониторинг состояния тканей пародонта у пациентов, применявших «Фагодент» в виде ежедневных самостоятельных 3-5-кратных аппликаций и пациентов контрольной группы.

Результаты исследований показали эффективность геля «Фагодент» в отношении заявленных патогенных бактерий. В комплексном лечении инфекционно-воспалительных заболеваний пародонта средство на основе бактериофагов «Фагодент» может существенно улучшить качество лечения за счет избирательного воздействия на пародонтопатогены, ускорить купирование воспалительных процессов, сократить сроки репарации и снизить вероятность осложнений проводимых манипуляций.

Профилактика и терапия препаратами бактериофагов инфекций мочевых путей

Перепанова Т.С.¹, Малова Ю.А.¹, Толордава Э.Р.², Круглов А.Н.³

¹НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А.Лопаткина – филиал ФГБУ «НМИЦр» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

²НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

³Национальное агентство клинической фармакологии и фармации, Москва, Российская Федерация

Трудность лечения рецидивирующей инфекции мочевых путей, особенно на фоне катетеров, дренажей, камней почек и рост антибиотико-резистентных уропатогенов требуют поиска новых методов лечения, обладающих высокой специфичностью и безопасностью, не оказывающих угнетающего действия на нормальную микрофлору.

Адаптация фаговых препаратов к уропатогенам проводилась за счет подбора активных фаговых рас из коллекции производителей, которая сформирована из высоковирулентных рас бактериофагов за многие годы. В результате адаптации препаратов увеличилась чувствительность микроорганизмов к фагам, особенно *E.coli* и *Proteus mirabilis* с 78,3 и 45,5% до 88 и 85% соответственно. После адаптации препарат «Пиобактериофаг поливалентный очищенный жидкий» применяли у пациентов перед перкутанной нефролитотрипсией по 40 мл перорально х 3 раза в день – за день до операции, а также помещали стерильные уретральные катетеры и нефростомические дренажи на 60 мин в раствор пиобактериофага перед операцией. Контрольные группы пациентов получали антибактериальную профилактику перед операцией.

При бактериофаготерапии мочевой инфекции клинический и бактериологический эффект лечения колибациллярной, протейной и стафилококковой мочевой инфекции был достигнут в 86–93%, синегнойной инфекции в 81% случаев, энтеробактера – в 77% случаев, что сравнимо с антибактериальной химиотерапией. В настоящее время предварительный анализ показывает проникновение бактериофагов в биопленку на катетерах и дренажах и образование в части случаев лизисных зон. Развитие синдрома системной воспалительной реакции в раннем послеоперационном периоде значительно меньше у пациентов, получавших бактериофаги, по сравнению с антибиотикотерапией.

Лечение бактериофагами инфекции мочевых путей является самостоятельным эффективным методом антимикробного лечения. Имеются перспективы использования бактериофагов для профилактики и лечения инфекции биопленок.

Эндолизины бактериофагов, инфицирующих *Bacillus cereus* и *Enterococcus faecium*

Пилигримова Э.Г., Байчер С.Д., Кулябин В.А., Шадрин А.М.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Российская Федерация

Эндолизины бактериофагов – специфические литические белки, которые синтезируются на заключительной стадии жизненного цикла бактериофага для разрушения клеточной стенки бактерии и высвобождения зрелых фаговых частиц. В отличие от классических антибактериальных препаратов эндолизины способны действовать на покоящиеся формы микроорганизмов. По данным Всемирной Организации Здравоохранения на 2017 год, на стадии второго этапа клинических испытаний находятся два препарата против бактериемии, вызванной метициллин-устойчивыми стафилококками, действующим началом которых являются эндолизины. В этой работе мы описываем особенности выделения эндолизинов бактериофагов и их первичную биохимическую характеристику. Установлены оптимальные условия для проявления литической активности, проведена оценка термостабильности и специфичности ферментов.

Неканонические взаимодействия вирулентных фагов *Pseudomonas aeruginosa* и бактерий-хозяев

Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Крылов С.В., Буркальцева М.В., Крылов В.Н.

НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова, Москва, Российская Федерация

Возрастающий интерес к использованию фаготерпии стимулирует необходимость перехода от индивидуально-подбора фагов для лечения отдельного пациента к разработке более общих подходов, исключающих, в то же время, возможность взаимодействия фагов разных видов с негативным эффектом. Нами обосновано и предложено создание и применение моновидовых смесей фагов. Проведенное испытание *in vitro* активности смеси фагов вида РВ1 и их рекомбинантов в отношении группы штаммов *Pseudomonas aeruginosa*.

Характеристика вирулентных бактериофагов и их полисахарид-деполимеризующих ферментов, активных в отношении разных капсульных типов *Acinetobacter baumannii*

Попова А.В., Шнейдер М.М., Шагин Д.А., Михайлова Ю.В., Сенченкова С.Н., Арбатский Н.П., Образцова Е.А., Мирошников К.А., Козлов Р.С., Книрель Ю.А.

Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Российская Федерация

Acinetobacter baumannii является одним из наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций и характеризуется природной резистентностью ко многим антибиотикам, а также способностью к приобретению вторичной устойчивости к любым доступным на сегодняшний день классам антибактериальных препаратов. Полисахаридная капсула, окружающая клетки *A. baumannii*, защищает бактерии от действия компонентов иммунной системы, высушивания и некоторых антимикробных агентов. Вариабельность состава генов в хромосомном К-локусе (KL), отвечающем за биосинтез капсульных полисахаридов (КПС), обуславливает большое структурное разнообразие капсул *A. baumannii*. КПС являются первоначальным рецептором для *A. baumannii*-бактериофагов, в геномах которых закодированы полисахарид-деполимеризующие ферменты (деполимеразы). Именно деполимеразы участвуют в расщеплении КПС строго определенной структуры, обеспечивая специфическое взаимодействие бактериофагов с представителями конкретных капсульных типов (К-типов) *A. baumannii*.

В данной работе мы представляем характеристику вирулентных бактериофагов, специфически инфицирующих несколько К-типов *A. baumannii*: К2, К9, К32, К37, К44, К47, К48, К87 и К89. Фаги классифицированы как представители семейств *Podoviridae* и *Myoviridae* отряда *Caudovirales*. Для всех исследуемых бактериальных вирусов изучены биологические свойства и структура геномов. Гены, ответственные за синтез ферментов, расщепляющих КПС *A. baumannii*, идентифицированы, клонированы в плазмидные векторы экспрессии, получены рекомбинантные продукты. Для высокоспецифичных фаговых деполимераз установлены продукты расщепления капсульных полисахаридов и определен механизм их действия.

Мы полагаем, что данная работа способствует формированию мощного задела для возможного практического применения как самих бактериофагов, так и кодируемых ими белков, активных в отношении разных К-типов *A. baumannii*.

Фагоиндикация бактерий рода *Staphylococcus*

Пульчеровская Л.П., Сверкалова Д.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Коллективом кафедры были проведены исследования по идентификации бактерий рода *Staphylococcus*, выделенных из патологического материала, взятого от мелких домашних животных при заболеваниях различных органов и систем – всего было исследовано 17 полевых патогенных штаммов бактерий рода *Staphylococcus*.

Для проведения исследований были использованы бактериофаги *Staphylococcus* с литической активностью не ниже 3×10^7 по Грация, ранее выделенные нами из объектов окружающей среды таких как: почва из загона для лошадей и песок детских песочниц.

Применяя строгую специфичность использованных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Staphylococcus*, в своих исследованиях мы использовали метод «стекающая капля», для ускоренной идентификации названных микроорганизмов.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного из штаммов фагов на газоне сплошного роста исследуемой культуры образовывалась прозрачная зона лизиса со вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также образование стерильных пятен – негативных колоний фага. Отрицательным считали результат при отсутствии зон лизиса на газоне роста исследуемой культуры бактерий рода *Staphylococcus* и отсутствии лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к роду *Staphylococcus*.

Биологические свойства фагов бактерий рода *Staphylococcus*

Пульчеровская Л.П., Сверкалова Д.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Нами были проведены исследования по индикации и идентификации бактериофагов *Staphylococcus* в почве из загона для лошадей и песке детских песочниц п. Октябрьский. Нами были обследованы: загон для лошадей и 6 песочниц в результате проведенных исследований было выделено 2 штамма фагов *Staphylococcus*. У выделенных фагов были изучены следующие биологические свойства: морфология негативных колоний, литическая активность, диапазон литической активности и специфичность.

Морфологию негативных колоний фагов изучали методом агаровых слоев по Грация при посеве на МПА. Негативные колонии, образуемые бактериофагами *Staphylococcus*, нами были разделены на два типа: 1 тип – прозрачные негативные колонии округлой формы

с ровными краями в диаметре 0,5–1,0 мм (фаг ST-1) и 2-й тип – круглые колонии с неровными краями, без вторичного роста, в диаметре 2,0–3,0 мм прозрачные, без вторичного роста (фаг ST-2).

Выделенные бактериофаги обладали разной литической активностью. Изучаемые бактериофаги *Staphylococcus* проявляли литическую активность ST-1 – $2,7 \times 10^8$ и ST-2 3×10^7 .

Для изучения диапазона литической активности, выделенных фагов использовали 17 штаммов бактерий рода *Staphylococcus*. Опыты показали, что изучаемые фаги характеризуются разным спектром литической активности.

Видовая специфичность фагов имеет большое практическое значение и используется для дифференциации бактерий. Определение проводили на агаровых средах путем нанесения фага на газон культуры. Фаги бактерий рода *Staphylococcus* были строго специфичны.

На основании полученных результатов, мы считаем, что выделенные бактериофаги можно использовать для проведения индикации и идентификации бактерий рода *Staphylococcus* в различных объектах.

Фаги бактерий рода *Serratia* индикаторы бактерий

Пульчеровская Л.П., Ефрейторова Е.О.,
Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет
им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Бактериофаги можно использовать как санитарно-показательные микроорганизмы при фекальном загрязнении объектов по следующим причинам: бактериофаги выделяются из сточных вод с той же частотой, что многие энтеро-патогенные вирусы; они имеют сходство с энтеровирусами по устойчивости к химическим веществам и простота методов обнаружения бактериофагов.

Целью наших исследований послужило применение фагов как индикаторов бактерий рода *Serratia* в объектах окружающей среды таких как земля, песок и патологический материал.

Для исследований были отобраны пробы земли и песка по обнаружению бактерий рода *Serratia*. Исследования проводили по классическим методикам.

Посевы исследуемых проб производили в бульон с индикаторными штаммами гомологичного рода *Serratia*, а затем делали посевы на плотную питательную среду по методу Грациа. После инкубирования подсчитывают количество негативных колоний, которое соответствует количеству фаговых корпускул в материале и пересчитывали на 1 л. Эти исследования могут быть проведены в любой бактериологической лаборатории в течение 18–24 часов при использовании простых питательных сред и несложного оборудования. В результате проведенных исследований было выделено и селекционировано 2 бактериофага: 1 из песка и 1 из земли.

Из тех же проб песка и земли также выделяли микроорганизмы, принадлежащие к роду *Serratia* культуральным

методом. В результате проведенных исследований было выделено 2 штамма бактерий: – *Serratia marcescens*. Проведенные исследования подтверждают значение бактериофагов как санитарно-показательных микроорганизмов.

Определение количественных параметров постановки РНФ с фагами *K. oxytoca*

Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет
им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Цель исследования заключалась в подборе оптимального, имеющего диагностическое значение, количественного показателя постановки РНФ для обнаружения бактерий вида *K. oxytoca*. В качестве исследуемого материала использовали МПБ, контаминированный индикаторными штаммами *K. oxytoca* (фаг Кох-9 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 86, фаг Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124). Оптимальным временем РНФ считали время экспозиции материала с фагом, которое позволяло обеспечить индикацию 10 клеток в 1 мл.

Под количественным показателем понимали уровень нарастания титра фага по сравнению с контролем. В качестве исследуемого материала использовали МПБ, контаминированный 18-часовыми индикаторными культурами *K. oxytoca* в разных заражающих концентрациях. В колбы с 50 мл стерильного МПБ вносили 1 мл индикаторных штаммов *K. oxytoca* в концентрации 10 – 10 м.к./мл, содержимое перемешивали в течение 10 мин. Для каждого разведения в колбах готовили ряд из трех пробирок: №1 – на присутствие фага в смеси с исследуемым материалом; №2 – контроль на присутствие «свободного» фага; №3 – контроль титра индикаторного фага. Пробирки термостотировали при 37°C в течение 5 часов. После этого содержимое пробирок разводили мясоептонным бульоном для получения сосчитываемого числа негативных колоний, прогревали в течение 30 мин (60°C), затем исследовали методом агаровых слоев. Чашки с посевами культивировали в термостате при 37°C в течение 16 часов. Для учета результатов подсчитывали количество негативных колоний бактериофага, выросших на плотной питательной среде. Критерии оценки показателей РНФ: увеличение в 2,5 раза – сомнительная оценка РНФ; увеличение в сравнении с контролем от 3 до 5 раз – слаболожительная оценка РНФ; увеличение свыше 5 раз – положительная оценка РНФ; увеличение более чем в 10 раз – резко положительная оценка РНФ.

Расчет нарастания титра фага производили путем сравнения числа колоний на чашке №1 (опытная) и №3 (контроль титра фага). В случае обнаружения в исследуемом материале «свободного» фага (лизис индикаторной культуры в чашке №2) реакцию не учитывали. Предварительного «подрачивания» материала не предусматривалось. В результате проведенных исследований нами было установлено, что количество фаговых частиц более чем в 5 раз превышает количество

фаговых корпускул в контрольных пробах, при контаминации МПБ бактериями вида *K. oxytoca* в концентрации 10 м.к./мл для фага.

Определение оптимального времени постановки РНФ с фагами *K. oxytoca*

Садрtdинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Цель исследования заключалась в определении оптимальных временных параметров РНФ для индикации бактерий вида *K. oxytoca*. В исследованиях использовали строго специфичные к *K. oxytoca* фаги. В качестве исследуемого материала использовали МПБ, контаминированный индикаторными штаммами *K. oxytoca* (фаг Кох-9 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 86, фаг Кох-11 УГСХА – штамм *K. oxytoca* 124). Оптимальным временем РНФ считали время экспозиции материала с фагом, которое позволяло обеспечить индикацию 10 микробных клеток в 1 мл.

Исследования включали 2 серии опытов:

1) Использование метода предварительного «подрачивания» – при температуре 37°C в течение 5, 6, 10, 16, 24 часов. Для возможности подсчета негативных колоний фага чашки засеивали методом агаровых слоев (посевы культивировали при 37°C в течение 16 часов). В результате исследований установлено, что метод РНФ с предварительным «подрачиванием» исследуемого материала в течение 5 ч позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве 10 м.к./мл, время проведения исследований составляет 26 часов. Увеличение времени «подрачивания» исследуемого материала до 16 часов позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве 10 м.к./мл с увеличением сроков исследования до 37 часов. «Подрачивание» материала в течение 24 часов существенно не повлияло на результаты РНФ.

2) Увеличение времени контакта исследуемого материала с бактериофагом до 5, 6, 10, 16 и 24 часов. Через выбранный период инкубации, пробирки вынимали из термостата, содержимое в количестве 0,25 мл вносили в пробирки с 4,5 мл бульона для получения сосчитываемого числа негативных колоний. Все опытные пробирки прогревали на водяной бане при 60°C в течение 30 мин, затем исследовали методом агаровых слоев. Инкубация исследуемого материала с фагом Кох-9 УГСХА и Кох-11 УГСХА в течение 5 ч позволяет обнаружить бактерии изучаемого вида в концентрации 10 м.к./мл за общее затрачиваемое время 21 час, 16-часовая экспозиция материала с фагами характеризуется одинаково высокой чувствительностью реакции (10 м.к./мл) с увеличением сроков исследования до 32 часов.

Таким образом, наиболее оптимальным является режим РНФ при инкубации исследуемого материала с фагом в течение 5 часов, поскольку позволяет обнаружить бактерии вида *K. oxytoca* в количестве 10 м.к./мл за 22 часа (21 час (время исследований) + 1 час (на постановку эксперимента)).

Перспективы использования бактериофагов в западной медицине

Саперкин Н.В., Scholten R.J.P.M., Чанышева Р.Ф.

Университет Утрехта (Utrecht Universiteit), Утрехт, Нидерланды;

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород

Особое значение бактериофаги (БФ) стали приобретать на фоне распространения множественной резистентности бактерий к антибиотикам и связанного с ней роста заболеваемости и летальности. БФ стали относить к персонализированным лекарственным средствам, которые проходят второе рождение, или повторное внедрение. Многие исследователи сходятся во мнении, что БФ предстоит пройти по своеобразному шелковому пути к принятию и полноценному внедрению в здравоохранение Европы, США и т.п. Факторы, определяющие развитие фаготерапии в западной медицине, можно обозначить так:

- нормативные и регистрационные сложности;
- морально-этические аспекты (этически оправданная фаготерапия). Основной моральной проблемой, связанной с лечением БФ, является ограничение доступа к ней больных в западных странах с учетом ее очевидного потенциала по ежегодному спасению тысяч жизней;
- отношение к БФ фармпроизводителей (инвестирование, патентование, защита интеллектуальной собственности);
- непонимание медицинскими работниками, критиками и лицензирующими органами биологических и функциональных особенностей БФ, а также особенности терминологии;
- нехватка данных о безопасности отдельного фага и определенного фагового препарата, включая цитотоксичность;
- необходимость проведения полноценных клинических испытаний, в частности двойных слепых плацебо-контролируемых исследований;
- негативное восприятие качества и стиля советских научных публикаций, несмотря на содержащуюся в них полезную информацию;
- ограниченный доступ (или его отсутствие) к текстам оригинальных исследований, выполненных в России и странах бывшего СССР, и/или резюме их статей. Этот фактор осложняет выполнение полноценных систематических обзоров.

Таким образом, активные дискуссии, многочисленные тематические обзоры литературы, публикуемые в Европе и США, конечно, облегчают понимание западным медицинским сообществом особенностей использования БФ. В то же время, явные трудности (фармацевтического, методологического, этического плана) с оценкой накопленного в мире опыта в области использования БФ заставляют вновь процитировать вопрос, поставленный Debarbieux L. et al (2016): «Какой должна быть смертность, пока БФ будут разрешены к использованию ради спасения жизней?». Тесное международное сотрудничество будет способствовать осмыслению пользы и ограничений фаготерапии.

Возрастная динамика титра бактериофагов *E.coli* пищеварительного микробиоценоза цыплят первых 38 дней жизни

Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Зимин А.А.

Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии, Краснодар, Российская Федерация

Проведено исследование изменения титра бактериофагов *E.coli* (коли-фагов) пищеварительного микробиоценоза у 15 цыплят в возрасте от 4 до 38 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 6-кратно с интервалом 6–8 дней. Общее количество исследованных проб составило 90.

После отбора пробы взвешивались, ресуспендировались в буферном растворе с добавлением ингибиторов бактериального роста, центрифугировались. Из полученного супернатанта делали серию 100-кратных разведений, из которых производили высеивание на культуру лабораторного штамма *E. coli* В методом агаровых слоев с использованием твердой и мягкой агаризованных сред LB. После подсчета образовавшихся бляшек титр фагов в образце рассчитывали в Ig БОЕ/мл.

В результате исследования получена картина динамики титра коли-фагов у цыплят первых 38 дней жизни, что представляет собой новые данные, полезные как для общего понимания становления пищеварительного микробиоценоза птиц в онтогенезе, так и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и администрации Краснодарского края в рамках научного проекта № 16-44-230855-р_а; The reported study was supported by RFBR and administration of Krasnodar region, research project No. 16-44-230855.

Сравнительный анализ молекулярно-генетической структуры SEA- и ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus*

Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Абаев И.В.

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Умеренные бактериофаги присутствуют в большинстве бактерий. Часто подобные бактериофаги несут в своем геноме гены токсинов, с помощью которых осуществляется конверсия бактерии-хозяина в патогенный микроорганизм. Одними из таких бактериофагов для *S. aureus* являются SEA- и ETA-конвертирующие бактериофаги, способные конвертировать штаммы *S. aureus* в продуцирующие энтеротоксин А (SEA) или эксфолиативный токсин А (ETA). В данном исследовании был проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ SEA- и ETA-конвертирующих бактериофагов в геномах *S. aureus*, выделенных при

расследовании вспышек пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита в России с 2012 по 2016 гг.

Для поиска конвертирующих бактериофагов было использовано 36 полногеномных сиквенсов штаммов *S. aureus*, выделенных во время вспышек пищевых инфекций и эксфолиативного дерматита. Для поиска бактериофагов использовали PHASTER. Точные координаты фагов определяли с помощью поиска att сайтов, в которых происходит интеграция бактериофагов. Аналогичным образом был осуществлен поиск конвертирующих бактериофагов в геномах *S. aureus*, представленных в GenBank. Для поиска SEA-конвертирующих бактериофагов использовали только полноразмерные геномы, так как среди драфт-геномов присутствует очень большое количество штаммов, несущих ген энтеротоксина А. Всего в GenBank было обнаружено 49 полноразмерных геномов *S. aureus*, несущих ген энтеротоксина А. Из 35 геномов были получены последовательности SEA-конвертирующих бактериофагов, также было выявлено 9 SEA-конвертирующих фагов в геномных последовательностях возбудителей вспышек пищевых инфекций в России. Представленность геномов *S. aureus*, несущих ген эксфолиативного токсина А, гораздо меньше, всего было выявлено 60 геномов *S. aureus*, имеющих данный ген. ETA-конвертирующие бактериофаги удалось выделить из 45 геномов, представленных в GenBank и из 15 геномов *S. aureus*, выделенных во время вспышек в России. Для всех выделенных бактериофагов проведен филогенетический анализ и идентифицирована структура. Для SEA-конвертирующих бактериофагов было выявлено две основные группы при филогенетическом анализе. Для ETA-конвертирующих бактериофагов было обнаружено три основные филогенетические группы. Был проведен молекулярно-генетический анализ структурных регионов полученных бактериофагов.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Опыт совместного применения бактериофагов и пробиотиков для лечения сочетанной гинекологической и гастроэнтерологической патологии

Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В., Жирнов В.А., Иванова Т.П.

Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

Согласно научной литературе, бактериофаги используют в качестве монотерапии или в комплексе с антибиотиками и сорбентами для лечения широкого спектра заболеваний, связанных с бактериальной инфекцией. Существуют научные публикации, описывающие сочетанное применение фагов и пробиотиков, однако практически во всех случаях работа проводилась в два этапа – первый этап – фаготерапия, второй – использование пробиотиков с целью заселения санированной экологической ниши. Высокая эффективность совместного одновременного

применения этих биопрепаратов была показана на сельскохозяйственных животных.

В ННИИЭМ им. И.Н. Блохиной были проведены работы по совместному применению фагов и пробиотиков для лечения женщин с неспецифическими вагинитами и сопутствующей гастроэнтерологической патологией. Было отобрано 62 женщины с хроническими неспецифическими вагинитами и гастроэнтерологической патологией (гастрит, гастродуоденит), сопровождающимися дисбиозом кишечника и влагалища II-III степени. Для лечения женщин основной группы (32 человека) совместно применяли бактериофаги (колипротейный, стафилококковый, синегнойный) и авторский синбиотик «ЛВ-комплекс» путем интравагинального введения спринцеванием. Внутрь пациентки получали фаги (интести-, колипротейный, пиобактериофаг) и пробиотик «ЛВ-комплекс», временной интервал между приемом составлял 6 часов.

Женщины группы сравнения на фоне традиционной базовой терапии вагинита с использованием антисептических и противомикробных препаратов вместо фагов и пробиотика получали плацебо и лиофильно высушенные пробиотики перорально.

Показано, что в основной группе у всех пациенток исчезли клинические проявления вагинита, нормализовалась микрофлора влагалища и кишечника. В группе сравнения на фоне клинического улучшения у 68% женщин регистрировали дисбиоз влагалища I-II степени, обусловленного снижением количества молочно-кислых микроорганизмов, а в кишечнике на фоне нормализации лакто- и бифидофлоры в 73% наблюдался рост тех же видов УПМ в значимых количествах, что и при первичном обследовании. Таким образом, показана высокая эффективность комплексного применения бактериофагов и жидких авторских пробиотиков при лечении сочетанной гинекологической и гастроэнтерологической патологии.

Отбор производственно-перспективных изолятов энтеробактерных фагов

Сульдина Е.В., Васильев Д.А.,
Мастиленко А.В., Феоктистова Н.А.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Нами было выделено и селекционировано 7 бактериофагов бактерий *Enterobacter* spp. Морфологию негативных колоний полученных фагов можно было разделить на два типа. К первому относили изоляты Е1, Е3, Е6 с округлыми, прозрачными без зон неполного лизиса колониями, диаметром до 1 мм. Ко второму - круглые прозрачные без зон неполного лизиса, до 3–4 мм в диаметре колонии, образуемые фагами Е2, Е4, Е5, Е7. Литическая активность исследуемых фагов варьировала от $1,2 \pm 0,2 \times 10^7$ до $1,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$ корпускул в 1 мл по Грация и от 10^{-7} до 10^{-10} по Аппельману. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладали бактериофаги Е4 и Е7, суммарный спектр которых составлял более 95%. Специфичность действия выделенных бактериофагов проверялась на 90 штаммах бактерии – представителей родов *Klebsiella*,

Citrobacter, *Escherihia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, и др. Энтеробактерные бактериофаги специфичны по отношению к гомологичным бактериям. Изучаемые фаги обладали выраженной устойчивостью к воздействию температуры до 65°C и хлороформу в течение 40 мин.

Анализируя результаты совокупности проведенных исследований бактериофаг Е4 был отобран нами для дальнейшей работы как наиболее производственно-перспективный.

На основании полученных секвенсовых данных генома была составлена карта линейной ДНК фага Е4. Определены продукты экспрессии его генов в соответствии с известными аналогами. Качественный состав протеинов изучаемого фага соответствовал белкам аннотированных аналогов, имел четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдалось наличие как структурных, так и неструктурных компонентов. Были выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функций (гипотетические белки), имеющие аналогии в аннотированных геномах других энтеробактерных бактериофагах. Была разработана система молекулярно-генетической индикации автономных генетических элементов в геноме бактериофага, активных в отношении *Enterobacter* spp с использованием ПЦР.

Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг Е4, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы

Исследования проводятся при поддержке РФФИ, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.

Изучение биологических свойств ирсиниозного фага Ye3-f2

Сульдина Е.В., Васильев Д.А.,
Мастиленко А.В., Феоктистова Н.А.

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Из объектов окружающей среды (более 30 проб бытовых сточных вод, вод открытых водоемов, фекалий животных и др.), нами было выделено и селекционировано 5 бактериофагов бактерий *Y. enterocolitica*. Для более подробной характеристики выделенных фагов нами были изучены их основные биологические свойства. Негативные колонии их имели различную морфологию, а диапазон литической активности составлял от $1,9 \pm 0,1 \times 10^5$ до $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ по Грация и от 10^{-5} до 10^{-9} по Аппельману. На основании полученных данных мы отобрали бактериофаг Ye3-f2 для дальнейших исследований как наиболее перспективный. Бактериофагу Ye3-f2 характерны бляшкообразующие единицы диаметром 1,0–1,5, прозрачные, без зоны неполного лизиса; литическая активность $1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл по Грация и 10^{-9} по Аппельману. Спектр его литического действия – 85%, что проверено на

34 культурах вида *Y. enterocolitica*. Для изучения специфичности бактериофага бактерий *Y. enterocolitica* Ye3-f2 по отношению к представителям других семейств, родов и видов бактерий использовали: *Proteus vulgaris* 6 штаммов, *Klebsiella oxytoca* 2 штамма, *Staphylococcus aureus* 4 штамма, *Pseudomonas aureginosa* 4 штамма, *Y. pseudotuberculosis* 4 штамма, *Escherichia coli* 12 штаммов, *Enterobacter cloacae* 3 штамма, *Rhodococcus equi* 1 штамма, *Listeria monocytogenes* 20 штаммов. Установлено, что исследуемый фаг не лизировал ни одну из испытываемых культур и обладает выраженной видоспецифичностью. Латентный период внутриклеточного развития фага Ye3-f2 на клетках индикаторной культуры равен 22–23 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 21 минуту опыта равно 16, а при высеве с 24 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,98. Средняя урожайность бактериофага равна 1998:16 = 124,9 вирусных частиц на одну микробную клетку.

Фаг Ye3-f2 обладает умеренной устойчивостью к воздействию температуры и хлороформа.

На основании полученных данных мы использовали бактериофаг Ye3-f2 для дальнейших исследований возможности его применения в составе терапевтического биопрепарата.

Исследования проводятся при поддержке РФФИ, проект «Геномика и биология кандидатных бактериофагов для терапии энтеробактериальных инфекций в ветеринарной медицине» №16-44-732038.

Разработка системы полимеразно-цепной реакции для идентификации бактериофагов *Proteus spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*

**Феоктистова Н.А., Васильев Д.А.,
Мастиленко А.В., Сульдина Е.В.**

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

В большинстве случаев отнесение нового фагового изолята к известной группе возможно на основании морфологических критериев с подтверждением частичным секвенированием участков генома. Однако для массового скрининга бактериофагов при их выделении и селекции он не является основным. В данном случае оптимальными будут являться амплификационные методы, в том числе полимеразно-цепная реакция (ПЦР).

Объекты исследования – бактериофаги Pr – 6 УГСХА, Е4, Ye3-f2, выделенные и селекционированные авторами в 2017 году авторов из объектов внешней среды.

В виду полученного отрицательного результата экспериментов по индикации бактериофагов *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* помощью аннотированных праймеров ПЦР, были разработаны специфичные системы их молекулярно-генетической идентификации с учетом проведенного секвенирования геномов. Определены специфические фрагменты геномов *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* и *Proteusphage* – ген

терминазы. Проведено сравнение с аннотированными аналогами в базе NCBI (GenBank) и построено филогенетическое древо каждого из них. В системе Blast установлены специфичные праймеры для индикации и идентификации *Yersiniaphage*, *Enterobacterphage* и *Proteusphage*.

Для индикации *Yersiniaphage* определена пара праймеров TCCGTTGGGGGATAAACACT и TTGCTACTGCAGGGTCATCT, отвечающая оптимальным условиям: GC не более 50%, температура плавления ≈58,6°C, длина ампликона 330 п.н., длина праймеров 20 п.н.. Подобраны праймеры GTTCGGTATTTCCCGGGTT и TCTGTTACTCGTGTGCCACC для индикации *Proteusphage*, имеющие следующие характеристики: GC не более 55%, температура плавления ≈ 59,9°C, длина ампликона 333 п.н., длина праймеров 20 п.н.. Установлены праймеры CCGTACACCGCAATTTGGAA и ATAACCTTCTTCAGCCGCC для индикации *Enterobacterphage*, характеризующиеся следующими показателями: GC не более 55%, температура плавления ≈60°C, длина ампликона 690 п.н., длина праймеров 20 п.н.

Получены результаты, подтверждающие специфическую работу праймерных систем при постановке полимеразно-цепной реакции. Разработана система индикации бактериофагов, позволяющая в течение 2–3 ч определять объекты, как для последующего исследования выявленных объектов, так и накопления фаговой биомассы.

Исследования проводятся при поддержке РФФИ №16-44-732038.

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Bacillus cereus*

**Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Мастиленко А.В.,
Сульдина Е.В., Маланина В.С., Мартынова К.В.,
Золотухин С.Н., Калдыркаев А.И.**

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Диарейный синдром, как правило, связан с *Bacillus cereus* HBL комплексом диарейного энтеротоксина.

Цель исследований – проведение молекулярно-генетических исследований бактериофага *Bacillus cereus* для подтверждения оригинальности, вирулентной природы и отсутствия локусов патогенности.

Бактериофаг *Bacillus cereus* phage FBc – 28 УГСХА выделен из пробы почвы. Спектрофотометрическое измерение оптической плотности пробы – спектрофотометр Nanodrop 2000/2000c (ThermoFisher). Для оптимизации ПЦР-протокола – электрофоретический метод детекции продуктов амплификации. Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (IonTorrent, ThermoFisherScientific, США), использовали библиотеки баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей).

Получены сиквенсовые данные генома бактериофага *Bacillus cereus* FBc – 28 УГСХА, составлена карта линейной

ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов. Установлено, что использование фенольно-хлороформной экстракции приводит к наилучшему выходу матричной ДНК. Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геноме бактериофага *Bacillus cereus*. Определена уникальность гена-кандидата, и выбран фрагмент, кодирующий ген HBL enterotoxin. Характеристика праймеров к участкам гена HBL enterotoxin генома фагов, активных в отношении *Bacillus cereus*: прямой праймер (f) 5'-3' – GAGATGCAAAA TTAATGCGGCG; обратный праймер (r) 5'-3' – TGCGATTCCT AGCGGAGTTC; расчетная температура плавления прямого праймера – 60,0°C; расчетная температура плавления обратного праймера – 59,9°C; теоретическая специфичность – *Bacillus cereus*; длина амплифицируемого участка (п.о.) – 366.

По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена HBL enterotoxin культур *Bacillus cereus* с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме бактериофага *Bacillus cereus* FVc – 28 УГСХА локусов патогенности выявлено не было.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ МСХ РФ в 2018 году.

Протейные бактериофаги: выделение и селекция

**Феоктистова Н.А., Васильев Д.А.,
Мастиленко А.В., Сульдина Е.В.**

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Были проведены исследования по выявлению бактериофагов, специфических к бактериям *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* методом индукции из выделенных авторами протейных культур из патологического материала и фекалии от телят, поросят и птицы (куры и утки) с клиническими признаками дисбактериоза, фекалии и смывы животноводческих и птицеводческих хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям Ульяновской и Самарской областей. Были получены отрицательные результаты, которые не расходятся с данными исследователей, занимавшихся выделением бактериофагов семейства *Enterobacteriaceae*, утверждающих, что наиболее перспективным является методика выделения бактериофагов из объектов окружающей среды.

Из 94 проб объектов ветеринарно-санитарного надзора животноводческих и птицеводческих помещений из хозяйств, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям, было выделено 8 бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Proteus*. Установлено, что объектами для выделения вирулентных бактериофагов рода *Proteus* являются сточные воды, фекалии, смывы с клеток, почва с территории животноводческих ферм.

Селекцию протейных бактериофагов проводили девятикратным пассированием изолированных негативных

колоний на МПА с перевиванием на МПБ. Оптимальное соотношение – 1:1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 3,5 ч инкубирования при температуре 36 ± 2°C. Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров фирмы «Millipore Millex-GP». Установлено, что наиболее эффективным способом является многоступенчатая фильтрация. Из выделенных нами бактериофагов *Proteus*, в перспективе могут быть сконструированы безопасные фаговые биопрепараты для диагностики, лечения и профилактики заболеваний, вызываемых протеом или протекающих с их участием, если при проведении молекулярно-генетических исследований будет выявлено отсутствие локусов, кодирующих факторы патогенности.

*Исследования проводятся при поддержке
РФФИ №16-44-732038.*

Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Proteus*

**Феоктистова Н.А., Васильев Д.А.,
Мастиленко А.В., Сульдина Е.В.**

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

В результате проведенных исследований были получены сиквенсовые данные генома бактериофага Pr – 6 УГСХА, составлена карта линейной ДНК с расшифровкой кодирующих областей генома. В соответствии с известными аналогами определены продукты экспрессии их генов. Качественный состав протеинов бактериофага соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отношении изучаемых видов бактерий. Разработана система молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Proteus spp.* и предполагаемых для применения в качестве терапевтических средств для лечения энтеробактериальных инфекций, вызываемых вышеуказанными штаммами бактерий, в ветеринарной медицине. Определена уникальность гена-кандидата, и выбран фрагмент, кодирующий ген toxin RelE. Характеристика праймеров к участкам гена toxin RelE генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*: прямой праймер (f) 5'-3' – AGCAAATCAAATATTGGCTACAGA; обратный праймер (r) 5'-3' – TGCTTTTGGATACGCCATAACT; расчетная температура плавления прямого праймера – 60,0°C; расчетная температура плавления обратного праймера – 59,9°C; теоретическая специфичность – *Proteus mirabilis*,

Proteus vulgaris RelE gene; длина амплифицируемого участка (п.о.) – 215. По результатам экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *RelE* культур *Proteus* spp. с разработанными системами олигонуклеотидов в геноме протейного бактериофага Pr – 6 УГСХА локусов патогенности выявлено не было.

Полученные данные позволяют рекомендовать бактериофаг Pr – 6 УГСХА, специфичный к бактериям видов *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris*, для конструирования терапевтического биопрепарата с целью профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных и птицы

Исследования проводятся при поддержке РФФИ
№16-44-732038.

Сравнительная оценка селективных свойств некоторых специфических сибиреязвенных бактериофагов на примере штамма *Bacillus anthracis* 1(СО)

Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Калинин А.В.

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация

Известно, что чувствительность штаммов *B. anthracis* по отношению к различным сибиреязвенным бактериофагам не одинакова. Это обусловлено как различиями в свойствах бактериальных штаммов, так и бактериофагов.

Цель работы – изучение и сравнительный анализ комплекса фенотипических свойств и генетических характеристик вариантов вирулентного штамма *B. anthracis* 1(СО) в группе выделенных по признаку резистентности к специфическим сибиреязвенным бактериофагам Гамма А-26, ВА-9, К ВИЭВ.

После обработки посевов спор штамма *B. anthracis* 1(СО) на агаре Хоттингера отдельно каждым из бактериофагов через 24 ч инкубирования при 37°C были выделены субкультуры, отличающиеся от исходного типичного штамма по капсулообразованию (не образующие капсулу на специальных средах в атмосфере повышенного содержания углекислого газа), не проявляющие токсинообразования на среде СОПЭК, не способные к прорастанию спор на минимальной питательной среде или на средах с бикарбонатом в условиях повышенного содержания углекислого газа, отличающиеся слабой протеолитической активностью, не лизирующие эритроциты барана, обладающие лецитиназной активностью, резистентные к действию специфических бактериофагов.

В группе субкультур резистентных к бактериофагу К ВИЭВ у 5 из 8 субкультур споры не прорастали в атмосфере с повышенным содержанием углекислого газа, в то время как среди культур других групп таких штаммов не было. В группу из 9 субкультур, резистентных к бактериофагу ВА-9, входили две культуры, отличающиеся по плазмидному составу (рХО1-, рХО2+; рХО1-, рХО2-).

Все 4 субкультуры из группы резистентных к бактериофагу Гамма А-26 имели генотипы, отличающиеся от исходного штамма, а один из них отличался и от остальных из этой группы, обладал низкой протеолитической активностью, показывал отсутствие лизиса эритроцитов барана и выраженной способности к иммунопреципитации на синтетической среде с сибиреязвенным γ -глобулином. Таким образом, выявлена не только значительная вариабельность субкультур, выделенных по признаку фагорезистентности к специфическим бактериофагам, но и особенности фенотипических свойств и генетических характеристик, в большей степени присущие определенной группе. Выделение фагорезистентных культур позволяет более эффективно выявлять субкультуры с вариabельными комбинациями различных свойств, присутствующие в популяции штаммов, особенно при использовании нескольких бактериофагов.

Влияние культурально-морфологических свойств индикаторных штаммов *Bacillus anthracis* на показатель концентрации бактериофага гамма А-26 в экспериментальных сериях препарата

Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Калинин А.В.

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь, Российская Федерация

Культурально-морфологические свойства штаммов *B. anthracis* подвержены внутривидовой вариабельности, что в значительной степени обусловлено особенностями строения поверхностных структур и влияет на их чувствительность к специфическим бактериофагам. Важными количественными показателями качества препаратов бактериофагов являются концентрация бляшкообразующих единиц (БОЕ).

Цель работы – изучение влияния принадлежности индикаторных культур к тому или иному культурально-морфологическому типу на результат определения количественных показателей экспериментальных серий бактериофага Гамма А-26.

В работе использовали 4 экспериментальные серии бактериофага Гамма А-26. В качестве индикаторных культур при определении концентрации корпускул бактериофага методом агаровых слоев по Грациа использовали вакцинные штаммы *B. anthracis* СТИ-1, Ихтиман и 55. Штаммы *B. anthracis* СТИ и Ихтиман на агаре Хоттингера росли в виде выраженных R-колоний, штамм 55 формировал рост в OS-форме.

Показатель концентрации бактериофага в четырех сериях препарата при использовании в качестве индикаторных культур штаммов *B. anthracis* СТИ и Ихтиман был достоверно ($p < 0,05$) выше, чем при использовании штамма *B. anthracis* 55. Этот же показатель у трех из четырех серий был достоверно выше при использовании *B. anthracis* Ихтиман по сравнению с *B. anthracis* СТИ.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при разработке технологии получения диагностических препаратов сибиреязвенных бактериофагов необходимо учитывать и четко оговаривать не только конкретные штаммы размножения и индикаторные штаммы для определения концентрации частиц бактериофага, но и их культурально-морфологические особенности и способы их проверки, а при необходимости и коррекции т. к. при многократных пересевах и сменах вегетативной и споровой фаз существования штаммов *B. anthracis* их популяционный состав может значительно изменяться. Концентрацию бактериофага следует определять при использовании в качестве индикаторной культуры наиболее чувствительной культуры *B. anthracis* Ихтиман (или вариантов культур в выраженной R-форме). При использовании наиболее чувствительных индикаторных культур показатель концентрации фаговых корпускул приобретает более достоверное значение, т. к. в противном случае на него в большей степени оказывает влияние чувствительность индикаторной культуры, а не количественные показатели качества препарата.

Эффективность применения бактериофагов в отношении вспышечной заболеваемости

Чанышева Р.Ф.¹, Ковалишена О.В.¹,
Квашнина Д.В.¹, Саперкин Н.В.²

¹Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Российская Федерация;

²Университет Утрехта, Утрехт, Нидерланды

Цель: оценка эпидемиологической эффективности применения бактериофага (БФ) для купирования вспышки катетер-ассоциированной инфекции кровотока (КАИК), вызванной *S.aureus*, в отделении диализа и гравитационной хирургии крови.

Материалы и методы. Для изучения возможности применения коммерческих препаратов БФ для купирования вспышки КАИК проведена оценка чувствительности эпидемически значимых штаммов *S.aureus* ($n = 13$), выделенных от пациентов с КАИК, объектов внешней среды, и от бактерионосителей к препарату «Бактериофага стафилококкового» (серии 213, 215, 217, 218), ФГУП «НПО «Микроген», Н.Новгород. Фагочувствительность культур определялась spot-методом. Для подтверждения гипотезы о формировании госпитального штамма *S.aureus* проведена MALDI-ToF масс-спектрометрия культур ($n = 21$), выделенных в период эпид.неблагополучия по КАИК (октябрь–ноябрь 2016 г.), а также от пациентов с КАИК, зарегистрированных ранее (май 2015 г.–июнь 2016 г.)

Результаты. Вспышка возникла среди пациентов получающих программный гемодиализ и продолжалась с 8.09.16 до 25.11.16 г. Было зарегистрировано 7 случаев КАИК (2 летальных исхода), клинические проявления в 71,4% случаев носили генерализованный характер, в 28,6% – местной инфекции. Этиологически расшифрованы 6 случаев, все стафилококковой природы. При проведении

расследования установлены эпидемиологические связи между пациентами, получены положительные результаты смывов (*S.aureus* со стетоскопа врача, аппарата диализа), выявлено 3 пациентки и 1 сотрудница с бессимптомным носительством *S.aureus* в носоглотке. Результаты масс-спектрометрии (объединение в один кластер *S. aureus*, выделенных в 2015 и 2016 гг.) подтвердили предположение о циркуляции госпитального штамма. Для фаготерапии и биологической дезинфекции использовались высоковирулентные серии БФ («++++») – №213, 215, 217. У пациентов и носителей фаги применялись согласно клиническим рекомендациям. Для обработки внешней среды использовалась однократная схема дезинфекции фагами методом распыления (доза – 2 мл/м²). Контрольное обследование пациентов, получавших БФ, а также смывов с поверхности, показало: *S.aureus* обнаружен не был, что свидетельствует о его полной элиминации.

Выводы. Таким образом, нами продемонстрирован высокий противозидемический потенциал БФ, которые могут с успехом использоваться для купирования вспышек ИСМП.

Результаты определения фагочувствительности в рамках регионального мониторинга комплексной оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Чанышева Р.Ф., Ковалишена О.В.

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Российская Федерация

Цель: сравнительная оценка результатов регионального мониторинга фагорезистентности за период 2009–2011 и 2015–2016 гг. для оптимизации применения препаратов бактериофагов (БФ).

Материалы и методы. Изучена литическая активность «Бактериофага стафилококкового» (серии 213, 215, 217, 218), ФГУП «НПО «Микроген», Н.Новгород. Серии были обновлены добавлением высоковирулентных фаговых рас, максимально адаптированных в отношении культур, циркулирующих в медицинских организациях (МО) Н. Новгорода и области в 2009–2011 гг. и за период до 2015 г. Литическая активность БФ определялась spot-методом на 189 штаммах *Staphylococcus spp.* (*S.aureus* ($n = 62$), коагулазонегативные стафилококки (КНС) (127)), выделенных от пациентов из 15 МО. Распространенность чувствительности/устойчивости рассчитывалась на 100 культур (%). Объем исследований – 1540.

Результаты. Сравнительная оценка чувствительности стафилококков к адаптированному БФ с данными 2009–2011 гг. выявила изменение распространенности устойчивости и чувствительности. Доля фагочувствительных культур составила: *S.aureus* – 84,7%, КНС – 69,5%, *Staphylococcus spp.* – 74,5%, что в 2,3 и 7 раз выше по сравнению с чувствительностью к необновленным препаратам. Распространенность фагорезистентности среди

S.aureus снизилась в 2,9 раза, составив в 2015–2016 гг. 12,1% vs 34,7% в 2009–2011 гг. ($p = 0,03$), в 2,9 раза для КНС – 25,8% vs 74% ($p = 0,002$). В целом распространенность фагорезистентности к БФ снизилась в 2 раза – 21,3% vs 41,6% ($p = 0,035$). Вне зависимости от серии препарата, доля чувствительных штаммов стафилококков также доминировала ($p = 0,01$) и составила 82,3–87,1% у *S.aureus* и 68,5–71,7% у КНС. Несмотря на достоверное снижение частоты выделения устойчивых штаммов КНС в 2015–2016 гг., кратность их превышения относительно *S.aureus* не изменилась и составляет 2,1 раза, что подтверждает необходимость создания коагулазонегативного стафилококкового БФ.

Выводы. Проведение мониторинга фагорезистентности дает более широкое представление о чувствительности популяции микроорганизмов в регионе к коммерческим препаратам БФ (не исключая необходимости оценки фагочувствительности выделенного возбудителя к конкретному БФ перед его применением). Включение определения фагорезистентности в региональный микробиологический мониторинг позволит проводить своевременную актуализацию препаратов БФ, не дожидаясь критического распространения устойчивости к ним.

Применение бактериофагов в акушерстве, неонатологии, гинекологии: современное состояние проблемы

Чубаров В.В., Любасовская Л.А., Ачкасова Е.Н., Кондрахин А.П., Акимкин В.Г., Припутневич Т.В.

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова, Москва, Российская Федерация

Актуальность: Глобальная проблема устойчивости бактерий к антибиотикам заставляет человечество более широко использовать альтернативные лекарственные средства, к числу которых относятся препараты бактериофагов (БФ) и искать новые ниши для их применения. Изучение возможности использования БФ в стационаре для лечения и профилактики инфекций, вызванных полирезистентными штаммами, является одной из приоритетных задач современной медицины.

Цель: сформулировать основные преимущества и ограничения использования БФ в акушерстве и неонатологии, наметить пути их решения.

Результаты. Многие противомикробные лекарственные средства запрещены к использованию у беременных и новорожденных, в то время как представленные на отечественном рынке лекарственные препараты БФ – разрешены. Многолетнее использование БФ на территории СНГ не показало наличия тератогенного и токсического воздействия на организм женщины и ребенка. Безусловным преимуществом БФ является строгая видовая антимикробная специфичность, позволяющая элиминировать возбудителя без воздействия на другие микроорганизмы, т.е. отсутствует эффект параллельного ущерба на нормальную микрофлору влагалища женщины и на процесс становления

микробиоты кишечника новорожденного. Практическое полное отсутствие у БФ лекарственных взаимодействий с другими лекарственными средствами позволяет использовать их в отделениях реанимации, на фоне массивной фармакотерапии, тем самым снижая вероятность негативных последствий полипрагмазии по жизненным показателям. Доказанная эффективность бактериофагов в отношении метициллин-резистентных *S.aureus* и *P.aeruginosa* позволяет использовать их для санации носителей среди медицинского персонала родильных домов и для обработки предметов внешней среды.

Выводы. Проведение исследований по использованию БФ с целью профилактики и лечения госпитальных инфекций, создание нормативных документов по клиническому их применению в акушерстве, гинекологии и неонатологии позволит снизить селективное давление антибиотиков в госпитальной среде, своевременно проводить профилактические и лечебные мероприятия как в стационаре, так и на догоспитальном этапе.

Проблемы использования нитчатого бактериофага М13, как платформы для создания пептидных антигенов

Шаньшин Д.В.^{1,3}, Казачинская Е.И.¹, Бакулина А.Ю.², Ильичев А.А.¹, Шаповал А.И.³, Щербаков Д.Н.^{1,3}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Российская Федерация;

³Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация

Два основных параметра определяющих эффективность иммунохимических диагностических методов это чувствительность и специфичность. Достичь высокой специфичности возможно на основе наличия специфически взаимодействующей пары антиген-антитело. Одним из способов повышения специфичности такого взаимодействия является использование пептидных антигенов. Однако, использование пептидов, чаще всего сопряжено со снижением чувствительности. Одним из способов повышения представленности пептидов может быть использование нитчатых бактериофагов. Применимость этого подхода было решено проверить с использованием фрагментов полипептида вируса Зика. Для презентации пептидов было решено использовать мажорный белок нитчатого бактериофага М13, рVIII. Была использована система р88.

Рекомбинантные бактериофаги нарабатывали в клетках *E.coli* DH5 α F⁺. Все они оказались жизнеспособны и накапливались в культуре в количествах не менее 10¹² БОЕ/мл. Все варианты частиц бактериофага были растворимы в водных растворах, и, пригодны для сорбции на поверхности иммунологических планшетов или нитроцеллюлозной мембране.

При оптимизации условий постановки ТФ-ИФА с бактериофагами в качестве контроля использовали бактериофаг М13 без специфической встройки. В процессе ИФА

был выявлен высокий уровень фона на контрольный бактериофаг М13, который, скорее всего, может быть связан с неспецифическим взаимодействием антител сыворотки здоровых доноров с белками бактериофагов. Кроме того в суспензии частиц фага могут присутствовать фрагменты белков клеток *E.coli*.

Данное предположение было подтверждено ИФА с обеднением используемых сывороток бактериофагами и надосадочной жидкостью. Результат показал, значительное снижение фонового сигнала, однако разница между использованием в обеднении бактериофагов и культуральной жидкости не значительна. Для выяснения, какую роль в высоком фоновом значении играет каждый из этих факторов, мы провели вестрн-блот анализ, который показал, что основной вклад в высокий уровень фонового значения вносят фрагменты клеток *E.coli*.

Исследование МКА 10Н10 против вируса клещевого энцефалита с помощью фаговой библиотеки пептидов

Шаньшин Д.В.^{1,3}, Шапрова О.Н.¹, Мурашкин Д.Е.^{1,3}, Протопопова Е.В.¹, Локтев В.Б.¹, Ильичев А.А.¹, Бондарь А.А.², Щербаков Д.Н.^{1,3}

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация;

³Алтайский государственный университет, Барнаул, Российская Федерация

Случаи заболевания клещевым энцефалитом (КЭ) ежегодно регистрируются по всей территории России. Для создания активного иммунитета используют вакцины на основе инактивированного вируса КЭ. В то же время отсутствуют эффективные средства специфической терапии, как правило, пациентам назначают поддерживающую терапию. В настоящее время в качестве терапевтического препарата используют иммуноглобулины человека, полученные из плазмы здоровых доноров. Альтернативой таким препаратам могут быть моноклональные антитела, в том числе их генно-инженерные варианты.

Рациональный дизайн генно-инженерных вариантов требует знания не только структуры самого антитела но и организации эпитопа с которым антитело взаимодействует. Одним из способов получения информации о структуре эпитопов является использование фаговых пептидных библиотек.

Целью работы являлось картирование эпитопа моноклонального мышиноного антитела 10Н10, взаимодействующего с поверхностным гликопротеином вирусом КЭ, с использованием двенадцатимерной фаговой пептидной библиотеки. Для проведения аффинной селекции использовали процедуру сорбции антител на магнитных частицах, которая позволяет увеличить доступность взаимодействия этой области антитела с пептидами экспонированными на поверхности бактериофага в составе

белка оболочки рIII Концентрация полученного элюата, содержащего бактериофаги после трех раундов аффинной селекции, составляла 3×10^6 БОЕ/мл, что свидетельствует об обогащении фаговой пептидной библиотеки специфически связывающимися с исследуемым антителом бактериофагами.

100 индивидуальных фаговых клон было секвенировано с помощью автоматического секвенирования по Сенгеру. Анализ нуклетидных последовательностей, кодирующих отобранные пептиды позволил выявить 83 фаговых клон, обладающими уникальными аминокислотными последовательностями в районе рандомизированной встройки. Кроме того, в репертуаре последовательностей было выявлено 2 консенсусных мотива которые имели высокую степень сходства с последовательностью петли слияния белка Е вируса КЭ.

Таким образом, технология фагового дисплея позволила нам выявить топографию эпитопа на белке Е, с которым взаимодействует антитело 10Н10.

Новый Т-четный бактериофаг AM101 инфицирующий *Acinetobacter baumannii*

Шнейдер М.М., Попова А.В., Тимошина О.Ю., Шагин Д.А., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Образцова Е.А., Куликов Е.Е., Мирошников К.А., Эдельштейн М.В., Козлов Р.С.

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация

Acinetobacter baumannii – вид граммотрицательных неферментирующих аэробных бактерий, возбудитель разнообразных нозокомиальных инфекций. Опасным делает *A. baumannii* высокая пластичность генома и способность к натуральной трансформации, как следствие актуальные клинические штаммы имеют значительное количество генов, кодирующих антибиотикрезистентность.

Нередки панрезистентные штаммы. Один из возможных вариантов лечения инфекций, вызываемых *A. baumannii*, – применение фаговой терапии и, как вариант, в сочетании с антибиотиками. Первые результаты использования фаговой терапии инфекции вызванной панрезистентным штаммом *A. baumannii*, полученные в США, внушают оптимизм. Опыт показывает, что терапию необходимо осуществлять воздействием коктейлями, состоящими из нескольких фагов, очевидно использующих разные типы рецепции на поверхности бактериальной клетки. В то же время, бактериофаги, инфицирующие *A. baumannii*, на данный момент изучены недостаточно.

Мы изолировали новый бактериофаг *A. baumannii*, принадлежащий к группе Т-четных фагов, AM101.

На данный момент детально охарактеризован только один единственный Т-четный фаг инфицирующий *A. baumannii* – ZZ1. Фаг AM101 был выделен из воды реки Москва, что косвенно показывает, что бактерия является обитателем проточных водоемов в городской среде. Обнаружено, что фаг инфицирует целый ряд штаммов *A. baumannii*.

Геном фага состоит из 166487 нуклеотидов, кодирует 250 открытых рамок считывания и 10 tRNA. Согласно геномным данным фаг, AM101 не отличается от классических Т-четных фагов.

Нами обнаружена специфическая разновидность структурного белка фибритина, имеющего предсказанный с большой вероятностью С-концевой домен деацетилазы. Видимо фибритин принимает участие в рецепции фага на поверхности бактериальных клеток, и при этом выполняет процессинг окружающих клетку углеводов.

Недавно показано, что целый ряд фагов используют для защитной модификации ДНК арабинозу, ковалентно прикрепленную к остаткам гидроксиметилцитозина, и определены ключевые гены, ответственные за этот процесс. Мы обнаружили гомологи данных генов в геноме фага AM101.

Нами найдены два гена, кодирующих гомологичные друг другу гликозилтрансферазы, очевидно, непосредственно отвечающие за перенос остатков арабинозы на ДНК. Т-четные фаги должны стать компонентом коктейлей для лечения инфекций.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ

Бактериофаги, специфичные к бактериям рода *Klebsiella*

Ушакова Т.А., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Тикунов А.Ю., Юнусова А.Ю., Фофанов М.В., Боковая О.В., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Бактерии рода *Klebsiella* относятся к условно-патогенным бактериям и могут вызывать пневмонию, сепсис, локальные абсцессы и инфекции дыхательных путей. В силу высокой способности клебсиелл к образованию капсул, биопленок, а также вследствие множественной устойчивости к антибиотикам, клебсиелльные инфекции зачастую трудно поддаются антибиотикотерапии и являются одной из распространенных нозокомиальных инфекций. В качестве альтернативы антибиотикам или в сочетании с ними могут быть использованы препараты клебсиелльных бактериофагов.

Из различных источников было выделено 23 потенциально терапевтических бактериофага, специфичных к бактериям рода *Klebsiella*. Спектр штаммов-хозяев был исследован с использованием более 60 клинических штаммов (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Raoultella planticola* и *Raoultella terrigena*) из Коллекции экстремофильных микроорганизмов и типовых культур ИХБФМ СО РАН. Одиннадцать фагов обладали широким спектром литической активности, остальные оказались узкоспецифичными. Пятнадцать бактериофагов имели другой спектр штаммов-хозяев, чем терапевтические фаговые препараты, присутствующие на рынке.

Методами электронной микроскопии было выявлено, что все исследуемые бактериофаги относятся к семействам *Myoviridae* и *Podoviridae*.

Показаны высокая стабильность, быстрая адсорбция на клетках, короткий латентный период и высокая урожайность для четырех бактериофагов, специфичных к патогенным штаммам *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*.

Полногеномные последовательности пяти фагов сходны с геномами фагов рода *Kp32virus*, семейства *Podoviridae*, геномы двух других фагов – с родом *Jd18virus Myoviridae* и родом *N4virus* семейства *Podoviridae*, соответственно. Надо отметить, что клебсиелльных фагов, относящихся к роду *N4virus*, ранее выделено не было.

Таким образом, исследуемые бактериофаги обладают хорошими литическими свойствами, широким спектром активности, не содержат нежелательных последовательностей в геномах и потенциально могут быть использованы для терапии инфекций, вызываемых возбудителями *Klebsiella* и *Raoultella*.

Роль пробиотиков в поддержании здоровья современного человека

Жиленкова О.Г.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Применение современных ОМИК технологий в последние два десятилетия позволило получить новые данные о значении симбионтной микрофлоры в формировании и поддержании здоровья современного человека и возникновении многих заболеваний. Показано, что микрофлора является своеобразным экстракорпоральным органом макроорганизма, включающим в себя миллиарды микроорганизмов (преимущественно анаэробных) и выполняющим как регуляторную функцию, так и вносящим заметный вклад в анатомию и физиологию человека. В естественных условиях обитания нет ни одного биохимического процесса, ни одной функции живых организмов, которые бы осуществлялись без прямого или опосредованного участия в них симбиотических (пробиотических) микроорганизмов. Более 90% россиян имеют различные микробиологические нарушения (дисбактериоз) и отмечается тенденция к постоянному их росту, становится очевидным насколько важно приостановить дальнейшее разрушение здоровья жителей нашей страны.

Широкое практическое применение нашли приемы коррекции микробной экологии человека через назначение пробиотиков, пребиотиков, симбиотиков метабиотиков.

Впервые термин «пробиотики» как антагонист «антибиотиков» был введен в 1954 году F. Vergio, который в своей монографии «Anti- und Probiotika» проводил сравнение различных соединений, обладающих как антимикробными, так и позитивными эффектами на кишечную микрофлору. Согласно ГОСТ Р 52349-2005 пробиотик (probiotic) – это функциональный пищевой ингредиент в виде полезных для человека (непатогенных и нетоксичных) живых микроорганизмов, обеспечивающий при систематическом употреблении в пищу в виде препаратов или в составе пищевых продуктов благоприятное воздействие на организм человека в результате нормализации

состава и (или) повышения биологической активности нормальной микрофлоры кишечника.

К использованию при изготовлении продуктов функционального питания и биологически активных добавок разрешенных ГОСТ Р 555777-2013 видов, обоснованных с точки зрения доказательной медицины рекомендованы бифидобактерии (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. breve*), лактобактерии (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*) и живые йогуртные культуры (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*). Приложение 7 Технического регламента Таможенного союза 021/2011 ограничивает перечень разрешенных штаммов до пробиотиков, выделенных только от человека, не способных вызывать заболевания и осуществлять или опосредовать передачу генов антибиотикорезистентности.

Систематическое использование пробиотических препаратов, биологически активных добавок и продуктов питания усиливает иммунитет, предотвращает развитие аутоиммунных нарушений, аллергических и атопических патологий, воспалительных заболеваний кишечника, нормализует пул гистамина, нейромедиаторов и щавелевой кислоты, оказывает гипохолестеринемический противоопухолевый и другие положительные эффекты на человека.

Кишечная микробиота формирует колонизационную резистентность по отношению к потенциально болезнетворным микроорганизмам за счет образования бактериостатических низкомолекулярных метаболитов (короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), оксид азота, глутамат, гистамин, серотонин, мурамил дипептид и др.), участвует в деградации бактериальных токсинов, деконъюгации желчных кислот, продукции широкого спектра антимикробных веществ семейства бактерицинов. При дефиците бифидобактерий и лактобацилл, синтезирующих деконъюгазы, переводящие холестерин в нерастворимые формы, он из толстой кишки всасывается в кровь, что сопровождается гиперхолестеринемией и гипертриглицеридемией, вследствие чего формируется гиперхолестеринемия, вследствие чего формируется гиперхолестеринемия, вследствие чего формируется гиперхолестеринемия желчи и стеатоз печени и другие неинфекционные заболевания.

КЦЖХ (уксусная, пропионовая, масляная, молочная) поддерживают оптимальные значения pH в просвете толстой кишки; нормализации гемодинамики; блокируют рецепторы эпителиоцитов; регулируют моторику ЖКТ (стимуляция перистальтики тонкой и толстой кишки, опорожнения желудка, сокращение времени транзита пищи). Нормофлора участвует в синтезе эссенциальных нутриентов: витаминов группы В (тиамин, рибофлавин, пиридоксин, цианкобаламин, фолиевой, пантотеновой, никотиновой кислот), биотина, витамина К, таких важных для организма аминокислот, как аргинин и глутамин; в метаболизации наркотиков, гормонов и канцерогенных веществ, включая дигоксин сульфасалазины и эстрогены.

В настоящее время активно исследуются сложнейшие молекулярно-генетические механизмы защиты организма от агрессивных средовых факторов. Основной принцип действия защитных механизмов, контролирующих колони-

зацию ЖКТ, состоит в способности отличать непатогенные элементы (бактерии-комменсалы, пищу) от энтеропатогенов. При применении бифидобактерина в течение 3 недель показано увеличение количества Т-лимфоцитов, Т-хелперов, активированных Т-лимфоцитов (CD25+) и NK-лимфоцитов в периферической крови. Также увеличивалась фагоцитарная активность нейтрофилов и моноцитов крови.

Таким образом, индигенная флора кишечника играет важную роль в формировании иммунного ответа, предотвращению развития воспалительных заболеваний, регуляции гомеостаза.

В нашей стране и за рубежом разработано большое количество как моно, так и комплексных пробиотиков, состоящих из нескольких (от 2 до 30) различных живых микроорганизмов, находящихся как в жидкой фазе, так и лиофильно высушенных. Для создания обогащенных пробиотиков используют комбинации с пребиотиками поли- и олигофруктаны, соевые олигосахариды, галактоолигосахариды, изолированные из природных источников или получаемые биотехнологическим или синтетическим методами, а также различные блокаторы адгезии и ингибиторы роста патогенных и оппортунистических микроорганизмов (лектины, антиадгезины, модуляторы синтеза секреторных иммуноглобулинов, дефензины различных типов, структурные компоненты пробиотических микроорганизмов, их метаболиты и т.д.), витамины, минералы.

Многолетний опыт применения пробиотиков показывает, что даже при длительном применении положительный эффект у отдельных лиц нередко носит транзитный характер, а порой, и полностью отсутствует. Появились отдельные сообщения о возникновении при длительном применении живых пробиотических микроорганизмов, различных осложнений (лактоидемии у грудных детей, аутоиммунные заболевания, аллергические проявления, оппортунистические инфекции, дисбиотические состояния, обусловленные назначением больших доз пробиотических препаратов и т.д.). Одной из главных причин этого может быть чужеродность для человека входящих в их состав микроорганизмов, недостаточный учет высокой видовой, индивидуальной и анатомической специфичности автохтонной микрофлоры лиц, которым назначают эти средства коррекции микробиологических нарушений.

Исходя из этого, создание и рациональное применение пробиотиков рассматривают как стратегическое направление альтернативной медицины, направленное на поддержание и восстановление здоровья человека и увеличение его активного долголетия.

Мониторинг мяса на наличие остаточных количеств антимикробных веществ и управление рисками, возникающих при производстве и употреблении мясных продуктов

Юшина Ю.К., к.т.н., Батаева Д.С., к.т.н., Зайко Е.В.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН, Москва

В настоящее время одной из наиболее острых проблем в мясоперерабатывающей отрасли стоит применение антимикробных веществ и антибиотиков. Присутствие антибиотиков в сырье затрудняет реализацию ряда технологий вплоть до невозможности изготовления некоторых продуктов питания.

Требования безопасности (включая санитарно-эпидемиологические, гигиенические и ветеринарные) для пищевой продукции (в том числе, мясной), находящейся в обращении на территории Российской Федерации содержатся в Техническом регламенте Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" ТР ТС 021/2011 и ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции» установлен контроль за содержанием наиболее часто используемых в животноводстве и ветеринарии кормовых и лечебных антибиотиков для мясного сырья, субпродуктов: левомицетин, тетрациклиновая группа, гризин, бацитрацин.

В то же время, в настоящее время, в ветеринарии используются более 2000 ветеринарных лекарственных средств, из которых около 500 обладают антимикробным действием.

Согласно информации Росстата, каждый год увеличивается производство кормовых антибиотиков, так в общей сложности по всей России, примерно сто тонн продукции, было произведено в 2016 году и ежегодно этот показатель только увеличивается. Совершенно понятно, что такая система контроля нуждается в усовершенствовании и изменении, как порядка исследований, так и расширении списка антибиотиков с установленными максимально допустимыми уровнями их остатков в переработанной пищевой продукции животного происхождения.

14 августа 2018 г., вступило в силу решение Коллегии Евразийской экономической комиссии (ЕЭК) №28 от 13 февраля 2018 г., которым расширен список рекомендуемых для контроля ветеринарных лекарственных препаратов и закреплены предельно допустимые уровни остатков лекарств в переработанной пищевой продукции, в том числе и в мясе. Семьдесят два, наиболее часто используемых на территории стран Таможенного союза ветеринарных препарата (фармакологически активных вещества) включены в данный список с рекомендуемыми методиками исследований их остаточных количеств.

В производственных условиях провести исследования поступающего сырья на наличие всех перечисленных антибиотиков не представляется возможным.

Как видно из вышеизложенного, базисной проблемой определения наличия антибиотиков в мясе является отсутствие унифицированной быстрой методики определения. В связи с этим усовершенствование методологии мониторинга антибиотиков в мясе является актуальным и перспективным направлением исследования.

Целью настоящего исследования было проведение скринингового мониторинга мясного сырья на наличие антибиотиков и усовершенствование существующей методологии.

Проведенные скрининговые исследования показали высокий процент присутствия антибиотиков и антимикробных препаратов в мясе и мясных продуктах. Так, наиболее часто присутствие антибиотиков выявляется в мясе кур (42,9 % исследованных образцов), число положительных проб для свинины составляет – 35,3 %, в говядине – 26,7 %.

Биоинформатическая характеристика грам-отрицательных фирмикут, содержащего бета - лактамазу ACI-1

Chris M. Rands, Елизавета В. Старикова, Harald Brüßow, Евгения В. Кривенцева, Вадим М. Говорун, Евгений М. Здобнов

Федеральный Научно-Клинический Центр Физико-Химической Медицины

Бактерии класса Negativicutes составляют часть нормофлоры кишечника человека и животных, однако отдельные их виды связывают с возникновением инфекций, в частности, вагинозов. Устойчивость к бета-лактамам антибиотикам была описана для Acidaminococcus intestini, в геноме которого она определяется геном ACI-1, кодирующим бета-лактамазу класса А. Однако эволюционная история ACI-1 и степень его распространенности среди других бактерий класса Negativicutes остается неизученной. Мы изучили геномный контекст и распространенность гена ACI-1 в кишечных и вагинальных метагеномах человека и животных, а также в секвенированных бактериальных геномах.

Мы обнаружили, что в геномах A. intestini и Megasphaera elsdenii ген ACI-1 фланкирован рядом мобильных элементов, встроенных в профаг. В других проанализированных нами геномах класса Negativicutes копии гена ACI-1 находятся в окружении различных транспозонов, что может говорить о том, что в данном регионе активно происходят встройки мобильных элементов. Ген ACI-1 был обнаружен нами в ряде метагеномов как человека, так и животных в обрамлении транспозоноподобных элементов, в ряде случаев встроенных в профаг, имеющий четкую геномную структуру, характерную для хвостатых бактериофагов. Данный профаг является первым профагом, охарактеризованным для A.intestini и M.elsdenii, и одним из первых охарактеризованных для грам-отрицательных фирмикут. Произведенный нами анализ покрытия данных участков геномов предполагает, что как один из транспозонов, так и бактериофаг могут присутствовать в проанализированных нами образцах в свободном виде.

Работа была проведена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-54- 21012).

Contents

Comparative analysis of converting prophages of Siphoviridae in genomes of <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated during staphylococcal outbreaks in Russia Abaev I.V., Skryabin Yu.P., Kislichkina A.A., Korobova O.V., Bogun A.G., Dyatlov I.A.	7
Prophages in genome composition of <i>Klebsiella pneumoniae</i> clinical isolates Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Gordinskaya N.A.	7
Evaluation of effectiveness of comprehensive correction of violations of the composition of the intestinal microbiota in children bacteriophages, probiotics, lactoglobulin Aleshukina A.V., Polishchuk I.S., Aleshukina I.S., Goloshva E.V., Tverdokhlebova T.I.	8
Diversity phages in Kazakhstan as source for development new therapeutic preparations Alexyuk P.G., Alexyuk M.S., Turmagambetova A.S., Akanova K.S., Zhumanov Zh.Zh., Bogoyavlenskiy A.P., Berezin V.E.	8
Antimicrobial activity of bacteriophage encoded endolysins against Gram-negative bacteria Antonova N.P., Usachev E.V., Makarov V.V., Rubalsky E.O., Kiseleva I.A., Zulkarneev E.R., Popova A.V., Tkachuk A.P., Gushchin V.A.	9
Effect of lytic bacteriophages application on the dynamics of the phage sensitivity of pathogenic and opportunistic bacteria at the individual and group levels on a monkey model Arshba I.M., Orlov S.V., Rubalskii E.O., Aleshkin A.V., Rubalsky O.V., Agumava A.A., Polyakova V.I., Cherkashina E.V.	9
Bacteriophages for the control of <i>Klebsiella pneumoniae</i> outbreak in the neonatal intensive care unit Aslanov B.I., Lubimova A.V., Dolgiy A.A.	9
Antibiotic resistance in Russia: the stat of problem and perspectives of control Azizov I.S.	10
The database of receptor-recognizing domains of tail fibers of <i>Escherichia coli</i> bacteriophages and their O-antigen specificity Belalov I.Sh., Letarov A.V.	10
Combining transcriptomics and translomics in LUZ19 infected cells to comprehensively understand a phage and its subfamily Blasdel B., Grenga L., Malone J., Lavigne R.	11
Analysis of molecular-genetic methods for evaluation of safety of bacteriophages and products of their base Borisova O.Yu., Rubalskii E.O., Aleshkin A.V., Zulkarneev E.R., Rubalskii M.O.	11
Efficacy of phage re-therapy of experimental <i>Klebsiellosis</i> in mice Borzilov A.I., Korobova O.V., Kombarova T.I., Myakinina V.P., Verevkin V.V., Krasilnikova V.M., Solovieva E.V., Volozhantsev N.V.	11
Phage therapy against MDR <i>Pseudomonas aeruginosa</i> lung infection in an infant child. Case Report Ciubotaru A., Balica I., Rubalskii E., Chilianu M., Botizatu A., Dogotari V., Frunze D.	12
Characterisation of a hybrid c2/P335 <i>Lactococcus lactis</i> bacteriophage Damnjanovic D., Harvey M., Bridge W.	12
Development of the test system for indication and identification of bacteriophages zooatroposagnificant representative of «group <i>Bacillus cereus</i>» and «group <i>Bacillus subtilis</i>» Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Mastilenko A.V.	12
Selection of cholera bacteriophages for experimental preventive drug Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Pogozhova M.P.	13
Contribution of Nizhny Novgorod NNRIEM named after academician I.N.Blokhina in fundamental and applied research in the field of creation and application of bacteriophages Grigoreva G. I., Solovyeva I.V.	13
Gosty9 – a T5-like phage with a novel receptor specificity Golomidova A.K., Kulikov E.E., Belalov I.S., Letarov A.V.	14
The use of bacteriophages in treatment of patients with purulent-necrotic diseases of the lungs and pleura Gostishev V.K., Gorbacheva I.V., Zolotarev D.V., Telyashov A.D.	14
Short-circulating phages Hodyra-Stefaniak K., Lahutta K., Dabrowska K.	15
High-throughput technique for induction of staphylococcal prophages from lysogenic strains and determination of their host range Indráková A., Mašláňová I., Pantůček R., Doškař J.	15
Dickeya bacteriophage PP35: the structure of bacterial surface polysaccharide provides the infection of the alternative bacterial host Kabanova A.P., Shneider M.M., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Zdorovenko E.L., Toschakov S.V., Ignatov A.N., Knirel Yu.A., Miroshnikov K.A.	16
Development of organo-inorganic hybrid coatings with sorbated bacteriophages to reduce the risk of development of medical acquired infections Kaminsky V.V., Aleshkin A.V., Zulkarneev E.R., Kiseleva I.A., Efimova O.G., Emelianenko K.A., Emelyanenko A.M., Boinovich L.B.	16
The quantitative model of probiotics interaction with non probiotics and new criteria for synbiotic compositions development Karetkin B., Evdokimova S., Guseva E., Grosheva V.	17
The purification of phages for clinical applications Kiljunen S., Hietala V., Carron A., Horsma-Heikkinen J., Skurnik, M.	17
Phage MS2 – oncochemotherapy target cargo Kolesanova E.F., Bolshakova T.N., Ribalkina E.U., Sivov I.G.	17
Phage peptide libraries as a tool for studying the specificity profile of antibodies Kolossova E.A., Murashkin D.E., Morosov I.V., Ilyichev A.A., Chapoval A.I., Shcherbakov D.N.	18
Bacteriophages and probiotics in correction of intestinal dysbiosis at food allergy Kosyakova N.I., Andreeva L.A.	18
Freezing of plaques as a novel method for long term storage of bacteriophage Kubala A.E., Pehinec T.M., Swift B.M.C., Rees C.E.D.	19
First clinical results of individualized phage therapy in the field of cardiovascular surgery Kühn C., Rubalskii E., Rümke S., Salmoukas C., Haverich A.	19
Altered O-antigen length confers <i>E. coli</i> a resistance to RB49-like phage Kulikov E.E., Golomidova A.K., Ivanov P.A., Knirel Yu.A., Letarov A.V.	19

Detailed characterization of intestiphage and pyophage as a step toward broader clinical research in phage therapy Kutter E., Langevin S., Parker D., Kroupa A., Vananzo S., Leister L., Gunther J., Pratt A., Pousson A., Foster B., Glassbrook D.	20	Prospects for design of phage-containing compositions against staphylococcal biofilms Rubalsky O.V., Galimzyanov Kh.M., Rubalsky M.O., Dosmukhanova E.G., Demina Yu.Z., Krasilova E.V.	25
Experience in the use of a lytic bacteriophage SE40 for biocontrol of salmonella enteritidis at a poultry farm Laishevcev A.I., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Kaminskii V.V., Zul'karneev E.R.	20	Prospectives of phage therapy in Western medicine Saperkin N.V., Scholten R.J.P.M., Chanysheva R.F.	26
Physiology of interaction of bacteriophage AMP1 with its <i>Burkholderia</i> host. Possible implication in natural control of melioidosis incidence Letarov A.V., Morozov A.Y., Ivanov P.A., Galyov E.E., Bogdan V.I., M.R.J. Clokie.	21	Molecular techniques for diagnostics and monitoring of antimicrobial resistance of bacterial infection agents – capabilities of their practical application Savochkina Yu.A., Timoshina O. Yu., Guschin A.E.	26
Metastable (pseudolysogenic) associations of virulent coliphages and their hosts Letarova M.A., Letarov A.V.	21	Personalized phage therapy of healthcare-associated infections Shkoda A.S., Aleshkin A.V., Bochkareva S.S., Ershova O.N., Mitrokhin S.D., Kiseleva I.A., Zul'karneev E.R., Rubalskii E.O., Kühn C., Haverich A., Novikova L.I.	27
High density <i>chlorobium phaeovibrioides</i> population in the meromictic Lake Trekhtzvetnoe (Murmansk region, Russia) is associated with bacteriophages Letarova M.A., Savvichev A.S., Boldyreva D.I., Babenko V.V., Krasnova E.D., Letarov A.V.	22	Novel T-even phage AM101 infecting <i>Acinetobacter baumannii</i> Shneider M.M., Popova A.V., Timoshina O.Yu., Shagin D.A., Mikhailova Yu.V., Yanushevich Yu.G., Obratsova E.A., Kulikov E.E., Miroshnikov K.A., Edelshtein M.V., Kozlov R.S.	27
Phage-specific I,d-peptidases of the M15 family: structure, regulation, distribution and biotechnological prospects Mikouliniskaia G.V., Chernyshov S.V., Zimin A.A., Prokhorov D.A., Shadrin V.S., Molochkov N.V., Kutyshenko V.P.	22	Age dynamics of the titer of bacteriophages of <i>E. coli</i> in intestinal microbiocenosis of chickens during the first 38 days from the birth Skoblikov N.E., Osepchuk D.V., Moskalenko E.A., Zimin A.A.	27
Bacteriophages for biocontrol of Soft-Rot potato bacteriosis Miroshnikov K.A., Kabanova A.P., Shneider M.M., Barannik A.P., Vasiliev D.M., Korzhenkov A.A., Miroshnikov K.K., Toschakov S.V., Ignatov A.N.	23	Interesting findings on <i>Yersinia</i> phages Skurnik, M.	28
Genomic characterization of lytic <i>Yersinia pestis</i> bacteriophages fEV-1 and fD1 Pajunen M.I., Happonen L.J., Jaakkola S.T., Mattinen L., Nawaz A., Trivedi M.-M., Skurnik M.	23	Experience of joint use of bacteriophages and probiotics in treatment of combined gynecological and gastroenterological pathology Solovyeva I.V., Tochilina A.G., Belova I.V., Zhirnov V.A., Ivanova T.P.	28
In silico analysis of tail fiber proteins of streptomycetes phage phiC31 Patlevicova A., Sramkova Z., Godany A.	23	MALDI-TOF Mass Spectrometry for identification of <i>Staphylococcus bacteriophages</i> Stverakova D., Sedo O., Benesik M., Zdrahal Z., Doskar J., Pantucek R.	28
Endolysins of bacteriophages infecting <i>Bacillus cereus</i> and <i>Enterococcus faecium</i> Pilgrimova E.G., Baicher S.D., Kulyabin V.A., Shadrin A.M.	24	Bacteriophages for modulating mammalian microbiome: the Phagebiotix™ approach Sulakvelidze A.	29
Unusual interactions of <i>pseudomonas aeruginosa</i> virulent phages and their host-bacteria Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Krylov S.V., Bourkal'tseva M.V., Krylov V.N.	24	Polysaccharide-depolymerases of capsule-specific bacteriophages of <i>Klebsiella pneumoniae</i> Volozhantsev N.V., Solovieva E.V., Krasilnikova V.M., Myakinina V.P., Verevkin V.V., Borzilov A.I., Shpirt A.M., Knirel Y.A.	29
Host recognition by podoviruses G7C and Alt Prokhorov N.S., Nazarov S., Riccio C., Guerrero-Ferreira R., Golomidova A.K., Zdorovenko E.L., Knirel Y.A., Letarov A.V., Leiman P.G.	24	Bacteriophages, specific to bacteria of Genus <i>Klebsiella</i> Ushakova T.A., Morozova V.V., Kozlova Yu.N., Tikunov A.Yu., Yunusova A.Yu., Fofanov M.V., Bokovaya O.V., Tikunova N.V.	30
Genomic characterisation of a negativicutes prophage containing ACI-1 beta-lactamase Rands C.M., Starikova E.V., Brüßow H., Kriventseva E.V., Govorun V.M., Zdobnov E.M.	25	Current problems and prospective lines of phage therapy and phagoprophylaxis Zakharova J.A., Fedotova O.S.	30
Local drug-delivery system for bacteriophages Rubalskii E., Rümke S., Salmoukas C., Aleshkin A., Bochkareva S., Modin E., Boyle E.C., Haverich A., Kühn C.	25	The role of probiotics in maintaining the health of modern man Zhilenkova O.G.	31
		Monitoring of residues antimicrobial substances in meat and management of risks connecting with the production and use of meat products Yushina Yu.K., Ph.D., Bataeva D.S., Ph.D., Zayko E.V.	32

Содержание

Сравнительный анализ конвертирующих профагов семейства <i>Siphoviridae</i> в геномах штаммов <i>Staphylococcus aureus</i>, изолированных при вспышках стафилококковых инфекций в России Абаев И.В., Скрыбин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Дятлов И.А.	33
Микробиологический мониторинг фагорезистентности условно-патогенной микрофлоры у детей с дисбиозами Алексанина Н.В.	33
Профаги в составе генома клинических изолятов <i>Klebsiella pneumoniae</i> Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф1, Гординская Н.А.	34
Иммунологические аспекты фаготерапии Алешкин В.А., Бочкарева С.С., Ершова О.Н., Савин И.А., Бляхер М.С., Алешкин А.В., Фёдорова И.М., Новикова Л.И., Митрохин С.Д., Котелева С.И., Киселева И.А., Зулькарнеев Э.Р., Шкода А.С.	34
Оценка эффективности комплексной коррекции нарушения состава микробиоты кишечника у детей бактериофагами, пробиотиками, лактоглобулином Алешукина А.В., Полищук И.С., Алешукина И.С., Голошва Е.В., Твердохлебова Т.И.	35
Разработка состава лекарственной формы бактериофагов для лечения инфекционных заболеваний наружного уха Анурова М.Н., Алешкин А.В., Бахрушина Е.О., Бочкарева С.С., Киселева И.А., Воробьев А.М.	35
Бактериофаги для купирования вспышки, вызванной <i>Klebsiella pneumoniae</i>, в отделении реанимации новорожденных Асланов Б.И., Любимова А.В., Долгий А.А.	36
Специфичность бактериофагов рода <i>Providencia</i> Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	36
Бактериофаги <i>Providencia</i>, используемые для создания биопрепарата по деконтаминации пищевых продуктов Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	36
Бактериофаги <i>Providencia</i> Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	37
Оценка чувствительности к бактериофагам эковаров коагулазонегативных стафилококков, циркулирующих в детском стационаре Беляева Е.В., Борискина Е.В., Ермолина Г.Б., Шкуркина И.С., Кряжев Д.В.	37
Эффективность повторной фаготерапии экспериментальной клебсиеллезной инфекции у мышей Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Мякина В.П., Верёвкин В.В., Красильникова В.М., Соловьева Е.В., Воложанцев Н.В.	38
Актуальные проблемы применения бактериофагов в практике Брусица Е.Б.	38
Антибиотикаграмма бактерий рода <i>Klebsiella</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> под влиянием специфических бактериофагов Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.	39
Использование бактериофагов PP16 и PP17 против <i>Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum</i> в защите картофеля Васильев Д.М., Воронина М.В., Бугаева Е.Н., Кабанова А.П., Мирошников К.А., Игнатов А.Н.	39
Эффективность комплексной коррекции лямблиоза пробиотикотерапией Васюнин А.В., Куимова И.В., Краснова Е.И., Гаврилова Н.И., Сурдина Т.Г., Кибирева Е.Н.	40
Полисахарид-деполимеразы капсулоспецифичных бактериофагов <i>Klebsiella pneumoniae</i> Воложанцев Н.В., Соловьева Е.В., Красильникова В.М., Мякина В.П., Верёвкин В.В., Борзилов А.И., Шпирт А.М., Книрель Ю.А.	40
Отбор холерных бактериофагов для создания экспериментального профилактического препарата Гавская Н.Е., Тюрина А.В., Погожова М.П.	41
Применение бактериофагов в программе лечения больных с гнойно-некротическими заболеваниями легких и плевры Гостищев В.К., Горбачева И.В., Золотарев Д.В., Теляшов А.Д.	41
Вклад Нижегородского НИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной в фундаментальные и прикладные исследования в области создания и применения бактериофагов Григорьева Г.И., Соловьева И.В.	42
Оценка состояния микробиоценоза кишечника при различных нарушениях микробного и ферментного пищеварения по критерию резистентности микроорганизмов к бактериофагам Гудова Н.В., Оганесян А.С., Затевалов А.М., Селькова Е.П., Волчецкий А.Л.	42
Определение бактериофагов с помощью мини-антител методом электроакустического анализа Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Караваева О.А., Бородина И.А.	43
Разработка биопрепарата полифага в качестве дезинфицирующего средства бактериальных инфекций Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зинина Н.Н., Сармыкова М.К., Конбаева Г.М., Алиханов К.Д., Исабеков С.С., Досанов К.Ш., Шестаков А.Г., Васильев Д.А.	43
Распространенность фагорезистентности среди условно-патогенных бактерий в кишечном микробиоценозе у лиц с проявлениями дисбиотических нарушений Завгородняя Е.Ф.	44
Оценка резистентности микроорганизмов к бактериофагам при различных нарушениях микробного и ферментного пищеварения Затевалов А.М., Селькова Е.П., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Волчецкий А.Л.	44
Актуальные проблемы и перспективные направления фаготерапии и фагопрофилактики Захарова Ю.А., Федотова О.С.	45
Бактериофаг <i>Dickeya</i> PP35: строение поверхностного полисахарида бактерии обеспечивает инфекцию альтернативного бактериального хозяина Кабанова А.П., Шнейдер М.М., Корженков А.А., Мирошников К.К., Здоровенко Э.Л., Тоцаков С.В., Игнатов А.Н., Книрель Ю.А., Мирошников К.А.	45
Физиологические особенности бактериофагов, заражающих <i>Bacillus cereus sensu lato</i> Казанцева О.А., Пилигримова Э.Г., Загородный В.А., Кулябин В.А., Шадрин А.М.	46
Разработка органо-неорганических гибридных покрытий с сорбированными бактериофагами для снижения риска развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи Каминский В.В., Алешкин А.В., Зулькарнеев Э.Р., Киселева И.А., Ефимова О.Г., Емельяненко К.А., Емельяненко А.М., Бойнович Л.Б.	46

Стафилококковый бактериофаг SSP134 специфичный к широкому кругу коагулазо-негативных стафилококков Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Ушакова Т.А., Тикунов А.Ю., Тикунова Н.В.	47	Выделение и биологическая характеристика бактериофагов от европейских зубров – <i>Bison bonasus</i> (L , 1758) и американских бизонов – <i>Bison bison</i> (L , 1758), с целью отбора штаммов для терапии этих животных Никулин Н.А., Землянко И.И., Сузина Н.Е., Зимин А.А.	54
Бактериофаг MS2 – средство для таргетной химиотерапии опухолей Колесанова Е.Ф., Большакова Т.Н., Рыбалкина Е.Ю., Сивов И.Г.	47	Технологические аспекты разработки препаратов бактериофагов и эффективность их применения Орлова Е.В., Ефимова М.Г., Функнер Е.В., Николаева А.М., Ковязина Н.А., Шитова О.И., Шилова Е.Г.	55
Псевдолизогения <i>Staphylococcus epidermidis</i> по SPβ-подобному бактериофагу Корниенко М.А., Купцов Н.С., Манолов А.И., Кострюкова Е.С., Любасовская Л.А., Припутневич Т.В., Шитиков Е.А., Летаров А.В., Ильина Е.Н.	47	Конструирование и опыт применения средств на основе бактериофагов в стоматологии Пашкова Г.С., Исаджанян К.Е., Никитин В.В., Попова В.М., Жиленков Е.Л.	55
Фаговые пептидные библиотеки как инструмент изучения профиля специфичности антител Колосова Е.А., Мурашкин Д.Е., Морозов И.В., Ильичев А.А., Шаповал А.И., Щербаков Д.Н.	48	Профилактика и терапия препаратами бактериофагов инфекций мочевых путей Перепанова Т.С., Малова Ю.А., Толордава Э.Р., Круглов А.Н.	56
Бактериофаги и пробиотики в коррекции дисбиоза кишечника при пищевой аллергии Косякова Н.И., Андреева Л.А.	48	Эндолизины бактериофагов, инфицирующих <i>Bacillus cereus</i> и <i>Enterococcus faecium</i> Пилигримова Э.Г., Байчер С.Д., Кулябин В.А., Шадрин А.М.	56
Фагорезистентность условно-патогенной флоры кишечника у жителей урбанизированного севера Куяров А.А., Сайгушева Л.А., Дудко Е.Ф., Куяров А.В.	49	Неканонические взаимодействия вирулентных фагов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и бактерий-хозяев Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Крылов С.В., Буркальцева М.В., Крылов В.Н.	56
Выявление эндогенных бактериофагов у реанимационных больных при бактериемии и сепсисе Лазарева Е.Б., Черненко Т.В.1, Шабанов А.К., Евдокимова Н.В., Жиленков Е.Л., Петриков С.С.	49	Характеристика вирулентных бактериофагов и их полисахарид-деполимеризующих ферментов, активных в отношении разных капсульных типов <i>Acinetobacter baumannii</i> Попова А.В., Шнейдер М.М., Шагин Д.А., Михайлова Ю.В., Сенченкова С.Н., Арбатский Н.П., Образцова Е.А., Мирошников К.А., Козлов Р.С., Книрель Ю.А.	57
Опыт применения литического бактериофага SE40 для биоконтроля за <i>Salmonella Enteritidis</i> на птицеводческом хозяйстве Лаишевцев А.И., Алешкин А.В., Киселева И.А., Каминский В.В., Зулькарнеев Э.Р.	50	Фагоиндикация бактерий рода <i>Staphylococcus</i> Пульчеровская Л.П., Сверкалова Д.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.	57
Потенциал для применения бактериофагов в антираковых стратегиях: мегапаттерновая кросс-презентация, вирус-подобные наночастицы, бактериальные оболочки Лахтин В.М., Лахтин М.В., Афанасьев С.С., Афанасьев М.С., Байракова А.Л., Алешкин В.А.	50	Биологические свойства фагов бактерий рода <i>Staphylococcus</i> Пульчеровская Л.П., Сверкалова Д.Г., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.	57
Разработка схемы фагоидентификации бактерий рода <i>Klebsiella</i> Ляшенко Е.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Садртдинова Г.Р., Самойлов Д.А.	51	Фаги бактерий рода <i>Serratia</i> индикаторы бактерий Пульчеровская Л.П., Ефрейторова Е.О., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	58
Способ выделения и параметры культивирования бактериофагов <i>Bacillus coagulans</i> Мартынова К.В., Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Калдыркаев А.И., Алешкин А.В.	51	Определение количественных параметров постановки РНФ с фагами <i>K. oxytoca</i> Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	58
Фагоспецифические L,D-пептидазы семейства M15: структура, регуляция, распространение и биотехнологические перспективы Микулинская Г.В., Чернышов С.В., Зимин А.А., Прохоров Д.В., Шадрин В.С., Молочков Н.В., Кутышенко В.П.	52	Определение оптимального времени постановки РНФ с фагами <i>K. oxytoca</i> Садртдинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.	59
Бактериофаги для контроля мягкогнилостных бактериозов картофеля Мирошников К.А., Кабанова А.П., Шнейдер М.М., Баранник А.П., Васильев Д.М., Корженков А.А., Мирошников К.К., Тошчаков С.В., Игнатов А.Н.	52	Перспективы использования бактериофагов в западной медицине Саперкин Н.В., Scholten R.J.P.M., Чанышева Р.Ф.	59
Температурная устойчивость бактериофагов <i>E.coli</i> O157 Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Мерчина С.В., Кузьмина Н.С.	53	Возрастная динамика титра бактериофагов <i>E.coli</i> пищеварительного микробиоценоза цыплят первых 38 дней жизни Скобликов Н.Э., Осеппук Д.В., Москаленко Е.А., Зимин А.А.	60
Индикация <i>Escherichia coli</i> O157 в воде с использованием РНФ Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Мерчина С.В., Кузьмина Н.С., Шестаков А.Г., Маланина В.С.	53	Сравнительный анализ молекулярно-генетической структуры SEA- и ETA-конвертирующих бактериофагов <i>Staphylococcus aureus</i> Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Богун А.Г., Абаев И.В.	60
Группа новых протейных бактериофагов: выделение и характеристика Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Курильщикова А.М., Бабкин И.В., Тикунов А.Ю., Боковая О.В., Юнусова А.Ю., Тикунова Н.В.	54	Опыт совместного применения бактериофагов и пробиотиков для лечения сочетанной гинекологической и гастроэнтерологической патологии Соловьева И.В., Точилина А.Г., Белова И.В., Жирнов В.А., Иванова Т.П.	60
		Отбор производственно-перспективных изолятов энтеробактерных фагов Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Феоктистова Н.А.	61

Изучение биологических свойств ирсиниозного фага Ye3-f2 Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Масиленко А.В., Феоктистова Н.А.	61	Применение бактериофагов в акушерстве, неонатологии, гинекологии: современное состояние проблемы Чубаров В.В., Любасовская Л.А., Ачкасова Е.Н., Кондрахин А.П., Акимкин В.Г., Припутневич Т.В.	66
Разработка системы полимеразно-цепной реакции для идентификации бактериофагов <i>Proteus spp.</i>, <i>Yersinia enterocolitica</i>, <i>Enterobacter spp.</i> Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Масиленко А.В., Сульдина Е.В.	62	Проблемы использования нитчатого бактериофага M13, как платформы для создания пептидных антигенов Шаньшин Д.В., Казачинская Е.И., Бакулина А.Ю., Ильичев А.А., Шаповал А.И., Щербаков Д.Н.	66
Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага <i>Bacillus cereus</i> Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Масиленко А.В., Сульдина Е.В., Маланина В.С., Мартынова К.В., Золотухин С.Н., Калдыркаев А.И.	62	Исследование МКА 10Н10 против вируса клещевого энцефалита с помощью фаговой библиотеки пептидов Шаньшин Д.В., Шапрова О.Н., Мурашкин Д.Е., Протопопова Е.В., Локтев В.Б., Ильичев А.А., Бондарь А.А., Щербаков Д.Н.	67
Протейные бактериофаги: выделение и селекция Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Масиленко А.В., Сульдина Е.В.	63	Новый Т-четный бактериофаг AM101 инфицирующий <i>Acinetobacter baumannii</i> Шнейдер М.М., Попова А.В., Тимошина О.Ю., Шагин Д.А., Михайлова Ю.В., Янушевич Ю.Г., Образцова Е.А., Куликов Е.Е., Миросников К.А., Эдельштейн М.В., Козлов Р.С.	67
Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага <i>Proteus</i> Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Масиленко А.В., Сульдина Е.В.	63	Бактериофаги, специфичные к бактериям рода <i>Klebsiella</i> Ушакова Т.А., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Тикунов А.Ю., Юнусова А.Ю., Фофанов М.В., Боковая О.В., Тикунова Н.В.	68
Сравнительная оценка селективных свойств некоторых специфических сибиреязвенных бактериофагов на примере штамма <i>Bacillus anthracis</i> 1(CO) Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Калинин А.В.	64	Роль пробиотиков в поддержании здоровья современного человека Жиленкова О.Г.	68
Влияние культурально-морфологических свойств индикаторных штаммов <i>Bacillus anthracis</i> на показатель концентрации бактериофага гамма А-26 в экспериментальных сериях препарата Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Калинин А.В.	64	Мониторинг мяса на наличие остаточных количеств антимикробных веществ и управление рисками, возникающих при производстве и употреблении мясных продуктов Юшина Ю.К., Батаева Д.С., Зайко Е.В.	70
Эффективность применения бактериофагов в отношении вспышечной заболеваемости Чанышева Р.Ф., Ковалишена О.В., Квашнина Д.В., Саперкин Н.В.	65	Биоинформатическая характеристика грам-отрицательных фирмикут, содержащего бета-лактамазу ACI-1 Chris M. Rands, Елизавета В. Старикова, Harald Brüssow, Евгения В. Кривенцева, Вадим М. Говорун, Евгений М. Здобнов	70
Результаты определения фагочувствительности в рамках регионального мониторинга комплексной оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Чанышева Р.Ф., Ковалишена О.В.	65		

**Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения
в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности.**
Материалы Четвертой научно-практической конференции с международным участием
к 70-летию профессора В.А. Алешкина

Компьютерная верстка – Попов Е.В.

Подписано в печать 11.09.2018

Формат издания 60x90/8

Усл. печ. л. 10

Печать офсетная

Тираж 250 экз.

Отпечатано в ООО «КЛУБ ПЕЧАТИ»
127018, Москва, Марьиной Рощи 3-й проезд, д. 40, строение 1