

Современные подходы к способам создания фаговой основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*

О. А. Польша¹ (polygatschoa@yandex.ru), Н. Н. Ворошилова¹ (reza08@mail.ru),
Н. В. Тикунова² (tikunova@niboch.nsc.ru), В. В. Морозова² (morozova@niboch.nsc.ru),
А. Ю. Тикунов² (arttik1986@gmail.com), В. Н. Крылов¹ (krylov.mech.inst@mail.ru),
А. А. Юнусова² (pretty_lie@mail.ru), А. Н. Дабижева³ (al77@inbox.ru)
DOI:10.24411/2073-3046-2018-10004

¹ Филиал ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ в г. Уфа «Иммунопрепарат»,

³ ФГУП НПО «Микроген», Москва

² ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины»
Сибирского Отделения РАН, г. Новосибирск

Резюме

Лечебно-профилактические препараты бактериофагов применяются в качестве эффективного современного средства анти-микробной терапии синегнойной инфекции. Бактериофаги, входящие в состав препаратов должны быть изучены на предмет подтверждения их литических и генетических свойств, что обеспечивает безопасность и эффективность применения препаратов. В нашем исследовании для конструирования фаговой основы препарата были изучены биологические и морфологические свойства, определен спектр антибактериальной активности бактериофагов, выделенных в различных регионах России. Важнейшим этапом работы явилось проведение исследований по обеспечению генетической безопасности препаратов бактериофагов. В результате составлена композиция из 6 штаммов литических бактериофагов *P. aeruginosa* (PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7), относящихся по морфологии вирионов к семействам – Podoviridae и Myoviridae, порядка Caudovirales, к литическим генетическим группам phiKMV-likevirus, N4-likevirus, PB1-likevirus. Композиция обладает максимально широким спектром антибактериальной активности (90,7%) в отношении 818 эпидемиологически значимых госпитальных и клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa*, а также достаточно универсальна для различных удаленных территорий России и стран СНГ.

Ключевые слова: бактерии *P. aeruginosa*, бактериофаги *P. aeruginosa*, препарат бактериофагов, антибактериальная активность

Modern Approaches to the Methods of Creating of Phage Basis for Treatment-Prophylactic a Drug of Bacteriophages *Pseudomonas aeruginosa*

О. А. Polygach¹ (polygatschoa@yandex.ru), N. N. Voroshilov¹ (reza08@mail.ru), N. V. Tikunova² (tikunova@niboch.nsc.ru),
V. V. Morozova² (morozova@niboch.nsc.ru), A. Y. Tikunov² (arttik1986@gmail.com), B. N. Krylov¹ (krylov.mech.inst@mail.ru),
A. A. Yunusova² (pretty_lie@mail.ru), A. N. Dabizheva³ (al77@inbox.ru)

DOI:10.24411/2073-3046-2018-10004

^{1,3} The Federal State Unitary Enterprise «Scientific and Production Association for Immunological Preparations «Microgen» of the Ministry of Health of the Russian Federation

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Abstract

Therapeutic and prophylactic preparations of bacteriophages are considered as an effective modern means of antimicrobial therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection. Bacteriophages that are part of the drugs must be certified for confirmation of their lytic and genetic properties, which ensures the safety and effectiveness of the use of drugs. In our study, biological and morphological properties were studied for drug design, the spectrum of antibacterial activity of bacteriophages isolated in various regions of Russia was determined. The most important stage of the work was research on ensuring genetic safety of bacteriophage preparations. As a result, a composition of 6 strains of lytic bacteriophages of *P. aeruginosa* (PaUfa №№ 1, 2, 3, 4, 6, 7) composed of the morphology of the virions to the families Podoviridae and Myoviridae, the order of Caudovirales, phylogenetic genetic groups phiKMV-likevirus, N4-likevirus, PB1-likevirus. The composition has a wide spectrum of antibacterial activity (90.7%) with respect to 818 collisional, epidemiologically significant hospital and clinical strains of *P. aeruginosa* bacteria, and also quite versatile for various remote territories of Russia and CIS countries.

Key words: bacteria *P. aeruginosa*, bacteriophages *P. aeruginosa*, the bacteriophage preparation, antibacterial activity

Введение

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* обладают способностью поражать все органы и ткани макроорганизма, вызывают до 20% всех

внутрибольничных инфекций, считаются одними из основных возбудителей нозокомиальных пневмоний, приводят к тяжелейшим осложнениям при легочной форме муковисцидоза (61%)

и раневых инфекциях (10%), к нагноению ожоговых ран (10–30%) [1, 2]. Синегнойные бактерии характеризуются высокой смертностью (от 18 до 61%), поскольку бактерии *P. aeruginosa* обладают высокой резистентностью к большинству антибиотиков, в частности, пенициллинового (100%), тетрациклинового рядов, к аминогликозидам (60–85%), фторхинолам (77%), цефалоспорином (60–85%) [2, 3].

Исходя из выше приведенных данных, использование бактериофагов становится все актуальнее, а иногда единственным альтернативным способом антибактериальной терапии. В России для лечения и профилактики синегнойных инфекций производятся, широко и достаточно эффективно используются монопрепарат Бактериофаг синегнойный и поливалентные препараты бактериофагов, включающие компонент *P. aeruginosa*. Спектр антибактериальной активности существующих препаратов бактериофагов *P. aeruginosa* в отношении клинических и госпитальных штаммов бактерий гомологичного вида варьирует в значительных пределах, по данным Е. Г. Додовой – 43,0%, и Н. И. Габриелян – 61,5%, Т. А. Салминой – 90,0% [4–6].

Для расширения спектра антибактериальной активности препаратов бактериофагов по требованиям ГФ XIII ОФС «Бактериофаги» [7] в их состав должны вводиться новые литические бактериофаги, активные в отношении эпидемиологически значимых патогенных бактерий *P. aeruginosa* и имеющие генетические характеристики, свидетельствующие о литической природе бактериофагов. Кроме того, по требованиям «Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза от 06.05.17 г.» для обеспечения генетической безопасности терапевтического применения препаратов бактериофагов каждый штамм, используемый в препаратах, должен «быть изучен с помощью молекулярно-генетических методов (полногеномное секвенирование) для определения полной нуклеотидной последовательности ДНК с последующим биоинформационным анализом» [8].

Целью исследований – разработка способа конструирования фаговой основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, на основе бактериофагов, полученных из различных территориальных регионов, с изученной антибактериальной активностью, биологическими, морфологическими и генетическими свойствами.

Материалы и методы

С учетом современных знаний были изучены биологические, морфологические и генетические свойства бактериофагов для отбора и подтверждения литической природы (вирулентности) бактериофагов.

Для создания эффективной фаговой основы препарата использовалась эпидемиологически

значимая коллекция госпитальных и клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa*, в том числе и антибиотикорезистентных. Исследовались семь штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* (PaUfa №№ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7), выделенных и отобранных из различных источников внешней среды 34 городах России методом клонирования [9]. Штаммы были отобраны с учетом различия регионов, степени фаголизиса и особенностям морфологии негативных колоний.

Для выделения штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, а также сравнительного изучения спектра их антибактериальной активности использовали 818 эпидемиологически значимых госпитальных и клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa* (в том числе, 244 свежевыделенных в 2016–2017 гг.) типичных по своим культуральным, морфологическим и биохимическим свойствам, 100% резистентных к одному или нескольким антибиотикам. Госпитальные и клинические штаммы бактерий *P. aeruginosa*, выделенных от больных с различной патологией, получены от санитарно-эпидемических служб и из стационаров 30 городов различных регионов России и стран СНГ (Казахстана, Украины, Туркменистана, Узбекистана), а также из Болгарии.

Широту спектра антибактериальной активности отдельных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, их комбинаций определяли по методу Аппельмана [7] в разведении 10^{-1} на 818 выше указанных бактериальных штаммах *P. aeruginosa*.

Для культивирования бактерий и бактериофагов *P. aeruginosa* использовали мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар (с 0,4, 0,7 и 1,5% содержания агара).

Особенности фаз взаимодействия штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* с бактериальными клетками гомологичного вида бактерий определяли в одиночном цикле размножения [9, 10]. Изучены степень и скорость адсорбции штаммов бактериофагов на бактериальных клетках гомологичного вида, длительность латентного периода их внутриклеточного размножения, величина выхода фагов из одной инфицированной бактериальной клетки (урожайность).

Изучение морфологии негативных колоний штаммов бактериофагов проводили при высеве их двухслойным методом Грация в 0,7% агаровой среде [7], определение свободного литического фермента штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* проходило на 1,5% агаровой питательной среде по методу В. А. Зуева [11]. Частоту образования фагоустойчивых мутантов определяли по методу, описанному У. Хейс [12].

Изучение морфологии вирионов выделенных нами штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* проведено методом электронной микроскопии. Суспензии бактериофаговых вирионов для электронной микроскопии очищали от бактериальных примесей методом ультрацентрифугирования в градиенте

хлористого цезия [13]. Таксономическую принадлежность изучали с использованием электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония), оснащенного цифровой камерой бокового ввода Veleta (SIS, Германия).

Для проведения анализа генома штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* выделяли ДНК штаммов бактериофагов методом экстракции фенол-хлороформом с предварительной ферментативной обработкой РНКазой А, ДНКазой I и Протеиназой К (Thermo Fisher Scientific, США) [14]. Далее проводили гидролиз полученных фаговых ДНК различными эндонуклеазами рестрикции (HindIII, EcoRI, EcoRV, PciI, NcoI, HpaI, MfeI, DraI, NotI) производства НПО «СибЭнзим» с целью получения рестриционных профилей для каждого из типизируемых бактериофагов. Использовали маркер 50 kb (п.н.: 48502, 39 936, 24730, 15 206, 10 000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250) НПО «СибЭнзим». Реакцию вели при 37 °C в течение 2–3 часов. Результаты гидролиза оценивали методом гель-электрофореза в 0,8% агарозе.

Секвенирование библиотек ДНК проводили на платформе Illumina Miseq. Сборка нуклеотидных последовательностей *de novo* была выполнена с помощью пакета ABYSS. Поиск открытых рамок трансляции (OPT), таксономическая и функциональная идентификация этих OPT была проведена

с помощью программного обеспечения MG-RAST с использованием последовательностей ДНК, находящихся в базах данных GenBank и др.

Результаты и обсуждение

Из 34 проб сточной воды и почвы с использованием 818 эпидемиологически значимых госпитальных и клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa* нами выделены 107 штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, из которых для дальнейших исследований с учетом разнообразия регионов выделения и особенностей морфологии негативных колоний были отобраны семь штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*. Города и регионы, представлены районами Сибири, Дальнего востока, и Европейской территорией России: PaUfa № 1, 2 (г. Уфа), PaUfa № 3 (г. Хабаровск), PaUfa № 4 (г. Москва), PaUfa № 5 (г. Владивосток), PaUfa № 6 (г. Новосибирск), PaUfa № 7 (г. Иркутск).

Изучение биологических свойств семи отобранных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* показало, что все штаммы PaUfa № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 в одиночном цикле внутриклеточного размножения в бактериальных клетках характеризуются литическим циклом развития, завершающимся фаголизисом бактерий и параметрами фаговой инфекции, приведенными в таблице 1.

Известно, что у многих литических бактериофагов фаголизис бактериальной клетки

Таблица 1.

Характеристики биологических свойств штаммов бактериофагов *P. aeruginosa**

Штаммы бактериофагов <i>P. aeruginosa</i>	Время максимальной адсорбции бактериофагов на клетках бактерий <i>P. aeruginosa</i> продуцентов фагов (мин)	Степень максимальной адсорбции бактериофагов на клетках бактерий <i>P. aeruginosa</i> -продуцентов фагов (%)	Константа скорости адсорбции бактериофагов на клетках бактерий <i>P. aeruginosa</i> -продуцентов фагов, (мл/мин)	Длительность латентного периода внутриклеточного размножения на клетках бактерий <i>P. aeruginosa</i> -продуцентов фагов, (мин)	Величина выхода фага из одной инфицированной бактериальной клетки <i>P. aeruginosa</i> (фаг. вирион/ бакт. кл)	Морфология негативных колоний штаммов бактериофагов <i>P. aeruginosa</i>		Наличие и активность литического фермента (Δ E, мм)	Спектр антибактериальной активности штаммов бактериофагов <i>P. aeruginosa</i> , и их композиции (% фагочувствительных штаммов бактерий <i>P. aeruginosa</i> (из 818), выделенных в России и СНГ)
						Диаметр негативной колонии (мм)	Ширина зоны неполного лизиса (мм)		
PaUfa- 1	5,9 ± 0,74	95,14 ± 0,84	(2,4 ± 0,14) × 10 ⁹	20 ± 0,7	82,6 ± 2,5	5,3 ± 0,44	1,24 ± 0,25	0,84 ± 0,08	51,0
PaUfa - 2	6 ± 0,61	95,9 ± 0,76	(2,95 ± 0,11) × 10 ⁹	19,3 ± 0,83	99,8 ± 1,3	6,1 ± 0,54	0,9 ± 0,1	0,78 ± 0,04	49,0
PaUfa - 3	9,1 ± 0,74	98,4 ± 0,58	(2 ± 0,12) × 10 ⁹	26,8 ± 3,5	11,6 ± 2,1	4,5 ± 0,5	0,96 ± 0,2	3,2 ± 0,27	11,4
PaUfa - 4	11 ± 0,89	90 ± 0,74	(6,79 ± 0,09) × 10 ⁸	35 ± 2	10 ± 1,6	2,3 ± 0,45	1,23 ± 0,24	2,8 ± 0,27	24,2
PaUfa - 5	11 ± 0,74	91,6 ± 2	(5,4 ± 0,2) × 10 ⁸	32,2 ± 4,1	10,8 ± 1,9	1,24 ± 0,25	0,4 ± 0,2	3,2 ± 0,27	53,1
PaUfa - 6	10 ± 1,14	89,3 ± 1,2	(1,53 ± 0,12) × 10 ⁹	30 ± 5	12 ± 1	2,18 ± 0,21	нет	нет	30,0
PaUfa - 7	7,7 ± 0,44	92,7 ± 0,98	(1,54 ± 0,1) × 10 ⁹	28,6 ± 2,2	19,6 ± 1,14	2,8 ± 0,21	1,8 ± 0,2	1,74 ± 0,29	17,4
Композиция из штаммов бактериофагов PaUfa № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7									91,7

Примечание: *С 1 по 9 столбец статистическую обработку проводили путем определения среднего значения и стандартного отклонения.

сопровождается образованием литического фермента, который участвует в растворении клеточной стенки изнутри в завершении латентного периода внутриклеточного размножения бактериофага. Степень образования литического фермента у вновь выделенных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* различна – от 0 до $(3,2 \pm 0,27)$ мм (табл. 1).

Свидетельствующая о литической природе бактериофагов — низкая частота образования фагоустойчивых мутантов бактерий *P. aeruginosa* находилась для штаммов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7 в пределах от $0,0133 \times 10^{-8}$ до $3,1 \times 10^{-8}$, что свидетельствует о достаточно высокой степени их антибактериальной активности. Наиболее активными были штаммы PaUfa № № 2, 3, 4 (табл. 2). Штамм бактериофага PaUfa № 5 был менее активен, на что указывала высокая частота образования фагоустойчивых мутантов бактерий *P. aeruginosa* от $3,19 \times 10^{-5}$ до $5,5 \times 10^{-6}$.

При изучении частоты образования фагоустойчивых мутантов под действием различных вариантов комбинаций штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* установлено, что наиболее эффективной была комбинация, включавшая все 7 штаммов бактериофагов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, при действии которых наблюдалось снижение частоты образования фагоустойчивых мутантов на два–три порядка: до $2,13 \times 10^{-9}$ и 0 – без образования колоний вторичного роста (см. табл. 2).

Для введения в состав препаратов только строго литических бактериофагов, в геноме которых отсутствуют какие либо гены токсичности, лизогении, антибиотикоустойчивости и др. исследовались генетические свойства отобранных штаммов бактериофагов. Изучение рестрикционных профилей фрагментированных эндонуклеазами ДНК показало, что ДНК штаммов бактериофагов имеют различные сайты узнавания за исключением штаммов PaUfa № № 1, 2 (рис. 1). Полученные результаты

при сравнении сайтов узнавания в программе Vector NTI с гомологами из Genbank свидетельствуют о том, что бактериофаги PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 проявляют гомологию рестрикционных сайтов ДНК с некоторыми представителями четырех известных литических групп бактериофагов *P. aeruginosa* *phiKMV-likevirus*, *PB1-likevirus* и *N4-likevirus* и *phiKZ-likevirus*, имеющих литическую природу.

Наиболее информативная характеристика геномов бактериофагов была получена аннотацией нуклеотидных последовательностей, определенных посредством высокопродуктивного полногеномного секвенирования ДНК бактериофагов. Установлено, что шесть штаммов бактериофагов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7 принадлежат к уже известным литическим генетическим группам: *phiKMV-likevirus*, *PB1-likevirus* и *N4-likevirus* и один штамм PaUfa № 5 к группе *phiKZ-likevirus* (табл. 3). В геноме штаммов бактериофагов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7 отсутствуют гены антибиотикоустойчивости, токсичности, лизогении и рекомбиназ, что позволяет использовать их в качестве основы лечебно-профилактического препарата бактериофагов *P. aeruginosa*.

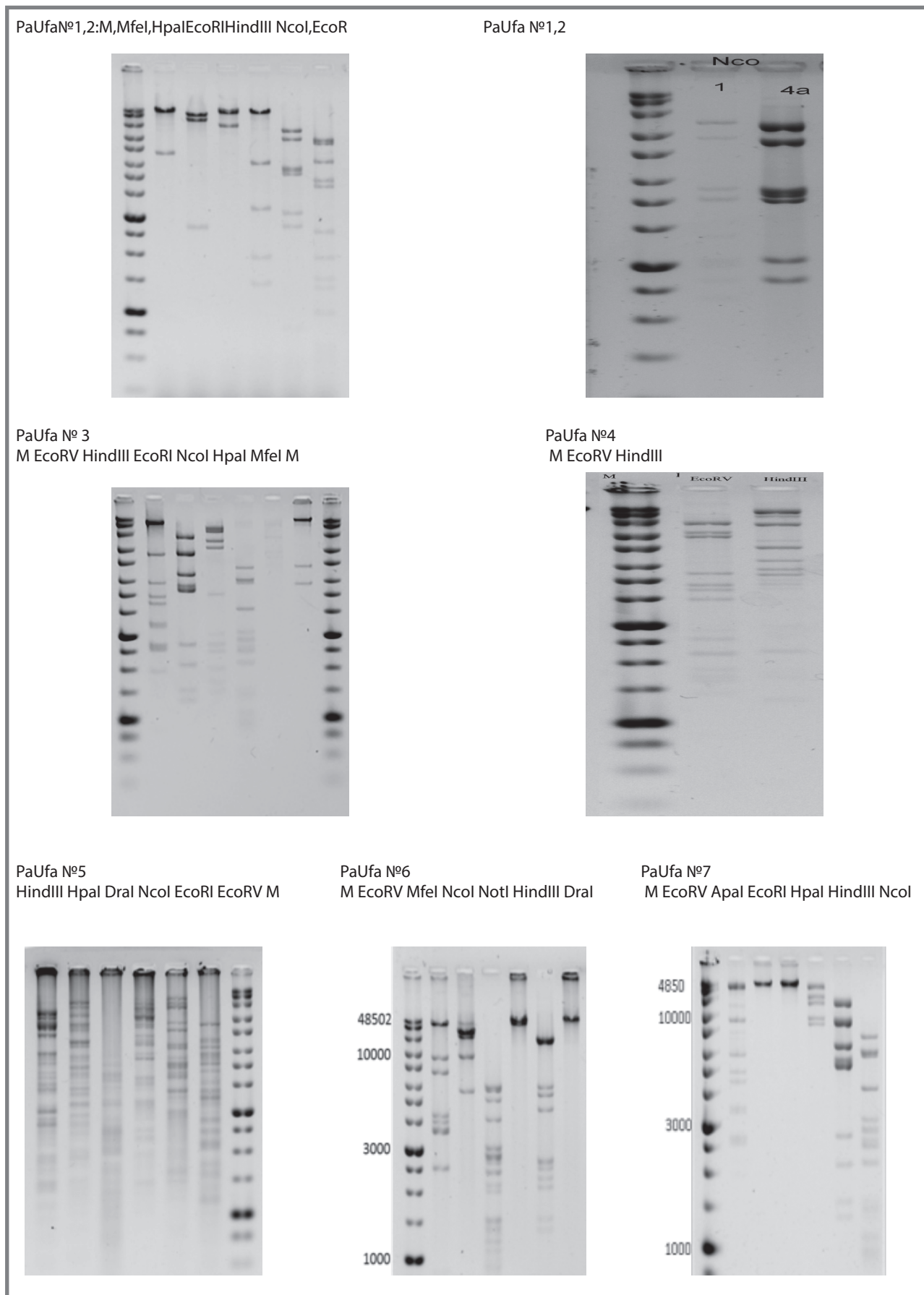
Аннотация нуклеотидной последовательности генома бактериофага PaUfa № 5 группы *phiKZ-likevirus* показала наличие в его геноме фаг-ассоциированной рекомбиназы. Проведенный с помощью сервера MG-RAST мониторинг геномов двух представителей литической группы *phiKZ* фагов депонированных в GenBank, в том числе секвенированных в начале 2000 гг., также показал наличие потенциальных фаговых рекомбиназ в депонированных геномах (табл. 4), а у штамма NC 007623 присутствие в геноме потенциального мобильного элемента белка. Присутствие в геноме потенциальных рекомбиназ предполагает, что в процессе бактериофаговой инфекции гипотетически возможен обмен нуклеотидными

Таблица 2.

Частота образования фагоустойчивых мутантов бактерий *P. aeruginosa* под действием штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7

Количество бактериальных штаммов, n=21	Исследуемые штаммы бактериофагов							Совокупность штаммов бактериофагов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7
	PaUfa-1	PaUfa-2	PaUfa-3	PaUfa-4	PaUfa-5	PaUfa-6	PaUfa-7	
Частота образования фагоустойчивых мутантов	От $0,0113 \times 10^{-8}$ до $6,93 \times 10^{-7}$	От $2,85 \times 10^{-6}$ до $6,9 \times 10^{-7}$	От $1,73 \times 10^{-6}$ до $3,1 \times 10^{-8}$	От $5,7 \times 10^{-6}$ до $2,7 \times 10^{-7}$	От $3,19 \times 10^{-5}$ до $5,5 \times 10^{-6}$	От $2,21 \times 10^{-6}$ до $3,4 \times 10^{-7}$	От $1,55 \times 10^{-6}$ до $7,1 \times 10^{-7}$	От $7,1 \times 10^{-8}$ до 0

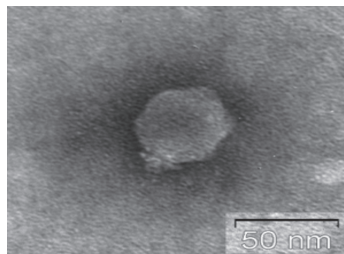
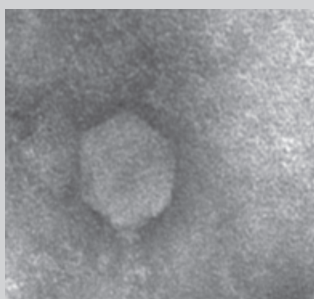
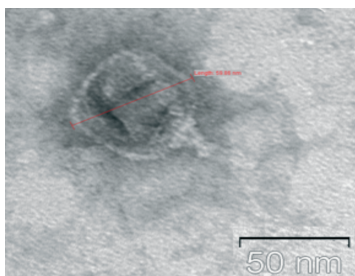
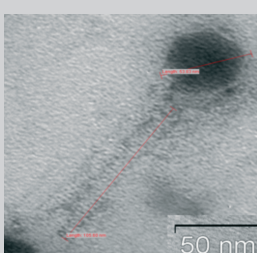
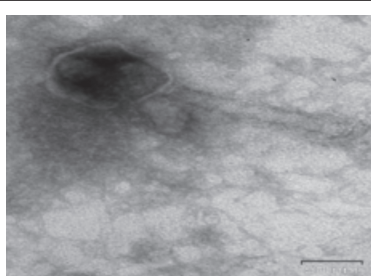
Рисунок 1.
Рестрикционные профили ДНК бактериофагов PaUfa №1,2,3,4 5,6,7.
M – ДНК маркер 50 Kb производства НПО «СибЭнзим»



Примечание: Названия использованных эндонуклеаз рестрикции указаны над соответствующими дорожками.

Таблица 3.

Морфологические и генетические характеристики штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* - таксономическая и функциональная идентификация штаммов бактериофагов по аналогии и с использованием последовательностей ДНК, находящихся в базах данных GenBank, IMG, PATRICK, SEED, SwissProt, RefSeq, TrEMBL, KEGG, KO, COG, NOG и морфология фаговых вирионов

№ штамма бактериофага <i>P. aeruginosa</i>	Количество предполагаемых открытых рамок трансляции	Таксономическая принадлежность бактериофагов по результатам анализа генома	Наличие генов рекомбинации генов кодирующих токсины	Таксономия и морфология фаговых вирионов (по данным электронной микроскопии)	
PaUfa -1	48	Семейство <i>Podoviridae</i> , phiKMV-like-virus, наиболее близкий геном фага PT5 (EU056923)	Отсутствуют	Семейство <i>Podoviridae</i> , капсид 48–55 нм, хвост 12–14 нм.	
PaUfa -2	48	Семейство <i>Podoviridae</i> , phiKMV-like-virus, наиболее близкий геном фага vB_Pae-TbilisiM32 (JQ307386)	Отсутствуют	Семейство <i>Podoviridae</i> , капсид 48–55 нм, хвост 12–14 нм.	
PaUfa -3	89	Семейство <i>Podoviridae</i> , N4-likevirus, наиболее близкий геном фага RWG (KM411958)	Отсутствует	Семейство <i>Podoviridae</i> , капсид 60–65 нм, хвост 12.5 нм	
PaUfa -4	67	Семейство <i>Myoviridae</i> , PB1-like, наиболее близкий геном фага vB_PaeM_C1-14_Ab28 (LN610589)	Отсутствует	Семейство <i>Myoviridae</i> , капсид 50–55 нм, хвост 100–105 нм	
PaUfa -5	306	Семейство <i>Myoviridae</i> , phiKZ-likevirus, наиболее близкий геном фага phiKZ (AF399011)	Присутствует ген фаговой рекомбиназы	Семейство <i>Myoviridae</i> , капсид 115 нм, хвост 153 нм, размер воротничка 37 нм	

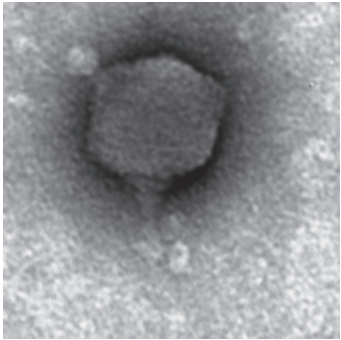
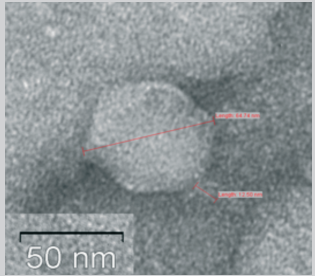
№ штамма бактериофага <i>P. aeruginosa</i>	Количество предполагаемых открытых рамок трансляции	Таксономическая принадлежность бактериофагов по результатам анализа генома	Наличие генов рекомбинации генов кодирующих токсины	Таксономия и морфология фаговых вирионов (по данным электронной микроскопии)	
PaUfa -6	89	Семейство <i>Podoviridae</i> , N4-likevirus, наиболее близкий геном фага PA26 (JX194238)	Отсутствует	Семейство <i>Podoviridae</i> , капсид 60–65 нм, хвост 12.5 нм	
PaUfa -7	61	Семейство <i>Podoviridae</i> , N4-likevirus, наиболее близкий геном фага vB_PaeP_C2-10_Ab09 (HG962375)	Отсутствует	Семейство <i>Podoviridae</i> , капсид 50–60 нм, хвост 12,5 нм	

Таблица 4.
Гены рекомбиназ у различных бактериофагов - представителей группы *phiKZ-likevirus*

Бактериофаги группы <i>phiKZ</i>	Присутствие phage-associated recombinase у представителей группы <i>phiKZ-likevirus</i>
PaUfa -5	atgaataaaccagaattactttaccatggttctctttataaacaagatgaattaatgccaggatttaaagatctggtgaactgttatgtgggatgg tattgagtctaaccaatacctatatgcaacgctcatctgaaaaagatgcattctatttaggtattggtagcgctatcgaaaagttattgatagtgatag atatgctactgttgataggatattacaatctattgtcaaaaataatcgataaaaagtgatattttaaaaatggttggtgatgtttataccattccattta gggactctgacaaatggattaagaataataatcctcacatagcattgatactgagtgattacgaaaaacactatccatgatgttactgtaaggaa attagatattggtgaatttttaaagggtgctcgcttaactgtcactaaagcaccagtggtgatccattaacatcatgtcacatattcggttcagta acagagcggttatctgttttaa
NC_004629	atgaataaaccagaattactttaccatggttctctttataaacaagatgaattaatgccaggatttaaagatctggtgaactgttatgtgggatgg tattgagtctaaccaatacctatatgcaacgctcatctgaaaaagatgcattctatttaggtattggtagcgctatcgaaaagttattgatagtgatag atatgctactgttgataggatattacaatctattgtcaaaaataatcgataaaaagtgatattttaaaaatggttggtgatgtttataccattccattta gggactctgacaaatggattaagaataataatcctcacatagcattgatactgagtgattacgaaaaacactatccatgatgttactgtaaggaa attagatattggtgaatttttaaagggtgctcgcttaactgtcactaaagcaccagtggtgatccattaacatcatgtcacatattcggttcagta acagagcggttatctgttttaa
NC_028999	atgccagggtttaaacgctctggtcaactatcggttggtggtggtgagtctaacttaactctacgcaaccaccagtaaggaggaagcggtac gacctagggtcggttcagctactgagaagaactatgactcggttcaccacgatcgatgggaatatctgggtttctgccagaagccgatt gatatacgcgaatggttacagatggagcttactgctacactattcatttcgtgaaacggatggttggttaagaacaagaacccgtacaacaaca ttgatactgagtgactactcgtgaagactgttcacaatgtcagtggtgagcaagtagacatgcgtaccgtgctcaaagggtcgttcgtaacgatcac acaagcgctatggacgtcgtatgtctcaactactcgtgaagtaccgggacgttacgaaagttaccatattctaa

комбинациями с гомологичным бактериофагом и/или бактерией хозяином, что может предшествовать возникновению приобретения новых свойств, в том числе лекарственной устойчивости и др. [15]. Поэтому на данный момент включение в состав препарата бактериофагов группы *phiKZ-likevirus* не представляется целесообразным, а требует дальнейшего изучения.

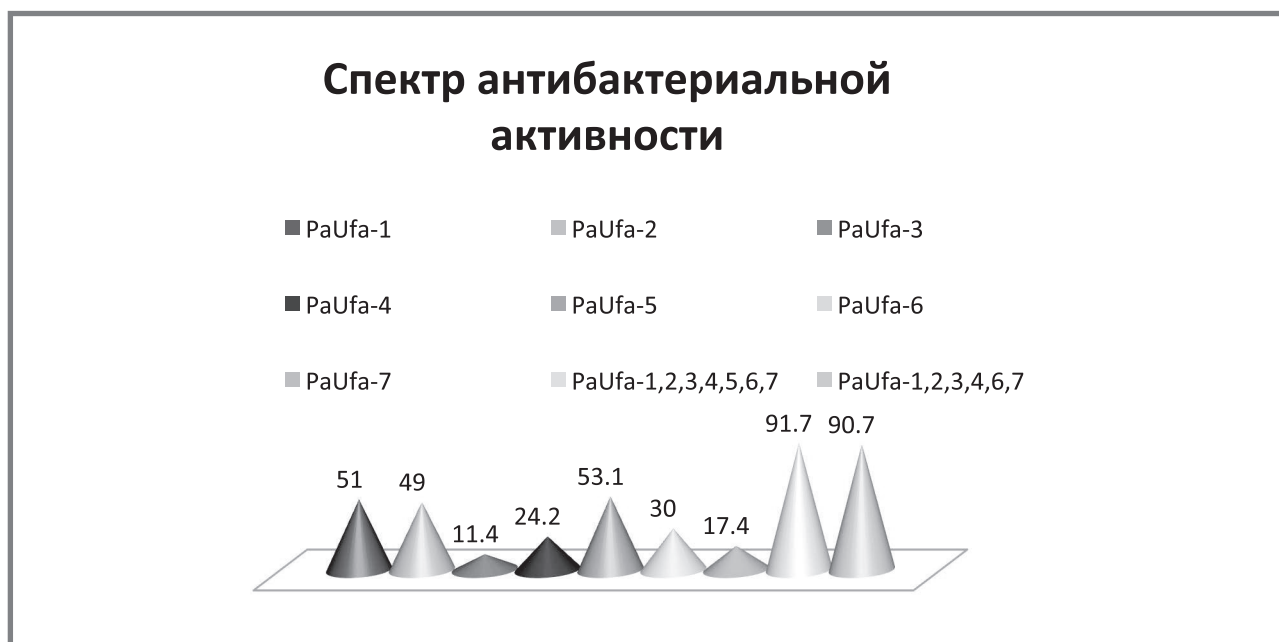
По данным электронно-микроскопическо- го исследования, описана морфология вирионов

бактериофагов *P. aeruginosa* PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7 (см. табл. 3) и показана их принадлежность к двум семействам – *Podoviridae* и *Myoviridae*, порядка *Caudovirales*.

Изучение в тесте Аппельмана в разведении 10⁻¹ (рис. 2) спектра антибактериальной активности отобранных и изученных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* на 818 госпитальных и клинических штаммах бактерий показало, что штаммы группы *phiKMV-likevirus* имели наиболее широкий спектр

Рисунок 2.

Сравнительные данные изучения спектра антибактериальной активности штаммов бактериофагов *P. aeruginosa*, их композиций и официального препарата Бактериофага *Pseudomonas aeruginosa* (% фагочувствительных штаммов из 818 госпитальных и клинических бактериальных штаммов бактерий *P. aeruginosa*, выделенных в России, странах СНГ, Болгарии и Грузии, в том числе:



Примечание: № 1–7 отдельные вновь выделенные штаммы бактериофагов *P. aeruginosa* - PaUfa 1,2,3,4,5,6,7; № 8 – композиция штаммов бактериофагов PaUfa 1,2,3,4,5,6,7; № 9 – композиция штаммов бактериофагов PaUfa 1,2,3,4,6,7.

антибактериальной активности: штамм PaUfa № 1 активен в отношении 51%, штамм PaUfa № 2 – 49,0%. Несмотря на то, что штаммы бактериофагов *P. aeruginosa* PaUfa № № 6, 7, 3 (группа N4-likevirus) характеризовались менее широким спектром антибактериальной активности соответственно 30,0, 17,4 и 11,4% и штамм бактериофага PaUfa № 4 (PB1-like группа) – 24,2% штаммов, они реципрокно дополняли друг друга и со штаммами группы phiKMV-likevirus суммарно обеспечивали антибактериальную активность в отношении 90,7% из 818 клинических и госпитальных штаммов бактерий *P. aeruginosa* (см. рис. 2, см. табл. 3).

В результате проведенного отбора получена высокоэффективная композиция – фаговая основа препарата, содержащего компонент *P. aeruginosa*. Добавление штамма PaUfa № 5 (phiKZ-likevirus) в композицию из 6 штаммов бактериофагов незначительно, всего на 1% – до 91,7%, расширило спектр антибактериальной активности композиции штаммов бактериофагов PaUfa № № 1, 2, 3, 4, 6, 7 (см. рис. 2).

Установлено отсутствие региональной специфичности широты спектра антибактериальной активности 7 отобранных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* и их комбинаций. Так, штаммы бактериофагов *P. aeruginosa*, выделенные в различных регионах РФ, обладали антибактериальной активностью в отношении штаммов бактерий *P. aeruginosa* из других достаточно удаленных регионов РФ и СНГ. Штаммы PaUfa № № 3, 5,

выделенные из образцов, полученных из городов Дальнего Востока (г. Хабаровск, г. Владивосток), были активны в отношении бактерий *P. aeruginosa*, выделенных в регионах Дальнего Востока, Сибири, на европейской территории России, в Болгарии, Украине и Грузии. Штаммы бактериофагов PaUfa № № 6, 7, выделенные из образцов, полученных из г.Новосибирск и г. Иркутск были активны в отношении бактерий *P. aeruginosa*, выделенных в регионах Сибири, Дальнего Востока, на европейской территории России, в Туркменистане, Узбекистане, Казахстане. Штаммы PaUfa № № 1, 2, 4, выделенные в г. Уфа и Москва, были активны в отношении бактерий *P. aeruginosa*, выделенных в регионах Сибири, Дальнего Востока, на европейской территории России, в Казахстане, Болгарии, Украине, Грузии.

Приведенные данные свидетельствуют, что использование разработанного нами способа создания фаговой основы препарата бактериофага *P. aeruginosa* и максимальное расширение географии регионов поиска и выделения высокоактивных литических бактериофагов *P. aeruginosa* (34 региона) и патогенных бактерий *P. aeruginosa* (30 регионов) позволяет избежать территориальной привязки антибактериального спектра действия препарата бактериофагов *P. aeruginosa* и позволяет создать фаговую основу препарата бактериофагов *P. aeruginosa* высоко эффективную по спектру антибактериальной активности в отношении эпидемиологически значимых госпитальных

и клинических штаммов бактерий *P.aeruginosa* и достаточно универсальную для различных удаленных территорий России и СНГ.

Закключение

В результате проведенных исследований разработаны новые способы создания фаговой основы препарата бактериофагов *P.aeruginosa*, обеспечивающие широкий спектр его антибактериальной активности, высокую эффективность и генетическую безопасность терапевтического использования – создана высокоэффективная бактериофаговая композиция из 6 штаммов литических бактериофагов *P. aeruginosa* – PaUfa №№ 1, 2, 3, 4, 6, 7, вновь выделенных нами в различных регионах России, относящихся по морфологии вирионов к семействам – *Podoviridae* и *Myoviridae*, порядка *Caudovirales*, к литическим генетическим группам *phiKMV-likevirus*, *N4-likevirus*, *PB1-likevirus*, обладающая максимально широким

спектром антибактериальной активности (90,7%) в отношении 818 эпидемиологически значимых госпитальных и клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa*.

Установлено отсутствие региональной территориальной зависимости спектра антибактериальной активности вновь выделенных, изученных штаммов бактериофагов *P. aeruginosa* и региона выделения клинических и госпитальных штаммов патогенных бактерий *P. aeruginosa*, что позволило максимально расширив географию регионов поиска для выделения высокоактивных литических бактериофагов *P. aeruginosa* и патогенных бактерий *P. aeruginosa* создать фаговую основу препарата высокоэффективную по спектру антибактериальной активности в отношении эпидемиологически значимых госпитальных и клинических штаммов патогенных бактерий *P. aeruginosa* и достаточно универсальную для различных удаленных территорий России и стран СНГ.

Литература

1. Кузнецова М. В. Распространенность возбудителя и разнообразие нозологических форм синегнойной инфекции. Здоровье семьи – 21 век. 2014; 2: 84–112.
2. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2015; том 17 (3): с:170–187.
3. Тикунова Н. В., Ворошилова Н. Н. Н. В. Тикунова, В. В. Морозова, А. Ю. Тикунов, А. М. Курильщикова. Генетическая характеристика и спектр антибактериальной активности бактериофагов, входящих в состав промышленно серий лекарственного препарата Пиобактериофаг поливалентный очищенный. Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. 2016; 2 (87): 93–100.
4. Додова Е. Г., Горбунова Е. А., Аполихина И. А. Постантибиотиковая эра: бактериофаги как лечебная стратегия. Медицинский совет. 2015; 11:49–53.
5. Габриэлян Н. И., Горская Е. М., Спирина Т. С., Прудникова С. А., Ромашкина Л. Ю. Исследование антибиотико- и фагочувствительности нозокомиальных штаммов микробов, выделенных от пациентов трансплантологической клиники. Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2011; 3: 26–32.
6. Салмина Т. А., Цыгипало А. И., Шкода А. С. Опыт применения пиобактериофага поливалентного очищенного для лечения гнойных ран при длительном и неэффективном лечении антибактериальными препаратами. Трудный пациент. 2016; 10 – 11: 5–11.
7. Общая фармакопейная статья Бактериофаги. ОФС.1.7.1.0002.15. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том II.
8. Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза от 06.05.17г, решение №89 от 03.11.2016 г. Доступно на: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89.
9. Адамс М. Н. Бактериофаги. Москва: Издательство иностранной литературы; 1961: 527.
10. Zhenhui Cao, Jiancheng Zhang, Yan D. Niu, Isolation and Characterization of a «phiKMV-Like» Bacteriophage and Its Therapeutic Effect on Mink Hemorrhagic pneumonia. PLoS One. Jan 23 2015; 10 (1): e0116571.
11. Зуев А. В. Литическая активность бактериальных вирусов. Москва: Медицина; 1969: 177.
12. Сборник методик по генетике микроорганизмов. Москва: Медицина; 1970.
13. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение. Пер. с англ. Москва: Научный мир; 2012: 640.
14. Bacteriophage and its vectors. Ed.: Sambrook J., Russell D. Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2001.
15. Zelin Cui, Xiaokui Guo, Ke Dong, Safety assessment of Staphylococcus phages of the family Myoviridae based on complete genome sequences. PMC Journals. Jan 24. 2017; 7: 41259.

References

1. Kuznetsova M. V. The prevalence of the pathogen and the variety of nosological forms of *Pseudomonas aeruginosa* infection. Zdorov'ye Sem'i – 21 vek. [Family Health – the 21 Century]. 2014; 2: 84–112 (in Russian).
2. Lazareva A. V., Chebotar I. V., Kryzhanovskaya O. A., Chebotar V. I., Mayanskiy N. A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and pathology. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya. [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy]. 2015;tom 17 (3): 170–187 (in Russian).
3. Tikunova N. V., Voroshilova N. N., Genetic Characteristics and Range of Antibacterial Activity of the Bacteriophages, which are a part of manufactured serie of drugs – Pyobacteriophage Polyvalent Purified. Epidemiologia i Vaccinoprofilactica. [Epidemiology and Vaccinal Prevention]. 2016; 2 (87): 93 –100 (in Russian).
4. Dodova E. G., Gorbunova E. A., Apolikhina I. A. Post-antibiotic era: bacteriophages as a curative strategy. Meditsinskiy sovet. 2015; 11: 49–53.
5. Gabrielyan N. I., Gorskaya E. M., Spirina T. S., Prudnikova S. A., Romashkina L. Yu. Investigation of sensitivity of nosocomial microbial strains isolated from clinical transplant patients to antibiotics and phages. Vestnik Transplantologii i Iskusstvennykh Organov. [Russian Journal of Transplantology and Artificial Organs]. 2011; XIII (3): 26–32 (in Russian).
6. Salmina T.A., Tsygipalo A.I., Shkoda A.S. Experience in the use of a polyobenthic pyobacteriophage for treatment of purulent wounds with long-term and ineffective treatment with antibacterial drugs. Trudny patsiyent. [Difficult Patient]. 2016; 10–11: 5–11 (in Russian).
7. General pharmacopoeial article «Bacteriophages, OFS.1.7.1.0002.15» State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. Volume II (in Russian).
8. Rules for conducting studies of biological medicinal products of the Eurasian Economic Union of 06.05.17g, decision No. 89 of 03.11.2016g. Available at: https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89 (www.eaeunion.org)
9. Bacteriophages. Mark H. Adams. Moskva: Izdatelstvo inostrannoy literatury; 1961.
10. Zhenhui Cao, Jiancheng Zhang, Yan D. Niu, Isolation and Characterization of a «phiKMV-Like» Bacteriophage and Its Therapeutic Effect on Mink Hemorrhagic pneumonia. PLoS One. Jan 23 2015; 10(1): e0116571.
11. Zuyev A. V. Letic activity of bacterial viruses. Moscow: Meditsina; 1969: 177 (in Russian).
12. Collection of techniques for the genetics of microorganisms. Moscow: Meditsina; 1970.
13. Katter E., Sulakvelidze A. Bacteriophages: Biology and Practical Applications. Moscow: Nauchnyy mir; 2012: 640.
14. Bacteriophage and its vectors. Ed.: Sambrook J., Russell D. Molecular Cloning. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2001.
15. Zelin Cui, Xiaokui Guo, Ke Dong, Safety assessment of Staphylococcus phages of the family Myoviridae based on complete genome sequences. PMC Journals. Jan 24. 2017; 7: 41259.