

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Зурабов Федор Михайлович

**Исследование и оценка терапевтического потенциала комбинации
бактериофагов *Klebsiella pneumoniae***

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук,
Попова Валентина Михайловна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Общая информация о бактериофагах	15
1.1.1 Таксономия.....	15
1.1.2 Жизненные циклы.....	16
1.1.3 Спектр хозяев бактериофагов.....	17
1.1.4 Ферменты и механизмы для преодоления клеточных барьеров.....	17
1.1.4.1 Общая информация	17
1.1.4.2 Барьеры клеточной стенки	18
1.1.4.3 Прохождение клеточного барьера	19
1.1.4.4 Фаговые деполимеразы.....	20
1.2. Экология бактериофагов	22
1.2.1 Общие положения.....	22
1.2.2 Распространенность и роль фагов в различных природных средах	22
1.2.3 Выделение бактериофагов из окружающей среды.....	25
1.2.4 Бактериофаги и микробиом человека	26
1.3 Методы изучения основных свойств фагов	30
1.3.1 Техники детекции	30
1.3.2 Электронная микроскопия для быстрой диагностики	31
1.3.2.1 Очистка и окрашивание	32
1.3.2.2 Измерения	32
1.4 Фаготерапия	33
1.4.1 Актуальность фаготерапии	33
1.4.2 Правила отбора терапевтических фагов.....	35
1.4.3 Лицензирование фаговых препаратов	37

1.4.4	Терапевтическое применение бактериофагов.....	40
1.4.5	Характеристика <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
1.4.6	Изученные бактериофаги против <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
1.4.7	Терапевтическое применение фагов <i>Klebsiella pneumoniae</i>	51
2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	55
3.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	76
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
	ВЫВОДЫ	125
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	126
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	159
	Приложение 1	159
	Приложение 2	160
	Приложение 3	161
	Приложение 4	165
	Приложение 5	169

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВАП – вентилятор-ассоциированная пневмония
- ИВЛ – искусственная вентиляция легких
- ИМП – инфекция мочевыводящих путей
- КПС – капсульные полисахариды
- ЛПС – липополисахариды
- НП – нозокомиальная пневмония
- ОИТ – отделения интенсивной терапии
- ОРИТ – отделения реанимации и интенсивной терапии
- ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- РСТ – прокальцитонин
- СОЭ – скорость оседания эритроцитов
- СРБ – С-реактивный белок
- ТЭМ – трансмиссионный электронный микроскоп
- ФВК – фосфорно-вольфрамовая кислота
- ЦМ – цитоплазматическая мембрана
- ЧМК – черепно-мозговая травма
- ЭПС – экзополисахариды
- ВНИ – brain heart infusion (сердечно-мозговая вытяжка)
- COVID-19 - Coronavirus disease 2019 (коронавирусная инфекция 2019 года)
- ESBL – extended spectrum beta-lactamase (бета-лактамазы расширенного спектра действия)
- ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*.
- GMP – good manufacturing practice (надлежащая производственная практика)

SAPS II – simplified acute physiology score (упрощенная шкала оценки физиологических расстройств II)

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (коронавирус 2 ассоциированный с тяжёлым острым респираторным синдромом)

SOFA – sequential organ failure assessment (шкала последовательной оценки органной недостаточности)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В настоящее время одной из важных медицинских и социальных угроз является растущий уровень резистентности к антибиотикам среди бактерий-патогенов человека и животных, особенно это касается грамотрицательных бактерий. Бесконтрольное использование антибактериальных химиотерапевтических препаратов по всему миру привело к появлению резистентных к антибиотикам штаммов микроорганизмов, некоторые из которых обладают полирезистентностью, что ограничивает успешность лечения вызванных ими инфекций. В 2009 году в мире от бактериальных инфекций в отсутствие эффективных лекарств умерло более 100 тысяч человек (Rohde *et al.*, 2018). Ситуация ухудшается, и в 2019 году число ежегодных смертей в мире, связанных с резистентными к антибиотикам бактериями, достигло 4,95 миллионов (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Антибиотики не только становятся все менее эффективными, но их применение также может вызвать дисбиоз: было показано, что чрезмерное повторное использование антибиотиков уничтожает большую часть естественной кишечной флоры (Langdon *et al.*, 2016). Поэтому в настоящее время требуется разработка альтернативных методов контроля бактериальных популяций.

Среди множества противомикробных средств, предлагаемых для замены или дополнения традиционных антибиотиков, бактериофаги являются перспективными кандидатами. В Российской Федерации разработка и внедрение препаратов на основе бактериофагов, а также регламентов их применения, входят в Стратегию предупреждения распространения антимикробной резистентности до 2030 года (Правительство РФ, 2017). Национальный институт здравоохранения (НИН, США) также отметил потенциал этих биологических агентов в борьбе с бактериями, устойчивыми к антибиотикам (НИН, 2014). Использование этих агентов в антимикробной терапии основано на их способности адсорбироваться и размножаться только на специфических

бактериальных штаммах, вызывая их лизис (Loc-Carrillo and Abedon, 2011). Было показано, что фаготерапия безопасна и практически не имеет побочных эффектов (Miedzybrodzki *et al.*, 2012). В России бактериофаги успешно применяются на протяжении уже восьми десятилетий (Алешкин, 2015).

Впервые бактериофаги были упомянуты в 1915 году Фредериком Туортом (Twort, 1915), а терапевтическое применение было предложено Феликсом Д'Эреллем, который выделил их в 1917 году из фекалий больных дизентерией, работая в Институте Пастера в Париже (D'Herelle, 2007). Д'Эрелль сразу же использовал свое открытие для лечения пациентов, страдающих бактериальными инфекциями, и сообщил о больших успехах (Summers, 2011). После этого фаготерапия получила быстрое развитие в Европе и США, где фаги производились несколькими американскими фармацевтическими компаниями, однако с 1940-х годов началось массовое производство антибиотиков, которые в тот момент обладали более понятным и универсальным действием, и интерес к терапии фагами постепенно угас (Summers, 2012). Практика использования бактериофагов сохранилась и получила развитие в странах СССР, а также в Польше, в том числе по причине ограниченности доступа к антибиотикам в то время (Summers, 2012; Myelnikov, 2018). В настоящее время интерес к фаготерапии вновь начал возрастать из-за проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Фаги все чаще используются учеными и клиницистами для борьбы с антибиотикорезистентными штаммами бактерий, существует множество случаев успешного применения фагов для лечения различных бактериальных инфекций (Brives and Pourraz, 2020). Однако за последние 20 лет так и не появилось ни одного нового коммерческого лечебного фагового препарата, так как их невозможно зарегистрировать в соответствии с актуальными правовыми нормами, что связано с особенностями самих бактериальных вирусов (Fernández *et al.*, 2018). Из-за сложностей с регистрацией готовых лекарственных форм с бактериофагами фаготерапия в мире стала развиваться по пути изготовления персонализированных препаратов. В Бельгии

существует практика изготовления магистральных фаговых препаратов в соответствии с назначением врача для отдельного пациента (Pirnay *et al.*, 2018). Процесс изготовления включает производство отдельной субстанции с использованием банка бактериофагов и изготовление конечной смеси фагов в госпитале на основании проведенной фагограммы. В Российской Федерации развивается концепция адаптивной фаготерапии, отличающаяся тем, что «коктейль» бактериофагов изготавливают не для отдельного пациента, а для конкретного лечебного учреждения или отделения (Белобородова *и др.*, 2021). Бактерии *Klebsiella pneumoniae* ассоциируются с такими заболеваниями человека, как пневмония, урогенитальная инфекция, абсцесс печени, инфекция кровотока и др. Это одна из наиболее часто выявляемых бактерий при инфекциях дыхательных путей человека, особенно у госпитализированных пациентов с пневмонией, связанной с лечением в отделениях интенсивной терапии (ОИТ), включая вентилятор-ассоциированную пневмонию (ВАП) (Zhang *et al.*, 2014). Несмотря на актуальность проблемы, полноценных клинических испытаний фаговых препаратов, направленных на *K. pneumoniae*, не было проведено. Однако отдельные клинические случаи и исследования (Kuipers *et al.*, 2019; Corbellino *et al.*, 2020; Patel *et al.*, 2019; Rubalskii *et al.*, 2020; Rostkowska *et al.*, 2020; Cano *et al.*, 2020) свидетельствуют о безопасности и эффективности применения бактериофагов в борьбе с инфекциями, ассоциированными с *K. pneumoniae*. Таким образом, поиск и подробная характеристика бактериофагов, а также разработка регламентов их применения в различных областях здравоохранения является актуальной задачей настоящего времени.

Цель и задачи исследования

Цель исследования заключалась в выделении и характеристике новых вирулентных бактериофагов *Klebsiella pneumoniae*, изучении их терапевтического потенциала и оценке возможности использования комбинации бактериофагов в клинической практике.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Выделить ряд бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* из природных источников.
- 2) Изучить биологические характеристики выделенных бактериофагов.
- 3) Изучить эффективность комбинации выделенных бактериофагов против клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.
- 4) Охарактеризовать выделенные фаги с помощью полногеномного секвенирования.
- 5) Оценить безопасность и перспективность комбинации бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* на основе полученных данных.
- 6) Изучить влияние выбранной комбинации бактериофагов на биопленки, образованные антибиотикорезистентными клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*.
- 7) Исследовать возможность внедрения выбранной комбинации бактериофагов в клиническую практику.

Объект исследования

Бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, активные в отношении бактерий вида *Klebsiella pneumoniae*.

Научная новизна исследования

В работе впервые выделено 4 ранее не изученных бактериофага *Klebsiella pneumoniae*, исследованы их морфологические характеристики, температурная стабильность, устойчивость к различным значениям pH среды и литические свойства на клинических изолятах *K. pneumoniae*, в том числе на штаммах, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. Проведено полногеномное секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей ДНК выделенных бактериофагов, установлено отсутствие генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности. Изучен синергизм в составе комплексного фагового препарата и показано, что комплексный препарат более эффективен, чем отдельные выделенные бактериофаги. Установлено, что использование комплексного фагового коктейля позволяет расширить

литический спектр и значительно снизить вероятность возникновения фагорезистентных форм бактерий. Показана способность комбинации бактериофагов, кодирующих полисахарид-деполимеразы, эффективно разрушать биопленки клинических штаммов *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью. Впервые разработан новый метод визуализации лизиса бактериальной культуры бактериофагами в режиме реального времени. Исследованные бактериофаги vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 были включены в фаговый препарат широкого спектра действия и впервые была произведена оценка безопасности применения у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии, а также впервые изучена безопасность и эффективность применения ингаляционных и пероральных форм комплексных фаговых препаратов, включавших выделенные бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19. Продемонстрированы безопасность, отсутствие побочных эффектов и нежелательных явлений при ингаляционном введении комплексного препарата бактериофагов в лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями. Эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией. Результаты применения ингаляционных и пероральных форм фаговых препаратов широкого спектра действия, включавших выделенные бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показали безопасность такого применения и отсутствие побочных эффектов. В группе пациентов, получавших фаговую терапию, наблюдалось статистически значимое улучшение показателей сатурации и частоты дыхания, а также снижение маркеров воспаления, таких как скорость оседания эритроцитов (СОЭ) и соотношение *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* по данным ПЦР-анализа микробиоты кишечника.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты указывают на необходимость поиска и выделения новых бактериофагов *K. pneumoniae*, а также на целесообразность и перспективность дальнейшего применения исследованных бактериофагов в медицинской практике и изучения эффектов фаготерапии как перспективной альтернативы антибиотикам у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии. Результаты работы свидетельствуют о значимости бактериофагов в восстановлении микробиоты пациентов, перенесших COVID-19 и получавших антибиотикотерапию. Один из исследованных бактериофагов был зарегистрирован в составе первой в Российской Федерации фаговой фармацевтической субстанции и будет использован для изготовления персонализированных препаратов бактериофагов в производственных аптеках Российской Федерации.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в работе с литературными источниками, планировании и проведении экспериментов, анализе полученных результатов, подготовке к печати публикаций и написании диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором или при его непосредственном участии.

Методы и методология научного исследования

Исследования выполнены с использованием современных методов молекулярной биологии, вирусологии и микробиологии. Анализ морфологических характеристик проводился методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). Биофизическая стабильность и литические свойства были исследованы с применением общепринятых культуральных методов. Для выделения и рестрикционного анализа ДНК бактериофагов были использованы спектрофотометрический и электрофоретический методы. Проведено полногеномное секвенирование, сборка, аннотация и депонирование в GenBank геномов всех исследуемых бактериофагов. Для анализа воздействия

комбинации бактериофагов на культуру клеток *K. pneumoniae* в реальном времени впервые был использован голографический микроскоп. Анализ воздействия комбинации бактериофагов на биопленки *K. pneumoniae* проводился методом световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Оценка таксономического состава бронхоальвеолярного лаважа и состава микробиоты кишечника проводилась с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для анализа результатов компьютерной томографии органов грудной клетки была использована методика автоматического расчета объема поврежденной легочной ткани по типу матового стекла. Измерение содержания биомаркеров сыворотки крови проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе с применением оригинальных реагентов.

Положения, выносимые на защиту

1) Впервые выделены и охарактеризованы бактериофаги *Klebsiella pneumoniae*, названные vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, устойчивые в широких диапазонах температур и pH, а также обладающие высокой продуктивностью.

2) Проведено полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, в результате анализа нуклеотидных последовательностей установлено, что все исследованные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности, а бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы.

3) Комбинация исследуемых бактериофагов способна эффективно ингибировать рост клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

4) Применение комбинации исследуемых бактериофагов повышает литическую активность и снижает частоту генерации фагоустойчивых форм бактерий, по сравнению с их отдельным применением.

5) Комбинация бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 с полисахарид-деполимеразной активностью способна эффективно предотвращать рост биопленок *Klebsiella pneumoniae in vitro*, а также разрушать зрелые биопленки.

6) Ингаляционное применение бактериофагов vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 в составе фагового препарата широко спектра действия при лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями демонстрирует безопасность, а эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией.

7) Пероральное и ингаляционное применение комплексных фаговых препаратов, включающих фаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, при реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показало отсутствие побочных эффектов, привело к улучшению клинико-лабораторных показателей и к снижению коэффициента анаэробного дисбаланса.

Степень достоверности и результаты апробации

Результаты были получены с использованием современных методик и качественных расходных материалов на исправно работающем оборудовании. По теме диссертационной работы опубликовано 8 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – вирусология, и 1 патент РФ.

Результаты диссертационной работы были представлены на XXIV-ой Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 10-14 апреля 2017); XXIV Всероссийской конференции с международным участием "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 11-12 ноября 2022); 6-ом Международном конгрессе «Targeting Phage Therapy 2023» (Париж, 1-2 июня 2023); 11-ом Международном конгрессе «Weimar Sepsis Update» (Веймар, 6-8 сентября 2023); XXV Всероссийской конференции с международным участием "Жизнеобеспечение при критических состояниях" (Москва, 10-11 ноября 2023).

Бактериофаг vB_KpnM_FZ14, исследованный в настоящей диссертационной работе, был зарегистрирован в составе первой в Российской Федерации фаговой фармацевтической субстанции «Бактериофаги специфичные к *Klebsiella pneumoniae*».

Структура и содержание работы

Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 169 страницах. Содержит 18 таблиц и 19 рисунков. Список цитируемой литературы включает 265 источников.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общая информация о бактериофагах

1.1.1 Таксономия

Ранее все хвостатые бактериофаги, представляющие наиболее распространенную морфологическую группу вирусов бактерий, относились к порядку *Caudovirales*. Их основные свойства могут быть найдены в статьях (Ackermann, 2005, 2006; Ackermann and DuBow, 1987; Fauquet *et al.*, 2005).

В настоящее время классификация бактериофагов подвергается радикальным изменениям. В 2022 году международный комитет по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) упразднил морфологические семейства *Myoviridae* (длинный сокращающийся хвостовой отросток), *Podoviridae* (короткий несокращающийся хвостовой отросток) и *Siphoviridae* (длинный несокращающийся хвостовой отросток) и удалил порядок *Caudovirales*, который был заменен классом *Caudoviricetes* для группировки всех хвостатых вирусов бактерий и архей с икосаэдрическими капсидами и двухцепочечной геномной ДНК. Согласно заявлению комитета, это изменение было необходимо, учитывая многочисленные независимые оценки того, что упраздненные семейства, основанные на морфологии вирусных частиц, являются полифилетическими и неточно отражают общую эволюционную историю. Начался процесс объединения всех членов трех морфологических семейств в новые, генетически связанные семейства. В то же время комитет признает важность морфологических (нетаксономических) идентификаторов, таких как "подовирус" (podovirus), "миовирус" (myovirus) или "сифовирус" (siphovirus). Эти термины могут использоваться свободно с целью отражения отличительных особенностей и сохранения исторической привязки, однако после ратификационного голосования в 2022 году они не имеют никакого формального таксономического значения (Turner *et al.*, 2023).

1.1.2 Жизненные циклы

В продуктивном жизненном цикле вирусов прокариот может быть выделено несколько этапов, которые являются общими для всех: адсорбция, проникновение генома фага в клетку, экспрессия и репликация нуклеиновых кислот, сборка вирионов, выход и распространение фаговых частиц (Duckworth, 1987). Адсорбция фага происходит в два этапа: первый этап адсорбции к определенной поверхностной структуре бактерии является обратимым. Во время второго этапа происходит необратимое связывание вирусной частицы и бактериального рецептора (например, за счет связывания хвостовых фибрилл). После адсорбции происходит проникновение генома внутрь клетки. После попадания в клетку генетический материал либо встраивается в геном бактериальной клетки, либо остается в цитоплазме, после чего осуществляются процессы транскрипции и трансляции. Выходу вируса из клетки предшествует экспрессия генов, репликация генома и морфогенез. У наиболее представленной группы этих вирусов, называемой «хвостатыми фагами», пути морфогенеза обладают большой степенью сходства (Ackermann, 1999).

Период от адсорбции бактериофага до клеточного лизиса и выхода фагового потомства из клетки называется латентным периодом. Фаза латентного периода до того, как в инфицированной клетке будут собраны первые жизнеспособные фаговые частицы, называется эклипс-периодом. Период выхода характеризуется высвобождением зрелых вирусных частиц в окружающую среду в результате клеточного лизиса и появлением свободных вирусов в среде. Количество частиц, высвобождаемых при лизисе одной клетки, называется «выход фага» (Ackermann, 1999). У некоторых других групп фагов вирусные частицы могут высвобождаться с помощью отпочковывания или экстррузии без лизиса клетки (сем. *Plasmaviridae*, *Inoviridae*). Внеклеточный этап существования фаговой частицы заканчивается новой инфекцией, либо инактивацией фага.

Бактериофаги могут иметь разные типы жизненных циклов: литический, лизогенный, псевдолизогенный, либо формировать хроническую инфекцию. Литический цикл всегда заканчивается лизисом бактериальной клетки (Ackermann and DuBow, 1987). Однако некоторые пути инфекции остаются плохо изученными, и исследователи призывают крайне осторожно использовать терминологию, связанную с альтернативными жизненными циклами (псевдолизогенный, состояние носительства и хроническая инфекция) (Mäntynen *et al.*, 2021).

1.1.3 Спектр хозяев бактериофагов

Фаги могут инфицировать совершенно разные бактерии: аэробов и анаэробов, грамположительные и грамотрицательные, спорообразующие и неспорообразующие, спирохеты и цианобактерии. В настоящее время все бактерии относят к 42 филумам, и ко всем существующим бактериям предположительно есть фаги, однако не для всех они выделены.

Спектр хозяев отдельного фага зависит от биологических свойств и защитных механизмов бактерии-хозяина. Первой линией защиты является доступность для фага рецепторов на поверхности бактерий. Они включают специфические компоненты клеточных стенок, пили или жгутики. Другие факторы также могут влиять на спектр хозяев фага, например, ингибирование инъекции ДНК, иммунитет к суперинфекции за счет наличия в геноме бактерии профагов, эндонуклеазы рестрикции или CRISPR (Barrangou *et al.*, 2007).

Многие бактериофаги являются поливалентными и способны заражать представителей нескольких родов с филогенетическими взаимосвязями, что важно для фаготерапии (Ackermann and Węgrzyn, 2014).

1.1.4 Ферменты и механизмы для преодоления клеточных барьеров

1.1.4.1 Общая информация

Во время литического цикла вирусу необходимо преодолеть оболочку клетки-хозяина по крайней мере дважды, сначала чтобы попасть внутрь клетки, а затем выйти после размножения вируса. Клеточные барьеры в значительной

степени влияют на свойства вириона, необходимые для доставки вирусного генома в клетку. А также на ферментативные механизмы, необходимые для эффективного высвобождения вирусного потомства из инфицированных клеток (Poranen *et al.*, 2002; São-José *et al.*, 2007).

1.1.4.2 Барьеры клеточной стенки

Клеточная оболочка бактерий представляет собой сложную многослойную структуру, которая необходима для выживания клеток. Она обеспечивает клеточный гомеостаз, защищая от воздействий окружающей среды, обеспечивая в то же время приток питательных веществ и отток продуктов жизнедеятельности для обеспечения роста. Простейшая клеточная оболочка состоит из цитоплазматической мембраны и довольно толстой клеточной стенки. Этот тип характерен для грамположительных бактерий, которые считаются однослойными из-за наличия только одной мембраны. Грамотрицательные бактерии и микобактерии имеют дополнительную наружную мембрану, окружающую клеточную стенку. Также бактерии могут продуцировать белковые S-слои и полисахаридные капсулы, которые образуют дополнительные наружные оболочки, окружающие клетку (Silhavy *et al.*, 2010; Dufresne and Paradis-Bleau, 2015).

Наружная мембрана выполняет функцию дополнительного липидного барьера, окружающего клеточную стенку. У грамотрицательных бактерий наружная мембрана образована ассиметричным липидным бислоем, где внутренний слой состоит из фосфолипидов, а внешний из гликолипидов, в частности, из липополисахаридов (ЛПС). Молекула ЛПС состоит из трех частей: липидного фрагмента (липид А), основного неповторяющегося олигосахариды и сильно вариабельного полисахарида (О-антигена) (Ruiz *et al.*, 2006). О-антиген является одним из основных поверхностных антигенов, определяющих дифференциацию по серотипам у грамотрицательных бактерий. Он часто служит рецептором для фагов, инфицирующих этот тип клеток-хозяев (Bertozzi

Silva *et al.*, 2016). Существует два основных типа белков наружной мембраны: интегральные белки и липопротеины (Ruiz *et al.*, 2006).

1.1.4.3 Прохождение клеточного барьера

Хвост фага играет основную роль в процессе проникновения генетического материала в клетку. Он выполняет функции поиска бактериальных рецепторов и связывания с ними, а также отвечает за перфорацию бактериальной клеточной оболочки и проникновение вирусной ДНК внутрь клетки (Vinga *et al.*, 2006; Fokine and Rossmann, 2014). Адсорбция заключается в специфическом взаимодействии рецептор-связывающих хвостовых белков с одним или несколькими рецепторами на поверхности клетки-хозяина. Рецептор-связывающие белки фага могут быть локализованы на фибриллах, шипах или на базальной пластине и определяют его круг хозяев (Dowah and Clokie, 2018). Поверхностные рецепторы клетки-хозяина обычно представлены компонентами самых внешних слоев клеточной оболочки, такими как белки, сахара и другие молекулы (липополисахариды, протеогликаны, тейхоевые и липотейхоевые кислоты), а также внеклеточными полимерами (капсулы, S-слои), но также могут быть белками жгутиков и пилей (Bertozzi Silva *et al.*, 2016; Letarov and Kulikov, 2017). Интересно отметить, что после связывания некоторые рецептор-связывающие белки ферментативно расщепляют или модифицируют полимерные фрагменты соответствующих рецепторов, например, липополисахариды и капсулы грамотрицательных бактерий, а также тейхоевые кислоты грамположительных (Xiang *et al.*, 2009; Myers *et al.*, 2015; Cornelissen *et al.*, 2016).

Важнейшей особенностью начальных стадий фаговой инфекции является то, что при соответствующих взаимодействиях хвост/рецептор вирион претерпевает крупные структурные перестройки. Это происходит потому, что свободные вирионы хранят энергию в метастабильном состоянии, и взаимодействие с бактериальными рецепторами вызывает переход к структурной конфигурации с более низкой энергией (Raspaud *et al.*, 2007). Этот

переход необходим для открытия коннектора и последующего выхода ДНК, а также позволяет хвосту образовать канал через клеточную оболочку (Fokine and Rossmann, 2014). Образование канала часто включает проникновение и вставку в клеточную оболочку хвостовых субструктур, некоторые из которых наделены протеогликан-деградирующей активностью для облегчения пересечения клеточной стенки. Кончик проникающей хвостовой трубки может непосредственно сливаться с клеточной стенкой или взаимодействовать с каналами мембран хозяина (Xu and Xiang, 2017). Финальным этапом является транслокация ДНК (Molineux and Panja, 2013).

1.1.4.4 Фаговые деполимеразы

Как упоминалось ранее, некоторые бактерии могут образовывать капсулу, которая полностью покрывает клетку. Большинство капсул состоят из полисахаридов и могут служить основными факторами вирулентности патогенных бактерий, которые мешают распознаванию их иммунной системой (Merino and Tomás, 2015).

Хотя капсулы могут защищать бактерии от фаговой инфекции, маскируя рецепторы клеток-хозяев (Scholl *et al.*, 2005), некоторые фаги, напротив, могут использовать эти полисахаридные оболочки в качестве рецепторов для инициирования инфекции. Такие бактериофаги обычно имеют несколько копий хвостовых фибрилл или шипов различных типов, каждый из которых может специфично разрушать определенный тип капсульного полисахарида (Leiman *et al.*, 2007; Hsieh *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017). Последовательное расщепление полимерных связей без диссоциации вируса (Leiman *et al.*, 2007) позволяет вирионам прокладывать путь через слой капсулы до тех пор, пока они не достигнут вторичных рецепторов в клеточной оболочке, связывание с которыми иницирует последующие этапы инфекции. Кроме того, фаги могут кодировать деполимеразы экзополисахаридов для облегчения проникновения в биопленки и инфицирования резидентных бактерий (Yan *et al.*, 2014; Cornelissen *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2012).

На мягком агаре фаги с деполимеразной активностью часто продуцируют ореолы (гало), окружающие фаговые бляшки. Они являются результатом диффузии деполимераз (в составе вирионов или в качестве свободных ферментов) (Cornelissen *et al.*, 2011).

O-полисахаридная цепь ЛПС является другим типом рецептора, который часто гидролизуется вирионными деполимеразми миовирусов, сифовирусов и подовирусов, инфицирующих грамотрицательные бактерии (Broeker and Barbirz, 2017). Изначально предполагалось, что хвостовые шипы с ЛПС-гидролизующей активностью позволяют фагам перемещаться сквозь слой ЛПС до достижения вторичного рецептора на внешней мембране клетки (Letarov and Kulikov, 2017). Однако в нескольких исследованиях было показано, что различные O-антиген специфичные фаги неспособны инфицировать варианты клеток-хозяев, лишенные O-антигенной части ЛПС. На самом деле, связывание хвостовых шипов с рецепторами и деполимеразная активность, по-видимому, необходимы не только для позиционирования вирусной частицы на мембране клетки, но также для структурных перестроек вириона и последующей транслокации ДНК (Broeker and Barbirz, 2017). В подтверждение этой гипотезы было показано, что высокоочищенный препарат ЛПС может индуцировать выход фаговой ДНК *in vitro* при инкубации с вирионами, имеющими данный тип хвостовых шипов (Broeker *et al.*, 2018).

Существует огромное количество различных фаговых деполимераз. Проведенное исследование (Pires *et al.*, 2016) обнаружило 160 генов деполимераз в геномах 143 полностью секвенированных фагов, заражающих 24 рода бактерий. Согласно механизму расщепления полисахаридов, все ферменты можно классифицировать на гидролазы и лиазы. Некоторые вирион-ассоциированные деполимеразы расщепляют полипептиды или липиды вместо полисахаридов, что, вероятно, является приспособлением к специфике некоторых бактериальных внеклеточных структур.

1.2. Экология бактериофагов

1.2.1 Общие положения

Фаги присутствуют практически везде, где есть бактерии, причем в огромных количествах (Weinbauer, 2014). Считается, что их общее количество в биосфере составляет от 10^{31} до 10^{32} БОЕ (Parikka *et al.*, 2016). Согласно данным Национального центра биотехнологической информации (NCBI), по состоянию на сентябрь 2019 года известно 8437 полных геномов бактериофагов (Dion *et al.*, 2020), к июню 2023 года количество проанализированных полных геномов увеличилось до 11000. Фаги присутствуют в таких местах, как:

- вода (морская, пресная, канализационные стоки, вулканические горячие источники, соленые пруды, сверхсоленые водоемы);
- почва (больше всего в ризосфере);
- воздух (на пылинках или каплях);
- растения (как на поверхности, так и в других частях);
- животные (внутренние жидкости и секреты, полости тела, включая кишечник и зоб у птиц);
- пищевые продукты (молочные продукты, мясо, рыба, ферментированная еда) (Ackermann and Dubow, 1987).

1.2.2 Распространенность и роль фагов в различных природных средах

Вирусы играют важную роль в морских экосистемах и пищевых сетях. В частности, гибель от вирусов приводит к лизису примерно 20-40% от общего числа бактерий ежедневно, высвобождая углерод и другие питательные вещества, которые влияют на пищевую сеть (Suttle, 2007). Помимо этого, фаги влияют на эволюционные процессы микробных сообществ, глобально перенося $\sim 10^{29}$ генов в день (Paul, 1999), а также на биогеохимические циклы, метаболически перепрограммируя фотосинтез бактерий-хозяев, центральный метаболизм углерода, циклы азота и серы (Hurwitz and U'Ren, 2016). Сообщества

бактериофагов в океане не только обладают разнообразным морфологическим составом, но и имеют различные стратегии репликации в зависимости от сезона: весной доминируют профаги, а летом преобладают литические инфекции. Эти колебания, вероятно, объясняются гипотезой «kill the winner», которая гласит, что высокая численность бактерий (вызванная благоприятными условиями роста в летний период) сочетается с высокой частотой литических инфекций (Thingstad and Lignell, 1997). Эта модель была расширена с помощью гипотезы «piggyback-the-winner», которая описывает преобладание лизогенного жизненного цикла при высокой плотности бактерий (Silveira and Rohwer, 2016). Впервые это наблюдалось в коралловых рифах, где соотношение вирусов и хозяев низкое, несмотря на значительную плотность микроорганизмов (Knowles *et al.*, 2016). Многочисленные бактерии-хозяева либо погибали от фагов, либо становились устойчивыми лизогенами, что в свою очередь снижало титры фагов.

Распространенность фагов в морских и пресноводных отложениях довольно хорошо описана. В пресноводных отложениях концентрация варьировалась от $0,65 \cdot 10^9$ до $2,90 \cdot 10^9$ БОЕ/г по сравнению с $3 \cdot 10^7$ – $11,71 \cdot 10^9$ БОЕ/г в морских экосистемах (Danovaro *et al.*, 2002). Содержание вирусов обычно снижается с увеличением глубины отложений, а их содержание в донных отложениях в 10–1000 раз больше, чем таковое в воде, что объясняется как общей продуктивностью систем, так и тем, что бактериофаги способны адсорбироваться на оседающих частицах и таким образом транспортироваться на дно. (Steward *et al.*, 1996; Maranger and Bird, 1996; Danovaro and Serresi, 2000; Hewson *et al.*, 2001).

По сравнению с морскими средами, почвы по своей природе обладают более широким композиционным разнообразием. Мета-анализ 24 почв показал, что численность вирусов сильно варьирует и коррелирует с типом почвы, колеблясь от приблизительно 10^3 ВПЧ на грамм в пустынных почвах до 10^9 ВПЧ на грамм в лесных почвах (Williamson *et al.*, 2017). Это согласуется с более ранними исследованиями, которые показали, что концентрация в почве и

ризосфере варьировалась между 0,7 и $2,7 \cdot 10^7$ БОЕ/г (Ashelford *et al.*, 2003). Однако после повторных исследований было установлено, что концентрация составляет $1,5 \cdot 10^8$ БОЕ/г (Ashelford *et al.*, 2003). Трансмиссионная электронная микроскопия различных типов почв показала преобладание бесхвостых фагов над хвостатыми (Williamson *et al.*, 2005). Было выдвинуто предположение, что вирусы бактерий являются самыми многочисленными биологическими объектами в почвах (Williams, 1994). Однако существует и противоположная точка зрения, согласно которой почвенные частицы могут затруднять распространение и инфекцию почвенных бактерий бактериофагами (Marsh and Wellington, 1994; Williams, 1994; Williams *et al.*, 1987). Это подтверждает относительно низкая концентрация выделяемых фагов в почвах (Ashelford *et al.*, 2003).

Также имеются данные, что различные частицы, такие как неорганические коллоиды (глинистые минералы), могут быть заселены фагами (Chattopadhyay and Puls, 2000). Обычно в природных средах вирусные оболочки заряжены отрицательно, как и коллоиды (например, глина). Однако в данном случае силы отталкивания слабее, чем Ван-дер-Ваальсовы силы, что приводит к адсорбции бактериофага на коллоидных частицах (Chattopadhyay and Puls, 2000).

В общем, концентрация вирусов обычно возрастает с увеличением продуктивности системы. Например, в морских экосистемах она наиболее низкая в глубоких водах (10^4 – 10^5 БОЕ/мл), средняя – в поверхностных водах (10^5 – 10^6 БОЕ/мл) и самая высокая – в прибрежных водах (10^6 – 10^7 БОЕ/мл). Установлено, что она уменьшается с удалением от берега (Cochlan *et al.*, 1993; Boehme *et al.*, 1993). Как правило, концентрация вирусов выше в пресных водах, по сравнению с морскими (Maranger and Bird, 1995). В некоторых озерах количество бактериофагов может достигать 10^8 БОЕ/мл. Также высокие значения фаговых титров наблюдаются в цианобактериальных матах (Hennes and Suttle, 1995).

1.2.3 Выделение бактериофагов из окружающей среды

Окружающая среда является универсальным источником всех видов бактериофагов, делая возможным их выделение для терапевтических целей. Главным источником служат места с повышенным содержанием бактерий. Так, бактериофаги часто обнаруживаются в сточных водах. Выделение вирусных частиц из природных сред становится более эффективным, если среда содержит высокие концентрации бактерий, против которых выделяется фаг (Gill and Young, 2011). Оптимальным источником бактериофагов являются воды канализационных стоков, но выделение возможно и из других водных сред (Tanji *et al.*, 2002). Вода из станций очистки сточных вод проходит несколько стадий деконтаминации и фильтрации. Эти физико-химические методы успешно удаляют бактериальные клетки, но не фаги, что дает возможность выделять их из сточных вод (Lood *et al.*, 2017). Однако возможна инактивация вирусных частиц в ходе очистки сточных вод (Tanji *et al.*, 2002).

Распространенность фагов против бактерий снижается с концентрацией бактериальных частиц в природных образцах, что делает простые и прямые методы выделения некоторых вирусов недоступными. В этой связи рекомендуется использовать образцы большого объема для последующего концентрирования и очистки (Gill and Young, 2011). В таких образцах шансы выделения фагов повышаются (Gill and Nyman, 2010).

Протокол для изолирования фагов широкого спектра действия из сточных вод и прудов был описан Jensen *et al.* (1998). Показано, что спектр действия фагов, изолированных из водной среды шире, чем у выделенных из других сред – это связано с повышенной концентрацией бактерий в воде (Wommack and Colwell, 2000). Так, Parra and Robeson (2016) нашли три поливалентных бактериофага, заражающих *S. enterica serovar Chlerasuis* и *Echerichia coli*, в сточных водах Чили.

Mattila *et al.* (2015) изолировали вирусы из сточных вод. Они подчеркнули легкость выделения фагов против патогенных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella, *Escherichia coli* и *K. pneumoniae*, но более высокую сложность их выделения против штаммов *Enterococcus* и *Acinetobacter baumannii*. Однако исследователи связывают это с недостатком хозяйских штаммов для выделения и небольшим числом попыток. Это может быть также связано с тем, что грамположительные бактерии (*Enterococcus*) более чувствительны к антимикробным препаратам, что снижает их присутствие в местах взятия проб (сточные воды), соответственно, снижается и число специфических фагов.

O'Flynn *et al.* (2004) изолировали вирусные частицы, активные против штамма *E. coli* O157:H7, из фекалий пациентов с расстройствами желудочно-кишечного тракта и из бычьих экскрементов. Стоки больниц были источником бактериофагов против *Achromobacter xylosoxidans* A22732 (Ma *et al.*, 2016). Выделенный фаг был активен против 4 разных штаммов. Богатым источником терапевтических фагов является материал, взятый у выздоравливающих больных.

Обычно лизаты высокого титра (10^{10} – 10^{12} БОЕ/мл), способные эффективно заражать определенные штаммы патогенных бактерий, получают после размножения фагов на этих штаммах. Во избежание риска инфекции и для упрощения культурального процесса, для размножения и распространения может быть использован непатогенный штамм (Gill and Nyman, 2010). Например, David *et al.* (1980) выбрали для своего исследования *Mycobacterium smegmatis* – вид менее опасный, чем близкородственный ему *M. tuberculosis*. Он быстро размножался и также был восприимчив к исследуемому фагу. Таким образом, исходя из практичности и требований биобезопасности, был выбран именно он.

1.2.4 Бактериофаги и микробиом человека

Кишечник человека является самой богатой микробной средой обитания в организме и содержит около 10^{14} клеток бактерий и архей (Shkorporov *et al.*, 2019). Здоровый микробиом человека включает в себя виром, который в значительной степени состоит из фагов, среди которых подавляющее большинство составляют

хвостатые бактериофаги (класс *Caudoviricetes* в царстве *Duplodnaviria*) (Manrique *et al.*, 2016), также значительный вклад вносят оцДНК-фаги семейств *Microviridae* (Wang *et al.*, 2019) и *Inoviridae* (Roux *et al.*, 2019). Один из самых подробных метагеномных анализов выявил только 23 фага, которые были общими для >50% исследованных людей (Manrique *et al.*, 2016). Самый распространенный бактериофаг, ассоциированный с человеком (и вообще самый заметный компонент вирома здорового человека), crAssphage, был обнаружен только с помощью метагеномики (Dutilh *et al.*, 2014). За этой находкой последовала характеристика обширной группы crAss-подобных фагов, также с помощью метагеномного анализа (Yutin *et al.*, 2021). Некоторые crAss-подобные фаги впоследствии были выращены в культурах соответствующих бактерий-хозяев, представителей филума *Bacteroidetes* (Guerin *et al.*, 2018). Учитывая сложность выращивания в лаборатории фагов, ассоциированных с кишечником человека, реальный размер и разнообразие сообщества вирусов прокариот здорового человека еще предстоит выяснить. Было показано, что 63% бактериальных и только 15% вирусных сообществ в кишечнике младенца наследуются от матери (Maqsood *et al.*, 2019). В первые месяцы жизни младенца композиция кишечных фагов состоит из большого количества и разнообразия в основном хвостатых двухцепочечных ДНК-вирусов. Разнообразие фагов уменьшается в течение первых двух лет жизни, и доминирующими становятся одноцепочечные ДНК-вирусы, принадлежащие к семейству *Microviridae*. На состав бактериофагов в кишечнике могут влиять различные факторы, такие как географическое распространение и рацион питания. Кишечная микробиота играет важную роль в развитии здоровых младенцев и влияет на состояние здоровья и развитие заболеваний (Lim *et al.*, 2016). Отмечалось, что существенные изменения в композиции фагов человека были связаны с воспалительными заболеваниями кишечника (Norman *et al.*, 2015).

Большинство бактериальных клеток содержат умеренные фаги, интегрированные в их хромосомы в качестве профагов. Они играют очень

важную регуляторную и эволюционную роль для нашей микробиоты (Wahida *et al.*, 2016; Manrique *et al.*, 2017). Литические и умеренные фаги совместно участвуют в регуляции бактериальных популяций во всех средах обитания, в том числе и в здоровом микробиоме человека. Можно предположить, что наше регулярное потребление фагов из натуральных продуктов питания и водных ресурсов крайне важно для поддержания здорового состояния микробиома. Это объясняет то, почему аллергии на чистые препараты фага не развиваются у людей, и почему врожденная иммунная система существенно не реагирует на бактериофаги – это бы нарушило баланс микробиома (Lloyd-Price *et al.*, 2016; Bakhshinejad and Ghiasvand, 2017). В организме человека фаги частично или по большей части разрушаются ретикулярной эндотелиальной системой. Но они могут сохраняться достаточно продолжительное время, размножаясь в местах обитания бактерий-хозяев, при этом поддерживая их баланс (Kurzepa *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2012).

Сообщалось, что фаги *Bacillus*, относящиеся к группе SPbeta, кодируют собственную пептидную систему, которая служит для регуляции между литическим и умеренным жизненным циклом. Эта система обеспечивает необходимый баланс для профагов, оставляя часть бактериальных хозяев в живых (Erez *et al.*, 2017). Безусловно, такая регуляция играет важную роль в нашем микробиоме. Однако многие профаги кодируют и могут переносить факторы вирулентности и, таким образом, быть связанными с патогенностью (Asadulghani *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2017; Fortier and Sekulovic, 2013).

Исследования с животными, людьми и культурами тканей показали, что фаги также ассоциированы с поверхностью слизистых оболочек. Это помогает им повысить свою эффективность и в то же время вызвать благоприятный иммунный ответ: слизистые оболочки являются основными местами проникновения бактериальных инфекций, и было показано, что фаги присутствуют в больших количествах в слизи за счет взаимодействия муцин-гликанов и Ig-подобных белковых доменов некоторых фаговых капсидов (Barr *et*

al., 2013). С помощью метагеномного анализа было показано, что эти Ig-подобные фаговые белки очень распространены вблизи слизистых оболочек. Это привело к созданию модели, которая поддерживает идею коэволюции бактериофагов и бактерий-хозяев (Nguyen *et al.*, 2017).

Из-за связи с микробиомом человека большинство клинически значимых бактериальных штаммов, особенно среди ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*) микроорганизмов, содержат в своих геномах как целые, так и частичные последовательности профагов, которые иногда включают в себя островки патогенности. Плотная среда обитания микробиома кишки неизбежно обеспечивает постоянный генетический обмен и коэволюцию бактерий и фагов. Там умеренные фаги превосходят литические по численности, в отличие от остальных сред обитания, где вирулентные фаги обычно превосходят количество бактерий на порядок (Clokic *et al.*, 2011). Наличие профагов, по-видимому, дает бактериям селективное преимущество в микробиоме кишечника (Colavecchio *et al.*, 2017; Feiner *et al.*, 2015).

Примером бактерии с крайне большим количеством профагов является штамм Sakai пищевого патогена *E. coli* EHEC O157:H7, который содержит 18 профагов, составляющих 16% от его генома. А также штамм бактерии *S. ruogenes*, который содержит до 6 профагов, занимающих 12% бактериального генома. Они неразрывно связаны со своими хозяевами, и такой симбиоз выгоден для обоих. Эксперты сходятся во мнении, что было бы чрезвычайно трудно удалить последовательности профагов из таких бактериальных геномов (Sanchaya *et al.*, 2003; Touchon *et al.*, 2016).

Человеческий микробиом представлен не только микрофлорой кишечника, он состоит из множества компартментов. Бактериофаги были обнаружены практически во всех частях организма человека: на коже, в ротовой полости, легких, желудочно-кишечном тракте, мочеполовой системе, крови и даже в нервной системе (Liang and Bushman, 2021). Предполагается, что фаги могут

переноситься через слои клеток путем трансцитоза, достигая системного кровотока и различных частей организма (Nguyen *et al.*, 2017).

Наиболее значимым с точки зрения хирургического лечения является микробиом кожи, где стафилококки играют важную роль и представляют один из наиболее часто встречающихся родов бактерий (Chen *et al.*, 2018). При повреждении кожных покровов бактерии, составляющие микрофлору кожи, могут стать причиной инфекций. Она может быть чрезвычайно опасной и привести к развитию системной инфекции, особенно если бактерии будут обладать антибиотикорезистентностью. В случае хирургических вмешательств метициллинрезистентный *S. aureus* представляет особую опасность, так как стафилококки часто колонизируют поверхности имплантационных материалов (Reizner *et al.*, 2014).

Стоит также учитывать, что микроорганизмы нашего микробиома живут в сложных сообществах, что неизбежно связано с формированием биопленок. На различных поверхностях нашего организма растут слои бактериальных сообществ, и часто они приобретают особое медицинское значение, например, в полости рта – при имплантации и хронических ранах, а также в легких пациентов с кистозным фиброзом. Бактериофаги могут помочь в борьбе с биопленками в случае необходимости за счет наличия полисахарид деполимераз. (Harper *et al.*, 2014; Rossmann *et al.*, 2015).

1.3 Методы изучения основных свойств фагов

1.3.1 Техники детекции

Просвечивающий (трансмиссионный) электронный микроскоп (ТЭМ) используется для визуализации фагов и характеристики их морфологии с 1940 года (Pfannkuch, 1940). Метод негативного контрастирования, который активно используется для визуализации бактериофагов в наше время, был представлен в 1959 году (Field, 1982). Первое свидетельство высокой распространенности вирусов было также получено с помощью ТЭМ (Torrella and Morita, 1979). Однако этот метод очень сильно зависит от опыта исследователя. Технология

визуализации фагов из водных образцов была разработана для ТЭМ и является основной для подсчета фагов в океанах (Bratbak and Haldal, 1993; Ackermann and Haldal, 2009).

Эпифлуоресцентная микроскопия и проточная цитометрия основываются на флуоресцентном окрашивании бактериофагов. Обе методики являются быстрыми и производительными (Brussaard, 2009; Ortmann and Suttle, 2009). Однако здесь существует вероятность получения ошибочных результатов. Так, иногда наблюдались хорошо флуоресцирующие препараты, которые не содержали фагов, но были загрязнены клеточными остатками. Предполагается, что бактериальная ДНК может адсорбироваться на них и детектироваться, как фаговая. В качестве альтернативы методу эпифлуоресцентной микроскопии был предложен метод конфокального лазерного сканирования (Peduzzi *et al.*, 2013).

Метагеномный анализ позволяет изучить весь образец, взятый из определенной среды обитания. Путем амплификации, а затем секвенирования, этот метод позволяет идентифицировать геном и гены, не прибегая к дополнительной наработке образца (Fancello *et al.*, 2012; Reyes *et al.*, 2012). Учитывая то, что 95% бактерий являются некультивируемыми, их фаги невозможно наработать. Этот метод был применен к образцам из морей и морских отложений (Angly *et al.*, 2006), но также применим и к другим образцам. Более того, метагеномный анализ был использован для исследования популяций фагов в кишечнике человека (Reyes *et al.*, 2012). Однако у этого метода есть недостаток, так как он основывается только на существующих описаниях вирусов и базе данных секвенирования их геномов (Clokic *et al.*, 2011).

1.3.2 Электронная микроскопия для быстрой диагностики

Для визуализации фагов чаще всего используют трансмиссионный электронный микроскоп (ТЭМ). Криоэлектронная микроскопия применяется только специализированными лабораториями для исследования ультраструктуры фаговых частиц. Оттенение металлами используется крайне редко, так как требует времени и подбора условий напыления. ТЭМ, возможно,

является наиболее быстрым способом идентификации вирусов. В общем случае она позволяет очень быстро идентифицировать бактериофаг до семейства. Для идентификации вирусов необходимо делать фотографии, а затем проводить измерения. ТЭМ крайне важна и в контексте фаговой терапии, так как позволяет проверять препараты на чистоту, а также на наличие бактериофагов (Askermann and Haldal, 2009).

1.3.2.1 Очистка и окрашивание

Чтобы упростить процесс визуализации, бактериофаги должны быть сконцентрированы и очищены перед тем, как просматривать их на ТЭМ. Очистка также подразумевает промывку в буферном растворе. Затем фаг окрашивают с помощью уранилацетата (1–4%) или ФВК (фосфорно-вольфрамовая кислота) (0,5–2%). Оба варианта окраски применяются уже более 50 лет. Другие соли уранила либо молибдат аммония также могут быть использованы для этих целей, равно как и другие электронноплотные вещества. Окрашивание происходит практически моментально и не требует дополнительной фиксации. Уранилацетат позволяет проводить как позитивное, так и негативное контрастирование. Это объясняется его аффинностью к дцДНК. Позитивно контрастированные головки часто представляются черными из-за сильной аффинности уранилацетата к дцДНК, имеют сглаженные углы капсида и обычно на 30% меньше, чем негативно контрастированные капсиды. Такие частицы не подходят для идентификации и морфометрии (Askermann, 2009).

1.3.2.2 Измерения

Часто стандарты размеров, предлагаемые производителем, являются лишь относительными и должны быть проверены тестовыми образцами. Так, для точных измерений подходит использование кристаллов каталазы печени быка. Латексные сферы не подходят для данных целей. Возможно добавление бактериофага Т4 к исследуемому препарату и использование его несокращенного хвоста в качестве стандарта длины (114 нм) (Askermann, 2009).

1.4 Фаготерапия

1.4.1 Актуальность фаготерапии

Отсутствие лекарств против бактериальных инфекций или их неэффективность – серьезная проблема 21 века (WHO, 2014). В последние годы быстрое увеличение числа патогенов с множественной лекарственной устойчивостью оказало заметное давление на органы здравоохранения. В июне 2017 года Европейская комиссия приняла «Европейский единый план действий в области здравоохранения против резистентности к антимикробным препаратам», целью которого является снижение появления и распространения антимикробной резистентности, а также стимулирование разработки новых эффективных противомикробных препаратов (Fernández *et al.*, 2018). В сентябре 2017 года в Российской Федерации утвердили стратегию «Предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года», одной из целей которой является разработка и внедрение препаратов на основе бактериофагов, а также регламентов их применения в различных областях здравоохранения (Правительство РФ, 2017).

В настоящее время сотни тысяч смертей в год вызваны внутрибольничными инфекциями и прогноз на будущие годы намного хуже, о чем свидетельствуют современные исследования. В 2009 году более 20 тысяч человек в США умерли из-за отсутствия эффективных антибиотиков. Такая же статистика наблюдалась и в Европе. Более 100 тысяч человек в мире погибли от инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями (Rohde *et al.*, 2018). Ситуация ухудшается, и в 2019 году число ежегодных смертей в мире, связанных с резистентными к антибиотикам бактериями, достигло 4,95 миллионов (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022).

Во время Генеральной Ассамблеи в 2016 году Организация Объединенных Наций решила интенсивно работать над планом разработки новых противомикробных препаратов и методов лечения на национальном, региональном и международном уровнях для борьбы с

антибиотикорезистентностью. Во многих западных странах были также установлены национальные планы действий. Европейский союз установил такую стратегию в рамках программы «Горизонт-2020». В 2015 году министерства здравоохранения G7 призвали к глобальному подходу «One Health» и повторили это во время саммита G20 в Гамбурге в 2017 году. Предсказания тревожат: считается, что 10 миллионов человек умрут от антибиотикорезистентных инфекций в 2050 году, если ничего не изменится (Carlet, 2015; Debarbieux *et al.*, 2015).

Ситуация осложняется тем, что на сегодняшний день клинически важные антибиотические препараты представляют собой модификации существующих средств. Новые разработки отсутствуют из-за слишком долгого и сложного процесса создания и лицензирования новых антибактериальных агентов, что неприемлемо в условиях глобального кризиса. Необходимо искать новые соединения, однако многие фармацевтические предприятия отказываются от разработки новых антибиотических препаратов из-за риска быстрого возникновения резистентности (Ling *et al.*, 2015). Так, для ESKAPE микроорганизмов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter*) характерно быстрое приобретение устойчивости к различным антимикробным агентам, в том числе устойчивости к множеству антибиотиков (Moellering, 2010).

Антибиотики не только становятся все менее эффективными, но их использование также может вызвать дисбиозы, особенно в кишечнике или в местах вторичных инфекций, таких как местный или инвазивный кандидоз. Последствия такого воздействия для здоровья человека могут быть катастрофическими: было показано, что чрезмерное повторное использование антибиотиков разрушает большую часть естественной флоры кишечника, а мультирезистентные штаммы *Clostridium difficile* часто колонизируют кишечник и вытесняют другие микроорганизмы (Knight *et al.*, 2017).

Таким образом, в настоящее время необходима разработка альтернативных методов борьбы с бактериями, устойчивыми к антибиотическим препаратам. Среди многих антимикробных средств, предлагаемых для замены или дополнения традиционных антибиотиков, бактериофаги являются перспективными кандидатами, что подтверждается заключением Национального института Здоровья (NIH, USA), который признал перспективность этих биологических агентов в борьбе с устойчивостью к антибиотикам (NIH, 2014).

Однако за последние 20 лет так и не появилось ни одного коммерческого фагового препарата, так как их невозможно зарегистрировать в соответствии с актуальными правовыми нормами (Fernández *et al.*, 2018). В Российской Федерации существуют коммерческие лекарственные фаговые препараты, однако они были зарегистрированы еще во время СССР с последующим обновлением лицензии. В настоящий момент невозможна регистрация подобных препаратов.

Из-за сложностей с регистрацией готовых лекарственных форм с бактериофагами фаготерапия в мире стала развиваться по пути изготовления персонализированных фаговых препаратов. В Бельгии существует концепция «магистральных препаратов» с бактериофагами. В европейском и бельгийском законодательстве понятие «магистральный препарат» (в США - рецептурный препарат) определяется как «любое лекарственное средство, приготовленное в аптеке в соответствии с рецептом врача для отдельного пациента» (Pirnay *et al.*, 2018). В Российской Федерации развивается похожая концепция, отличающаяся тем, что «коктейль» бактериофагов изготавливают не для отдельного пациента, а адаптируют под конкретное лечебное учреждение/отделение (Белобородова *и др.*, 2021).

1.4.2 Правила отбора терапевтических фагов

Для терапевтических целей бактериофаги должны быть разведены в растворе, быть стабильными и иметь высокое сродство к бактериям.

Рекомендуется производить мониторинг коллекций и обновлять коктейли свежевыделенными и описанными фагами, замещая старые и неэффективные (Gill and Young, 2011).

Процесс получения терапевтического препарата должен быть ассоциирован с последовательной очисткой, чтобы исключить из конечного продукта компоненты питательной среды, липополисахариды, бактериальную ДНК и белки, а также возможные токсины. Более того, фаговый титр (БОЕ/мл) должен быть достаточно большим (Pirnay *et al.*, 2015).

Морфология бляшек – важный фактор для отбора терапевтических бактериофагов. Вид полученных бляшек зависит от многих факторов, например, разных свойств фага, фазы роста бактерий, диффузии вирионов в агаровый слой и инактивации частиц в дебрисе бактерий (Abedon and Yin, 2009; Gill and Young, 2011). Схожесть в морфологии бляшек может быть результатом действия схожих бактериофагов. Адсорбция считается эффективной, когда она происходит быстро (значения константы адсорбции в пределах 10^{-8} – 10^{-9} мл/мин). Изучение динамики взаимодействия фаг-клетка *in vitro* может быть критерием для отбора фагов, пригодных для исследований *in vivo* (Bull and Gill, 2014). Успешное лечение требует такого соотношения латентного периода и выхода фага, которое обеспечит высокую литическую активности бактериофага (Mirzaei and Nilsson, 2015).

После выделения необходимо описать каждый новый фаг до включения его в коллекцию. Необходимо исследовать такие параметры, как: латентный период, выход фага (Mirzaei and Nilsson, 2015), динамику адсорбции, стабильность в условиях хранения, фаговую морфологию, ультраструктуру и таксономию, а также уровень генерации устойчивых форм (Ackermann and Heldaal, 2010; Gill and Human, 2010). Для терапевтических целей стоит отбирать фаги с минимальным уровнем генерации устойчивых форм бактерий. Для его снижения рекомендуется использовать смеси бактериофагов («коктейли») (Labrie *et al.*, 2010).

Более того, бактериофаги должны быть охарактеризованы с помощью секвенирования всего генома, чтобы исключить наличие генов токсинов, генов факторов вирулентности, а также генов, ответственных за лизогению. Кроме того, терапевтические фаги не должны быть способны к осуществлению общей трансдукции, чтобы исключить передачу генов резистентности. Для безопасного применения фагов необходимо исключить умеренные бактериальные вирусы из препаратов, так как встраивание фага в геном клетки может привести к конверсии и, например, продукции токсинов (Rohde *et al.*, 2018). Таким образом, при производстве фагов должен осуществляться тщательный контроль и подробная характеристика всех образцов (Lobocka *et al.*, 2014).

1.4.3 Лицензирование фаговых препаратов

К сожалению, за последние 20 лет так и не появилось ни одного нового коммерческого лечебного фагового препарата, так как их невозможно зарегистрировать в соответствии с актуальными правовыми нормами, что связано с особенностями самих бактериофагов (Fernández *et al.*, 2018). В Европе и США не существует специального регулирования в отношении бактериофагов. С 2011 года фаги рассматриваются как лекарственное средство в США или как лекарственный препарат в Европейском союзе (Faucconnier, 2019). Квалификация фагов как лекарственного препарата для применения у человека была одобрена в 2015 году на семинаре Европейского агентства лекарственных средств (European Medicines Agency, EMA), несмотря на предупреждения о неадекватности подобной оценки со стороны специалистов, занимающихся разработкой фагов. После этой встречи они выразили свое несогласие в письме, в котором упомянули необходимость создания новой нормативной базы (Debarbieux *et al.*, 2015).

Проведенные клинические испытания выявили ряд проблем, связанных с проведением двойных слепых исследований, которые требуют огромных денежных и временных затрат, необходимых для тестирования хотя бы части состава препарата (Rohde *et al.*, 2018).

Несмотря на все попытки научных сообществ изменить существующие правила регистрации фаговых препаратов для терапии человека, до сих пор нет установленных правил ЕС, позволяющих использовать бактериофаги для профилактики/лечения инфекционных заболеваний животных и растений (Verbeken *et al.*, 2014; Kutter *et al.*, 2015).

По-прежнему необходима дальнейшая работа для адаптации результатов лабораторных исследований к крупномасштабному производству и очистке бактериофагов в соответствии с надлежащей производственной практикой (GMP). Другим важным недостатком коммерциализации продуктов на основе фагов является необходимость разработки фаговых смесей, эффективных против максимально возможного количества штаммов целевой бактерии. Кроме того, эти смеси необходимо регулярно обновлять, чтобы адаптировать их к актуальным клиническим штаммам. К сожалению, такая стратегия не может быть реализована из-за существующих правил регистрации препаратов (Fernández *et al.*, 2018). Однако, последние исследования показали, что лицензирующие органы в Европе и США стремятся облегчить лицензирование фаготерапии (Rohde *et al.*, 2018).

Также крайне важно иметь возможность немедленного использования вновь выделенных фагов. Для этого лицензирующие требования должны быть минимальны и ограничиваться определением полного цикла производства. В настоящее время обсуждаются возможные пути лицензирования фаговых препаратов. Необходимо создать модельный путь лицензирования, который бы учитывал, что бактериофаги являются природными, специфично действующими биологическими агентами, которые способны элиминировать рост патогенных бактерий и при этом саморегулироваться (Rohde *et al.*, 2018). Вместе с тем исследователи считают, что процесс лицензирования должен быть адаптирован к особенностям фаготерапии, а не наоборот (Fausonnier, 2017).

Дополнительной проблемой является то, что на фаговые препараты не распространяется право интеллектуальной собственности. Однако, эту проблему

можно решить путем разработки специальной стратегии их применения. (Rohde *et al.*, 2018).

Из-за описанных трудностей в регистрации лекарственных средств с бактериофагами они обычно используются в контексте статьи 37 Хельсинкской декларации (Pirnay *et al.*, 2019). Статья 37 Хельсинкской декларации гласит, что при лечении отдельного пациента, если не существует доказанных методов вмешательства или другие известные методы неэффективны, врач, обратившись за советом к экспертам, с информированного согласия пациента или его законного представителя, возможно применение непроверенного средства, если, по мнению врача, оно дает надежду на спасение жизни, восстановление здоровья или облегчение страданий.

Наибольшее развитие регулирование фаготерапии получило в Бельгии, где правительство под руководством группы исследователей из военного госпиталя королевы Астрид в Брюсселе в 2017 году приняло решение рассматривать фаги не как промышленные лекарственные препараты, а как активные ингредиенты в магистральных препаратах. Понятие «магистральный препарат» определяется как «любое лекарственное средство, приготовленное в аптеке в соответствии с рецептом врача для отдельного пациента» (Pirnay *et al.*, 2018). Этот шаг позволил бельгийскому госпиталю производить фаги для лечения бактериальных инфекций человека. Тем не менее, остаются вопросы, требующие уточнения, поскольку нет четкого консенсуса по требованиям и стандартам производства подобных препаратов.

В Российской Федерации развивается похожий подход к легализации применения бактериофагов, отличающийся тем, что «коктейль» бактериофагов изготавливают не для отдельного пациента, а для определенного лечебного учреждения/отделения исходя из результатов мониторинга бактериального пейзажа (Белобородова *и др.*, 2021). Для масштабирования и легализации подхода необходима регистрация фармацевтических субстанций и изготовление конечных форм через производственные аптеки.

1.4.4 Терапевтическое применение бактериофагов

Фаготерапия основана на терапевтическом применении фагов для лечения бактериальных инфекций. Только литические фаги подходят для применения в терапии по двум основным причинам. Во-первых, поскольку литические фаги разрушают бактерий-хозяев, в то время как умеренные – нет. Во-вторых, поскольку умеренные фаги могут переносить гены вирулентности и резистентности, так как в ходе жизненного цикла их геном интегрируется и реплицируется вместе с бактериальным генетическим материалом (Wittebole *et al.*, 2013; Criscuolo *et al.*, 2017). Однако достижения синтетической биологии открыли новые возможности для использования умеренных фагов в качестве терапии бактериальных инфекций путем удаления из их генома лизогенных генов (Monteiro *et al.*, 2019; Dedrick *et al.*, 2019). Это может быть полезно при инфекциях, вызванных бактериальными видами, для которых практически не обнаружено вирулентных фагов, таких как *Clostridium difficile* (Hargreaves and Clokie, 2014) и *Mycobacterium abscessus* (Dedrick *et al.*, 2019).

Бактериофаги обладают рядом уникальных преимуществ по сравнению с традиционными антибиотиками, включая специфичность, безопасность, эффективность против бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам и возможность генетических манипуляций. Более того, они являются единственным терапевтическим агентом, который способен саморегулироваться в местах заражения и элиминируется в отсутствие бактерии-хозяина (Rohde *et al.*, 2018). К тому же, в исследовании, проводимом с 2008 по 2010 год и включающим 153 пациента, было показано, что бактериофаги не вызывают нежелательный иммунный ответ (Międzybrodzki *et al.*, 2017; Borysowski *et al.*, 2017; Łusiak-Szelachowska *et al.*, 2017). Еще одним важным преимуществом бактериофагов является их способность проникать в биопленки лучше антибиотических препаратов за счет специальных ферментов, таких как полисахарид деполимеразы, а также путем распространения через водные каналы (Harper *et al.*, 2014; Rossmann *et al.*, 2015).

Более того, фагоустойчивость, в отличие от устойчивости к антибиотикам, зачастую возникает из-за изменения поверхностных белков бактерии, которые играют важную роль в их жизнедеятельности, что может привести к потере приспособленности и/или вирулентности (Oechslin, 2018). Наконец, в отличие от других противомикробных препаратов, бактериофаги способны эволюционировать совместно с хозяином, самостоятельно адаптируясь к возможным резистентным мутантам. Причем для бактериофагов была показана более высокая скорость мутаций по сравнению с бактериями-хозяевами (Stern and Sorek, 2011).

Несмотря на эффективность одного типа бактериофага против бактериального штамма из-за его высокой специфичности, фаговые коктейли являются наиболее предпочтительной формой применения, так как позволяют решать проблемы, связанные с фагоустойчивостью и низким спектром действия (Pires *et al.*, 2017). Обычно они состоят из разных фагов, которые атакуют различные виды и штаммы бактерий. В терапии сельскохозяйственных животных было показано, что фагорезистентные штаммы удается победить благодаря использованию различных фаговых коктейлей до полного элиминирования инфекции (Oechslin, 2018).

Более того, фаговые коктейли могут играть важную роль в борьбе с биопленками, позволяя вирусам быть эффективными дольше, задерживая появление резистентности ко всем фагам, входящим в состав коктейля (Pires *et al.*, 2017).

Также в борьбе с биопленками существенную роль играют полисахарид-деполимеразы. Они очень полезны из-за способности атаковать углеводы бактериальных мембран (Crisuolo *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017) и могут быть представлены в двух формах: как компонент фаговой частицы, прикрепленный к базальной пластине, или в виде белка, освобождающегося в результате клеточного лизиса после репликации фага. Некоторые деполимеразы способны устранять биопленки, например деполимераза, полученная из фага против

Staphylococcus epidermidis. Таким образом, эти ферменты способствуют проникновению фага в биопленку и обеспечивают доступ к клеткам-хозяевам из-за их способности к деградации капсульных полисахаридов (Pires *et al.*, 2016).

Следует отметить, что человек сосуществует с фагами на протяжении всей жизни, они являются наследуемым элементом человеческого микробиома. (Reyes *et al.*, 2012), так что возникновение нежелательных побочных эффектов, в том числе токсичности или аллергии, крайне маловероятно. Кроме того, было показано, что фаготерапия безопасна и практически не имеет побочных эффектов (Gorski *et al.*, 2007; Miedzybrodzki *et al.*, 2012).

Помимо медицины, фаговая терапия играет важную роль в других областях, таких как производство продуктов питания и животноводство. Фаги полезны для обеспечения безопасности пищевых продуктов, поскольку они позволяют бороться с бактериальными инфекциями животных и тем самым предотвращать потребление зараженной пищи. Интересным примером является использование фагов для борьбы с пищевыми инфекциями, вызванными бактериями рода *Salmonella* (сальмонеллез), *Campylobacter* (кампилобактериоз у домашней птицы), *Listeria monocytogenes* и *E. coli* (El-Shibiny and El-Sahhar, 2017).

Сочетание бактериофагов и антибиотиков – другая перспективная стратегия использования фаговых препаратов. Таким образом можно снизить устойчивость бактерий, поскольку фаги могут уничтожать резистентные к антибиотикам штаммы и наоборот (Valério *et al.*, 2017). Такая комбинация обычно приводит к синергии бактериофагов и антибиотиков, что выражается в повышении чувствительности бактериальных клеток к вирусам в ответ на введение сублетальных доз антибиотиков и позволяет эффективно бороться с патогенными клетками (Pires *et al.*, 2017). Лучшие результаты были получены при комбинации фагов *E. coli* и антибиотика ципрофлоксацина (Valério *et al.*, 2017). Более того, было показано, что совместное использование фагов и антимикробных препаратов может вернуть чувствительность бактерий к

антибиотикам, так как в ходе мутагенеза и отбора в сторону фагоустойчивых форм бактерий теряются механизмы резистентности к антимикробным препаратам (Chan *et al.*, 2016).

В настоящее время фаги применяются:

1. В фаготерапии:

- Профилактика инфекционных заболеваний человека
- Лечение инфекционных заболеваний человека

2. В ветеринарии:

- Профилактика инфекционных заболеваний животных
- Лечение инфекционных заболеваний животных

3. В агропромышленности:

- Контроль бактериальных заболеваний растений

4. В контроле пищевой продукции:

- Контроль зоонозных бактерий в первичной продукции
- Санобработка и дезинфекция
- Защита продуктов питания

5. В защите окружающей среды:

- Очистка сточных вод

(Fernández *et al.*, 2018).

Отдельные клинические исследования фаговой терапии и опубликованные клинические случаи свидетельствуют о высокой степени безопасности различных путей введения фагов в организм человека, однако не во всех работах была показана эффективность. Описаны следующие способы применения бактериофагов:

Пероральное применение

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование I фазы по пероральному приему показало, что прием 3 раза в день в течение 2 дней подряд одного фага, направленного против *E. coli*, в низкой концентрации $9,0 \times 10^5$ БОЕ на дозу и высокой концентрации $9,0 \times 10^7$ БОЕ на дозу

не вызвало никаких побочных эффектов у здоровых взрослых людей (Bruttin and Brussow, 2005). В другом исследовании безопасности не было выявлено серьезных побочных эффектов как у взрослых, так и у детей после перорального приема смеси («коктейля») из 10 фагов, направленных против *E. coli* в концентрациях от $1,5 \times 10^7$ до $1,5 \times 10^8$ БОЕ на дозу. Однако у детей наблюдалось повышение уровня аспартаминотрансферазы, а некоторые взрослые сообщали о преходящих болях в животе, диспепсии и зубной боли (McCallin *et al*, 2013) В двойном слепом, плацебо-контролируемом, перекрестном исследовании ежедневный прием здоровыми взрослыми диетической добавки из 4-х фагов, направленных против *E. coli*, в количестве 10^6 БОЕ на дозу не вызвал серьезных побочных эффектов через 28 дней применения (Febvre *et al.*, 2019). Несмотря на снижение количества *E. coli* в фекалиях, глобального нарушения сообщества микробиоты кишечника не наблюдалось, а метаболизм короткоцепочечных жирных кислот и липидов практически не изменился, что позволяет предположить, что фаги могут влиять на целевые виды микробиома, не вызывая дисбактериоза. В рандомизированном контролируемом исследовании пероральное лечение фагами, направленное против диарейной *E. coli* у детей, не улучшило симптомы острой диареи в сравнении с пероральной регидратационной терапией. Дети получали $1,4 \times 10^9$ БОЕ на дозу российской коммерческой смеси 11-фагов (McCallin *et al*, 2013) или $3,6 \times 10^8$ БОЕ на дозу коктейля из 10 фагов 3 раза в день в течение 4 дней подряд. Побочных явлений, связанных с пероральным применением, не наблюдалось. Менее чем у половины пациентов в кале была обнаружена кишечная палочка, которая составляла <5% от общего количества фекальных бактерий (Sarker *et al.*, 2016).

Внутривенное применение

Описан случай 15-летнего пациента с муковисцидозом, у которого после трансплантации легкого развилась инфекция дыхательных путей. Пациент выздоровел после 32 недель лечения смесью из 3 фагов в концентрации 3×10^9 БОЕ на дозу, вводимой каждые 12 ч. Примечательно, что в лечении вместо

традиционных вирулентных фагов использовались умеренные с модификациями в геномах, исключающими возможность перехода к лизогенному циклу (Dedrick *et al.*, 2019). Также 26-летний пациент с муковисцидозом, получавший смесь 4 фагов в концентрации 4×10^9 БОЕ на дозу каждые 6 ч в течение 8 недель внутривенно в сочетании с антибиотиками, был излечен от легочной инфекции штаммом *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью (Law *et al.*, 2019). В другом описанном случае 57-летняя пациентка с инфекцией штаммом *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью, развившейся после трансплантации легких, была излечена после 4 недель внутривенного введения смеси из 4 фагов в концентрации 4×10^9 БОЕ на дозу каждые 12 ч одновременно с ингаляцией колистина (Aslam *et al.*, 2019).

В несравнительном исследовании антибиотики в сочетании со смесью 3 фагов в дозировке 3×10^9 БОЕ в физиологическом растворе в минуту в течение 10-30 мин 2 раза в день в течение 14 дней дали клиническое улучшение у 8 из 13 реципиентов с инфекционным эндокардитом и бактериемией, вызванными *S. aureus* (Petrovic Fabijan *et al.*, 2020).

Внутрипузырное применение

67-летний пациент с инфекциями мочевыводящих путей (ИМП), вызванными *P. aeruginosa*, был вылечен с помощью смеси из 6 фагов в концентрации 2×10^7 БОЕ на дозу, вводимых непосредственно в мочевого пузырь каждые 12 ч в течение 10 дней, в сочетании с колистином и меропенемом. Пациент не испытывал рецидивов ИМП в течение 12 месяцев (Khawaldeh *et al.*, 2011).

Поверхностное применение

В двойном слепом исследовании I фазы не было отмечено никаких побочных явлений после еженедельного местного промывания венозных язв ног фагами, направленными против *E. coli*, *P. aeruginosa* и *S. aureus*. Однако заживление ран после 12 процедур с использованием бактериофагов в концентрации $3,2 \times 10^{10}$ БОЕ в 50 мл физиологического раствора не отличалось

существенно от промывания только физиологическим раствором. Отсутствие клинического улучшения, вероятно, было вызвано отсутствием чувствительности бактериальных изолятов к лечебным фагам, так как предварительное тестирование на чувствительность не проводилось (Rhoads *et al.*, 2009). Аналогичным образом в многоцентровом двойном слепом рандомизированном исследовании I/II фазы не было выявлено клинического улучшения состояния ожоговой раны после местного лечения инфекции *P. aeruginosa* 12 фагами в сравнении с кремом с сульфадиазином серебра. Исследование имело ряд недостатков, включая повышенный уровень эндотоксинов и нестабильность фагов в применяемых препаратах. Невозможность корректировки параметров лечения в клинических испытаниях привела к тому, что лечение проводилось при концентрации фагов $<10^3$ БОЕ на дозу (Jault *et al.*, 2019).

Напротив, у 16-летнего подростка с редким врожденным кожным заболеванием, называемым синдромом Нетертона, после ежедневного местного и перорального применения неопределенной смеси фагов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Proteus*, *Escherichia*, *Pseudomonas* и *Enterococcus* значительно уменьшилась атопическая экзема. Ежедневная схема лечения состояла из аппликации стерильной марли, смоченной смесью фагов, в течение 20 минут, после чего фаги добавлялись в мазь-крем. Пациент также принимал внутрь 20 мл той же фаговой смеси. Непрерывные ежедневные процедуры проводились в течение 2 недель с двухнедельными перерывами, а через 3 месяца был введен второй коктейль, состоящий из 2 фагов, для борьбы с появлением фагорезистентных изолятов *S. aureus*. Качество жизни пациента улучшилось благодаря уменьшению раздражения кожи и увеличению подвижности суставов (Zhvania *et al.*, 2017).

Интраректальное применение

Три случая хронического простатита, вызванного *Enterococcus faecalis*, были успешно вылечены с помощью интраректальной фаговой терапии в

концентрации 10^8 – 10^9 БОЕ на дозу в течение примерно 1 месяца. По окончании лечения простата всех трех пациентов восстановила нормальную физиологическую функцию (Letkiewicz *et al.*, 2009).

1.4.5 Характеристика *Klebsiella pneumoniae*

Род *Klebsiella* относится к семейству *Enterobacteriaceae*, принадлежащего к классу *Gamma*proteobacteria. *K. pneumoniae* – грамотрицательная, неподвижная, инкапсулированная палочковидная бактерия, колонизирующая слизистые оболочки человека, преимущественно желудочно-кишечного тракта, реже носоглотки (Martin and Bachman, 2018). Показано, что преобладание в кишечнике протеобактерий приводит к пятикратному увеличению риска развития бактериемии (Taur *et al.*, 2012), что позволяет предположить, что бактериальная плотность колонизирующих штаммов играет определенную роль в развитии заболевания. Для роста и размножения *K. pneumoniae* необходимо железо из окружающей среды. Поскольку свободного железа в организме млекопитающих очень мало, *K. pneumoniae* экспрессирует сидерофоры – молекулы, которые имеют более высокое сродство к железу, чем используемые для переноса железа в организмах млекопитающих, такие как трансферрин (Holt *et al.*, 2015). Медицинские манипуляции, такие как гастроскопия, бронхоскопия или искусственная вентиляция легких, могут приводить к попаданию бактерий в новые области внутренних органов, где они могут активно размножаться и вызывать инфекции (Wu *et al.*, 2019). Кроме того, повреждение тканей организма во время манипуляций может обеспечить бактерии дополнительными питательными веществами и способствовать их активному росту. *K. pneumoniae* ассоциируется с такими заболеваниями человека, как пневмония, урогенитальная инфекция, абсцесс печени, инфекция кровотока и др. Это одна из наиболее часто выявляемых бактерий при инфекциях дыхательных путей человека, особенно у госпитализированных пациентов с пневмонией, связанной с лечением в отделениях интенсивной терапии (ОИТ), включая вентилятор-ассоциированную пневмонию (ВАП) (Zhang *et al.*, 2014). Клиническая картина

таких заболеваний быстро прогрессирует, что приводит к высокой смертности (до 50%) (Podschun and Ullmann, 1998; Farzana *et al.*, 2019). Среди бактериальных осложнений после вирусных инфекций дыхательных путей, включая SARS-CoV-2, пневмония, ассоциированная с *K. pneumoniae*, также является одной из наиболее распространенных (Zhu *et al.*, 2020; Mirzaei *et al.*, 2020). Лечение таких осложнений затруднено в связи с ростом резистентности бактерий к антимикробным препаратам, показано, что 80% нозокомиальных инфекций вызываются штаммами, устойчивыми к антибиотикам, что затрудняет их лечение (Qureshi, 2016).

Антибиотикорезистентность, в том числе и полирезистентность, может развиваться из-за наличия плазмид, несущих гены устойчивости к антибиотикам (R-плазмиды) (Soler Bistué *et al.*, 2008). Например, устойчивость к β -лактамам антибиотикам может кодироваться плазмидными генами и возникать в результате синтеза карбапенем-гидролизующих β -лактамаз – ферментов, гидролизующих β -лактамы антибиотиков (Woodford, 2004). Штаммы *K. pneumoniae* часто устойчивы к бета-лактамам расширенного спектра действия (например, пенициллинам и цефалоспорином). При этом штаммы *K. pneumoniae*, продуцирующие бета-лактамазы расширенного спектра действия (Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL), остаются чувствительными к антибиотикам класса карбапенемов (например, имипенему и меропенему). Однако все чаще встречаются инфекции, вызванные штаммами *K. pneumoniae*, которые стали устойчивы даже к карбапенемам. Это связано с более активным использованием антибиотиков класса карбапенемов против штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих ESBL (Chong *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2010; Mshana *et al.*, 2013). Фаготерапия может быть одним из методов борьбы с инфекциями, вызванными антибиотикорезистентными штаммами *K. pneumoniae* (Chhibber, 2008).

K. pneumoniae также продуцирует различные внеклеточные полисахариды, такие как липополисахариды (ЛПС), капсульные полисахариды (КПС) и экзополисахариды (ЭПС), которые играют важную роль в защите бактериальных

колоний от антибиотиков (Stewart, 1996; Yu *et al.*, 2015) и препятствуют доступу фагов к рецепторам (Samson *et al.*, 2013). ЛПС состоят из липида А, кора и О-полисахаридного антигена. ЛПС расположены на наружном слое внешней мембраны бактерий и обеспечивают защиту от антимикробных пептидов и системы комплемента (Clements *et al.*, 2007; Llobet *et al.*, 2015). КПС образуют внешний слой, состоят из линейных или разветвленных олигосахаридов и представляют собой физический барьер, который защищает от фагоцитоза и маскирует фаговые рецепторы (Samson *et al.*, 2013). В формировании биопленки участвуют как КПС, так и ЛПС. ЛПС необходимы для первоначальной адгезии на абиотических поверхностях, а КПС – для покрытия субстрата и формирования зрелой архитектуры биопленки (Balestrino *et al.*, 2008). Внешний клеточный матрикс, являющийся компонентом биопленок бактерий рода *Klebsiella*, состоит из белковых адгезинов, нуклеиновых кислот и КПС (Vu *et al.*, 2009). Показано, что ЭПС препятствуют действию антимикробных пептидов иммунной системы хозяина (Patro and Rathinavelan, 2019). Помимо внеклеточных полисахаридов, *K. pneumoniae* экспрессирует фимбрии, которые представляют собой выросты, участвующие в неспецифической адгезии бактерии на различных поверхностях. Клетки *K. pneumoniae* имеют два основных типа фимбрий: фимбрии 1 типа нитевидной формы и фимбрии 3 типа спиралевидной формы (Paczosa and Mecsas, 2016). Уровень экспрессии каждого типа зависит от среды, в которой находятся бактерии. Предполагается, что гены фимбрий 1 типа активно экспрессируются в бактериях, находящихся в мочевыводящих путях, но не в желудочно-кишечном тракте и легких (Struve *et al.*, 2008), а фимбрии 3 типа играют важную роль в связывании с поверхностью медицинских приборов и развитии биопленок (Struve *et al.*, 2009). Образование биопленок на катетерах, трубках и другом медицинском оборудовании повышает риск возникновения острых инфекций у пациентов, получающих медицинскую помощь, особенно у тех, кто находится на длительном аппаратном жизнеобеспечении, поскольку матрикс биопленки не только физически защищает бактериальные клетки, но и

способствует передаче мобильных генетических элементов, что повышает толерантность микроорганизмов к антибиотикам (Ribeiro *et al.*, 2016). Хотя капсулы могут защищать бактерии от фаговой инфекции, маскируя рецепторы клеток хозяина, некоторые бактериофаги, напротив, используют эти полисахаридные оболочки в качестве рецепторов для инициирования инфекции (Samson *et al.*, 2013).

1.4.6 Изученные бактериофаги против *Klebsiella pneumoniae*

Ввиду актуальности проблемы постоянно проводится выделение новых фагов против *K. pneumoniae*. По состоянию на 2020 год охарактеризовано около 160 бактериофагов *K. pneumoniae*. Они были выделены из различных источников по всему миру, включая сточные воды, морскую воду и образцы содержимого кишечника человека. Большинство выделенных фагов относится к классу *Caudoviricetes* и представляют собой хвостатые вирусные частицы с икосаэдрическими головками, содержащими двухцепочечную ДНК (Herridge *et al.*, 2020).

Адсорбция бактериофагов на клетках *K. pneumoniae* может происходить через капсулу, пили, белки внешней мембраны, сахарные остатки или ЛПС (Bertozzi Silva *et al.*, 2016). Изучение геномов литических фагов *K. pneumoniae* выявило, что для многих характерна экспрессия деполимераз полисахаридов (Chhibber *et al.*, 2013; Keşik-Szeloch *et al.*, 2013; Jamal *et al.*, 2015). В исследовании 2023 года ученые идентифицировали гены, кодирующие деполимеразы, в 38 из 42 изученных геномов бактериофагов (Beamud *et al.*, 2023). Действие фаговых полисахарид-деполимераз способствует разрушению капсул и биопленок *K. pneumoniae*, тем самым повышает восприимчивость бактериальных клеток к антибиотикам, фаговой инфекции и воздействию иммунной системы. Так, было показано, что хвостовой трубчатый белок А (tail tubular protein А, ТТРА) фага КР32 обладает дополнительной деполимеразной активностью и участвует в разрушении капсул. Исследователи клонировали и экспрессировали ТТРА в клетках *E. coli* и изучили его активность с помощью спот-тестов на газонах *K.*

pneumoniae. Микроскопический анализ обработанных и необработанных клеток *K. pneumoniae* показал, что обработанные ТТРА бактериальные клетки лишались капсул (Pyra *et al.*, 2017). В другом исследовании ученые обнаружили девять деполимераз полисахаридов, экспрессируемых фагом ФК64-1, каждая из которых проявляла активность против определенного типа капсул *K. pneumoniae*, что соответствовало широкому спектру хозяев самого фага (Pan *et al.*, 2017). Это указывает на роль полисахарид-деполимераз в определении литического спектра бактериофагов *K. pneumoniae*, что согласуется с результатами исследования Veamud *et al.* (2023), в ходе которого удалось предсказать тропизм бактериофагов для 13 капсульных типов *K. pneumoniae* на основе данных секвенирования. Ученые отметили, что полученные результаты свидетельствуют о возможности прогнозировать литический спектр фагов только на основе информации о последовательности генов вирусных деполимераз, при этом таксономия или морфотип фагов не позволили достоверно предсказать тропизм к какому-либо капсульному типу.

Литические спектры изученных фагов *K. pneumoniae* варьируют от крайне узких, до способных инфицировать представителей разных родов семейства *Enterobacteriaceae*. Так, было показано, что литический фаг фВО1Е специфически заражает клетки *K. pneumoniae* из пандемической клональной группы 258, относящиеся к кладу II, но не относящиеся к близкому кладу I (D'Andrea *et al.*, 2017). Такая специфичность была обусловлена распознаванием специфических капсульных полисахаридов, присутствующих на штаммах, относящихся к кладу II. Бактериофаг КРО1К2, напротив, инфицировал множество штаммов *K. pneumoniae*, а также некоторые штаммы *Escherichia coli* (Verma *et al.*, 2009).

1.4.7 Терапевтическое применение фагов *Klebsiella pneumoniae*

Полноценных клинических испытаний бактериофагов, направленных на *K. pneumoniae*, не было проведено, однако задокументированы отдельные клинические случаи и исследования.

Голландские врачи сообщили об успешном лечении пациента с рецидивирующей инфекцией мочевыводящих путей (ИМП), вызванной ESBL-продуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, комбинацией меропенема и фагов после того, как пациент обратился за фаговой терапией в Институт Элиава в Грузии. Несколько курсов меропенема не помогли вылечить заболевание, но комбинированное лечение бактериофагами и меропенемом помогло пациенту освободиться от инфекции с отсутствием рецидивов в течение 14 месяцев (Kuipers *et al.*, 2019).

В другом клиническом случае итальянские врачи сообщили о применении индивидуально разработанного коктейля литических фагов для деколонизации кишечника пациента с высоким риском рецидивирующих инвазивных инфекций, вызванных штаммом *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью, KPC-3 (ST307), без побочных эффектов. В Институте Элиава обнаружили, что как пероральное, так и интравенное лечение фагами позволяет вылечить кишечную инфекцию, вызванную *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью (Corbellino *et al.*, 2020).

Проспективное исследование, проведенное в Индии, показало, что отдельные фаги или коктейли литических фагов могут быть использованы для лечения и ликвидации незаживающих язв кожи, в которых бактериальные биопленки препятствуют достижению антибиотиками цели (Patel *et al.*, 2019). Пациенты наблюдались в течение 3 месяцев после фаговой терапии для мониторинга размера и динамики заживления раны. Размер и глубина раны значительно уменьшились в период с 1-го по 60-й день, при этом большее число пациентов без диабета (19/21) излечилось по сравнению с пациентами с диабетом (20/27). Только у 6 из 48 пациентов в ране была обнаружена *K. pneumoniae* (в чистой или смешанной культуре), и у них наблюдалось наиболее медленное заживление в конце наблюдения. Не было представлено никакой информации о том, сколько различных фагов против *K. pneumoniae* было включено в исследование и обладают ли они деполимеразной активностью,

которая может способствовать разрушению биопленки и лечению инфекции, не сообщается.

Инфекция легких, вызванная *K. pneumoniae* во время медикаментозной иммуносупрессии после трансплантации сердца, была успешно излечена у 40-летнего пациента после ингаляционного введения коктейля из двух фагов в концентрации 2×10^8 БОЕ на дозу и ежедневного назогастрального приема $1,8 \times 10^9$ БОЕ на дозу в течение 4 дней в соответствии с Хельсинкской декларацией. После проведения фаговой терапии *K. pneumoniae* не обнаруживалась в бронхиальном лаваже, но оставалась в стуле пациента (Rubalskii *et al.*, 2020).

У 60-летнего пациента, которому была пересажена почка, в течение 15 месяцев после трансплантации произошло 12 тяжелых эпизодов инфекции мочевыводящих путей (ИМП), вызванных *K. pneumoniae*. Фаговая терапия была начата после 10-го эпизода ИМП и продолжалась в течение еще двух госпитализаций. Введение бактериофагов интравенно не вызвало никаких побочных эффектов у пациента, и в течение 4 лет после лечения фагами пациент не госпитализировался по причине ИМП (Rostkowska *et al.*, 2020).

62-летний пациент с потенциально угрожающей конечности хронической инфекцией протеза колена, вызванной *K. pneumoniae*, после нескольких неудачных хирургических вмешательств и длительной антибиотикотерапии был подвергнут внутривенной фаговой терапии. Пациент получал 40 ежедневных 30-минутных инфузий одного фага в концентрации $6,3 \times 10^{10}$ БОЕ в 50 мл физиологического раствора. Во время фаговой терапии у пациента наблюдалось улучшение эритемы, отека, боли, амплитуды движений и функции колена. Примерно через 2 недели после начала терапии пациент сообщил о незначительном и периодическом зуде нижних конечностей, но явных побочных эффектов не наблюдалось (Cano *et al.*, 2020).

Из приведенных данных следует, что поиск бактериофагов *K. pneumoniae* и создание их комбинаций («коктейлей») для борьбы с бактериальными

инфекциями является крайне актуальной задачей. В состав коктейлей желательно включать фаги с деполимеразной активностью для борьбы с капсулами и биопленками. Вместе с тем, выделенные вирусы должны быть тщательно изучены и классифицированы перед применением, а их безопасность должна быть подтверждена с помощью секвенирования генома. Для терапии следует отбирать только литические фаги, при этом спектр их действия должен быть достаточно широким, а частота генерации фагоустойчивых форм низкой. Также следует отбирать фаги, латентный период и выход частиц которых обеспечивают максимальную продуктивность вируса. Более того, требуется клиническая апробация, определение параметров клинической эффективности, а также разработка правил регистрации фаговых препаратов, учитывающих биологические особенности вирусов прокариот.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1 Коммерческие наборы, питательные среды, реактивы

В работе использовали следующие химические реактивы и коммерческие препараты:

NaCl (таблетки), двузамещенный фосфорнокислый натрий (Na_2HPO_4), лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), тетраборат натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) соляная кислота (HCl), гидроокись натрия (NaOH), хлорид цезия (CsCl), митомицин С, краситель Coomassie Brilliant Blue R-250, ЭДТА (динатриевая соль, дигидрат) (EDTA, BioUltra for molecular biology), додецилсульфат натрия (SDS), трис-HCl (Tris-HCl), Трис-ОН (Tris-ОН), DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол) – фирмы Sigma-Aldrich (США).

Уранилацетат – фирмы Serva (Германия).

Коллодий – производства фирмы МедХимПром (Россия).

ВНИ (Brain Heart Infusion) агар (20,8 г на 400 мл дист. воды), ВНИ (Brain Heart Infusion) бульон (14,8 г на 400 мл дист. воды), глутаральдегид – фирмы Himedia (Индия).

2x буфер Лэммли для образцов (2x Laemmli Sample Buffer) (50 mM Трис-HCl (pH 6,8), 4% додецилсульфат натрия (SDS), 5% β -меркаптоэтанол, 20% глицерин, 0.1% бромфеноловый синий), β -меркаптоэтанол (2-Mercaptoethanol) – производства фирмы Bio-Rad (США).

Маркеры для белкового фореа (Pierce™ Unstained Protein MW Marker), маркеры для электрофореза ДНК (Lambda DNA/HindIII Marker; 100 bp Plus DNA Ladder), HindIII (10 U/ μL), HinfI (10 U/ μL), HaeIII (10 U/ μL), EcoRV (10 U/ μL), PvuI (10 U/ μL), Buffer R (10X) (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA), SspI (10 U/ μL), Buffer G (10X), BamHI (10 U/ μL), Buffer BamHI (10X) (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA), NotI (10 U/ μL), VspI (10 U/ μL), NdeI (10 U/ μL), BglII (10 U/ μL), BglIII (10 U/ μL), SalI (10 U/ μL), Buffer O (10X) (50 mM Tris-HCl (pH 7.5),

10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.1 mg/mL BSA), EcoRI (10 U/μL), Buffer EcoRI (10X) (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA), KpnI (10 U/μL), Buffer EcoRI (10X) (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA), MspI (10 U/μL), SmaI (10 U/μL), DraI (10 U/μL), Buffer Tango (10X) (33 mM Tris-acetate (pH 7.9), 10 mM magnesium acetate, 66 mM potassium acetate, 0.1 mg/mL BSA), Бромистый этидий (10 mg/mL) – фирмы Thermo Scientific (США).

Протеиназа К (10 мг/мл) – фирмы Синтол (Россия).

Хлороформ, изопропиловый спирт – фирмы Химмед (Россия).

Буфер для нанесения (BlueJuice™ Gel Loading Buffer) (10X) (10 mM Трис-НCl (pH 7.6), 60 mM ЭДТА, 0.03% бромфеноловый синий, 60% глицерин) – фирмы Invitrogen (США).

Nextera DNA Library Preparation Kit – фирмы Illumina (США).

Набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала «РИБО-преп», наборы реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa*, ДНК энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*), стафилококков (*Staphylococcus* spp.), стрептококков (*Streptococcus* spp.) – Amplisens (Россия).

Набор реагентов для ПЦР "Колонофлор-16" – АльфаЛаб (Россия).

2.1.2 Растворы и буферы

В работе использовали дистиллированную воду, подготовленную с помощью системы Liston A1210 (Россия).

Изотонический физиологический раствор, NaCl, pH 7,0 (состав: 8,5 г NaCl, дистиллированная вода до 1 литра).

Натрий-фосфатный буфер, pH 7,0 (состав: 305 мл 0,1 М Na₂PO₄*2H₂O 17,8 г/л и 195 мл 0,1 М Na₂PO₄*2H₂O 15,6 г/л, дист. Вода до 1 л).

Трис-НCl буфер, pH 7,2 (состав: 221 мл 0,1 М HCl 8,5 мл 36% HCl + 991,5 мл H₂O и 500 мл 0,1 М трис (гидрооксиметиламинометан) 12,1 г/л), дист. вода до 1 л).

Буфер TE (состав: 10 mM Трис-НСl (рН 8,0), 0,5 mM ЭДТА).

2.1.3 Бактериальные штаммы

Для работ с бактериофагами использовали штаммы *Klebsiella pneumoniae* из коллекции ООО НПЦ «Микромир». Все штаммы перед внесением в коллекцию были исследованы на MALDI-TOF масс-спектрометре Microflex (Bruker, США) и с помощью биохимических тестов (MIKROLATEST, Erba Mannheim) с последующим анализом на спектрофотометре Multiskan Ascent (Thermo Scientific, США). Штаммы были получены из:

- Клинических образцов из г. Тула; г. Серпухов; г. Москва; г. Пушкино; г. Уфа;
- Научного центра акушерства, гинекологии и перинатологии имени В. И. Кулакова;
- Московского городского научно-исследовательского института скорой помощи имени Н. В. Склифосовского;
- Клинической больницы № 83 ФМБА г. Москва;
- Городской клинической больницы № 67 г. Москва.

Штаммы являются клиническими и были получены от многих пациентов за несколько лет, что позволяет говорить об актуальности коллекции и о ее соответствии текущему спектру циркулирующих штаммов. Более подробная информация о характеристиках бактериальных штаммов, включая результаты MALDI-TOF и MIKROLATEST, представлена в **Приложении 1**.

Для выделения и наработки бактериофагов, а также для проведения экспериментов в лаборатории использовали четыре штамма: K1 237, K1 325, K1 315 и K1 263. Данные штаммы используются в лаборатории как наиболее удобные в качестве производственных и наиболее чувствительные к действию бактериофагов. Для каждого бактериофага использовали отдельный штамм: K1 237 для vB_KpnS_FZ10, K1 325 для vB_KpnS_FZ41, K1 315 для vB_KpnP_FZ12 и K1 263 для vB_KpnM_FZ14. Для экспериментов с коктейлем бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 был выбран штамм K1 315. В

коллекции НПЦ «Микромир» нет бактериального штамма, который был бы чувствителен ко всем 4 фагам. Штамм был получен от пациента с пневмонией и проверен на чувствительность к антибиотикам диско-диффузионный тестом Кирби-Бауэра для антимикробных препаратов по стандартам Европейского комитета по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) и Института стандартов клинических лабораторий (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) перед добавлением в коллекцию. Результаты тестов на чувствительность к антибиотикам представлены в **Приложении 2**.

2.2 Выделение бактериофагов

Бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14 и vB_KpnS_FZ41 выделяли в четырех отдельных сериях наработки из образцов воды, взятых с очистных сооружений под Москвой, Россия. Процесс выделения начинали с добавления к образцу натрий-фосфатного буфера (pH 7,0) до конечной концентрации 0,05 М, затем добавляли NaCl до конечной концентрации 1 М. Смесь инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) в течение 60 мин при температуре +37 °С и 100 об/мин. Затем надосадочную жидкость отбирали и центрифугировали (6800 g, 20 мин) на центрифуге Avanti J-E с ротором JA 14.50 (Beckman Coulter, США). После чего отбирали супернатант и центрифугировали в течение 2 ч при 96 200 g в ультрацентрифуге Optima L-90 K (Beckman Coulter, США) с ротором SW28. Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 1 мл 0,1 М Трис-НСl буфера (pH 7,0). Полученную суспензию последовательно фильтровали через фильтры 1,2 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм (MF-Millipore, США; Sartorius, Германия). Полученный фильтрат хранили при 4° С в холодильнике.

2.3 Нарботка и очистка бактериофагов

В качалочных колбах объемом 800 мл смешивали 100 мл бульона с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain Heart Infusion (BHI) broth) и 10 мл ночной культуры клеток *K. pneumoniae*. В каждую отдельную колбу вносили клетки

одного определенного штамма *K. pneumoniae* (K1 327, K1 325, K1 315 и K1 263). Смесь инкубировали в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) в течение 2 ч при температуре +37 °С и 100 об/мин. Затем в колбы добавляли по 1 мл фильтрата бактериофагов и инкубировали в течение ночи. Утром оценивали лизис бактериальной культуры. Содержимое колб дифференциально центрифугировали, а затем фильтровали согласно методике, описанной в пункте 2. Полученные фильтраты хранили при 4° С в холодильнике.

2.4 Титрование бактериофагов по Грациа (Gratia, 1936)

Готовили суспензию клеток *K. pneumoniae* в физиологическом растворе. Концентрация клеток в суспензии составляла приблизительно 10^9 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц на мл). Затем готовили последовательные разведения (от 10^{-1} до 10^{-10}) каждого из четырех полученных фильтратов с бактериофагами в физиологическом солевом растворе. 0,2 мл культуры и 0,1 мл определенного разведения бактериофага добавляли в пробирки с мягким агаром (0,6%), перемешивали. Полученную смесь распределяли по чашкам Петри с твердым агаром. Инкубировали 24 ч при температуре +37 °С в термостате (Binder GmbH, Германия). После окончания инкубационного периода оценивали полученные бляшки.

2.5 Получение «чистых линий» бактериофагов и анализ морфологии бляшек

Единичные бляшки с фрагментами агара, полученные для каждого из четырех фильтратов, вырезали из мягкого агара и помещали в разные пробирки с 1 мл физиологического раствора. Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем отбирали полученные экстракты и повторяли для каждого пункты 3 и 4 настоящей методики в 3 повторностях. Полученные фильтраты хранили при 4 °С в холодильнике. После титрования по Грациа описывали морфологию полученных бляшек.

2.6 Определение литического спектра бактериофагов

Для оценки литического спектра наработанных бактериофагов использовали методы спот-тестирования и титрования по Грациа. В качестве тест-культуры использовали 14 штаммов *K. pneumoniae*. Готовили суспензию клеток *K. pneumoniae* в физиологическом растворе. Концентрация клеток в суспензии составляла приблизительно 10^9 КОЕ/мл. 0,2 мл культуры добавляли в пробирки с мягким агаром (0,6%), перемешивали. Полученную смесь распределяли по чашкам Петри с твердым агаром и давали застыть. Затем 15 мкл фильтрата бактериофагов (или их комбинации) в нескольких разведениях наносили точечно на мягкий агар. Чашки Петри инкубировали в течение 24 ч при температуре +37 °С в термостате (Binder GmbH, Германия). После инкубации оценивали наличие пятен лизиса в месте нанесения фильтрата. Для проверки того, что образование пятен лизиса вызвано литическим действием фага, проводили титрование по Грациа и анализ полученных бляшек согласно методике, описанной в пункте 4. Дополнительно проводили анализ пятен лизиса на электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония). Для этого отбирали фрагмент агаровой пластинки из пятна лизиса и помещали его в каплю физиологического раствора объемом 0,1 мл. Инкубировали в течение 25–30 мин. После этого удаляли агаровую пластинку и проводили электронную микроскопию содержимого капли по методике, описанной в пункте 10. Оценивали наличие бактериофагов в исследуемом материале.

2.7 Центрифугирование в градиенте хлористого цезия

Готовили растворы с различным процентным содержанием CsCl (50, 30, 20, 10, 5). В качестве растворителя использовали 0,05 М Трис-HCl буфер (pH 7,0). После этого аккуратно добавляли растворы в центрифужную пробирку от ротора SW 28, наслаивая градиент от большей концентрации к меньшей с помощью пастеровской пипетки. Последним добавляли полученный фильтрат бактериофагов. На каждом этапе контролировали однородность фаз, не допуская их перемешивания. Пробирки уравнивали с помощью 5% раствора CsCl и

помещали в ультрацентрифугу Optima L-90K (Beckman Coulter, США). Затем центрифугировали 2 ч при 96200 g. После центрифугирования аккуратно отбирали содержимое зоны с фагом в пробирки эппендорф с помощью пипетки. Затем центрифугировали содержимое пробирок в течение 2 ч при 96200 g на центрифуге Optima L-90K (Beckman Coulter, США) с ротором SW 28. Осадок ресуспендировали в 0,05 М Трис-HCl буфере (pH 7,0). Полученную суспензию фага хранили при 4 °C в холодильнике.

2.8. Электронная микроскопия

Для проведения электронной микроскопии использовали фильтраты с высоким титром бактериофагов, очищенные в градиенте плотности хлористого цезия. Фильтрат наносили на сетки с нитроцеллюлозной подложкой, дополнительно укрепленные напылением углерода, окрашивали 1%-ым водным уранилацетатом и исследовали в просвечивающем электронном микроскопе (ПЭМ) JEM-1011 (JEOL, Япония). Электронные микрофотографии были сделаны с помощью установленной камеры Erlangshen ES500W (Gatan, США). Параметры бактериофагов измеряли с помощью программы ImageJ на основе полученных изображений. В качестве маркеров использовали стандарты, основанные на измерении длины хвоста (114 нм) бактериофага T4. Для каждого фага измеряли 35 частиц и рассчитывали SD (стандартное отклонение).

2.9 Оценка частоты возникновения фагоустойчивых форм бактерий

Клетки из ночной культуры *K. pneumoniae* суспендировали в физиологическом растворе до 10^8 КОЕ/мл. 0,1 мл культуры и 0,1 мл фильтрата фага, изначально содержащего 10^8 БОЕ/мл (бляшкообразующих единиц на мл), добавляли в пробирки с мягким агаром (0,6%), перемешивали. Полученную смесь распределяли по чашкам Петри с твердым агаром. Инкубировали 24 ч при температуре +37 °C в термостате (Binder GmbH, Германия). После этого оценивали количество резистентных колоний и рассчитывали частоту генерации устойчивых к фагу форм. Полученные резистентные колонии переносили в пробирки с 10 мл ВНІ бульона и перемешивали. Полученную суспензию

инкубировали в течение 2 ч при 37 °С в термостате (Binder GmbH, Германия). Затем в пробирки добавляли митомицин С в конечных концентрациях 0,2 мкг/мл, 0,5 мкг/мл и 2 мкг/мл и инкубировали в течение 24 ч при +37 °С в термостате (Binder GmbH, Германия). Затем суспензии центрифугировали (6800 g, 20 мин) на центрифуге Avanti J-E с ротором JA 14.50 (Beckman Coulter, США), супернатанты отбирали в чистые пробирки, центрифугировали в течение 2 ч при 96 200 g на ультрацентрифуге Optima L-90 K (Beckman Coulter, США) с ротором SW28 и анализировали образец в электронном микроскопе на наличие фагов в суспензии. Кроме того, исходную суспензию устойчивых колоний обрабатывали хлороформом, затем центрифугировали (6800 g, 20 мин) на центрифуге Avanti J-E с ротором JA 14.50 (Beckman Coulter, США) и супернатанты наносили на чувствительные к фагам газоны *K. pneumoniae*.

2.10 Оценка чувствительности бактериофагов к температуре и рН

Для анализа чувствительности к различным значениям температуры и рН применяли методы, описанные Jamal *et al.* (2015). Фильтрат бактериофагов инкубировали в течение 1 ч в пробирках на водяной бане (GFL, Германия) при температуре 37, 50, 55, 60, 65 и 70 °С. Затем готовили серийные разведения фильтрата бактериофагов от 10^{-2} до 10^{-10} с шагом 10^2 . Титр фага определяли с помощью титрования по Грациа, как описано в пункте 4. Для изучения чувствительности к рН готовили пробирки с мясо-пептонным бульоном (МПБ) (исходный рН 7,2) со значениями рН от 3 до 13. Для получения желаемых значений рН использовали 6 М растворы NaOH и HCl. МПБ фильтровали через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм (MF- Millipore, США; Sartorius, Германия). В пробирки с каждым значением рН добавляли по 1 мл фага и инкубировали в течение 18 ч при +37 °С в инкубаторе (Binder GmbH, Германия). По окончании инкубационного периода проводили мониторинг рН. Такой же период инкубации для определения чувствительности к рН использовали Soleimani Sasanі и Eftekhar (2020). Затем проводили серийные разведения содержимого

пробирок с фагами от 10^{-1} до 10^{-10} и титрование по Грациа, как описано в пункте 4.

2.11 Оценка скорости адсорбции бактериофагов на клетке-хозяине

Клетки из ночной культуры *K. pneumoniae* суспендировали в ВНИ бульоне до 10^9 КОЕ/мл. 5 мл бактериальной суспензии и суспензию фагов в конечной концентрации 10^7 БОЕ/мл инкубировали в 45 мл бульона ВНИ в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) при $+37$ °C и 100 об/мин в течение 5 мин. После этого надосадочную жидкость фильтровали через фильтр с порами 0,22 мкм (MF-Millipore, США; Sartorius, Германия) и проводили подсчет свободных фагов с помощью титрации по Грациа, описанной в пункте 4. Уменьшение титра фагов отражало количество частиц, адсорбированных на бактериальных клетках. В качестве контроля использовали фильтрат бактериофагов. Снижение титра в контроле не наблюдали. Константу адсорбции рассчитывали по следующей формуле:

$$k = \left(\frac{-1}{Bt} \right) \times \ln \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

P – концентрация свободного фага в расчете на мл

P_0 – исходная концентрация фага

B – исходная концентрация бактерий

k – константа скорости адсорбции (мл/мин)

t – время (мин)

2.12 Единичный цикл размножения бактериофагов на клетке-хозяине

В пробирку добавляли 1 мл ВНИ бульона, суспензию клеток до конечной концентрации 10^9 КОЕ/мл и фильтрат бактериофага до конечной концентрации 10^7 БОЕ/мл. Инкубировали смесь при $+37$ °C в течение 8 мин в термостате (Binder GmbH, Германия), затем центрифугировали в течение 2 мин при 4800 g на центрифуге 5424 (Eppendorf, Германия). Удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 100 мл ВНИ бульона. Отбирали 0,5 мл из полученной суспензии и титровали по Грациа, как описано в пункте 4. Затем инкубировали

суспензию при +37 °С и 100 об/мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия). Аликвоты по 0,5 мл отбирали через каждые 5 мин в течение 80 мин и титровали по Грациа, как описано в пункте 4. Латентный период определяли как интервал между адсорбцией фага на клетке-хозяине и высвобождением новых фаговых частиц. Выход фага рассчитывали как отношение конечного количества высвобожденных фаговых частиц к количеству инфицированных бактериальных клеток в течение латентного периода.

2.13 Размножение бактериофагов в жидкой питательной среде и последующая оценка их титра

Клетки из ночной культуры суспендировали в ВНИ бульоне до 10^9 КОЕ/мл. Смешивали 5 мл культуры клеток *K. pneumoniae* с титром 10^9 КОЕ/мл, 45 мл ВНИ бульона и фильтрат бактериофагов до конечной концентрации 10^6 БОЕ/мл. Инкубировали смесь при +37 °С и 100 об/мин в шейкере-инкубаторе ES-20/60 (Biosan, Латвия) в течение 18 ч. В качестве контроля в одну колбу с культурой клеток *K. pneumoniae* не добавляли фаг. После этого оценивали титр фага в экспериментальной системе с помощью титрования по Грациа, описанного в пункте 4. Чашки инкубировали 24 ч при +37 °С в термостате (Binder GmbH, Германия). После инкубации оценивали титр фага.

2.14 Выделение и рестрикционный анализ фаговой ДНК

Геномную ДНК фага выделяли из фильтратов бактериофагов с высоким титром, очищенных в градиенте плотности CsCl. К 0,45 мл фильтрата бактериофага добавляли раствор этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) до конечной концентрации 25 мМ. Затем добавляли протеиназу К в конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубировали при +50 °С в течение 2 ч. После этого добавляли додецилсульфат натрия (SDS) до 0,5% и инкубировали при +55 °С в течение 2 ч. Далее смесь прогревали в течение 20 мин при +65 °С для инактивации ферментов. Затем проводили двукратную экстракцию хлороформом. К водной фазе добавляли 0,5 мл изопропилового спирта, после чего ДНК экстрагировали на стеклянную палочку. После трехкратной промывки

в 70% растворе этилового спирта ДНК высушивали в течение 5 мин на воздухе, а затем растворяли в 0,4 мл ТЕ-буфера (pH 8,0). Количество и качество выделенной ДНК контролировали путем анализа на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (ThermoFisher, США).

2.15 Рестрикционный анализ ДНК бактериофагов

Для проведения рестрикционного анализа использовали ферменты и буферы Thermo Scientific. Гидролиз фаговой ДНК рестриктазами проводили согласно протоколу производителя в течение 90 мин при +37 °С (при +30 °С для SmaI) в соответствующих для рестриктазы буфере и условиях (в 50 мкл реакции: 5 единиц фермента, 1 мкг ДНК, доводили объем дистиллированной водой). Применялись следующие эндонуклеазы рестрикции: HindIII, HinfI, HaeIII, SspI, BamHI, EcoRV, NotI, EcoRI, KpnI, MspI, VspI, NdeI, BgII, BgIII, PvuI, SmaI. Для анализа результатов проводили электрофорез в 1% агарозном геле при 180-200 В в течение 1 ч при комнатной температуре на приборе Sub-cell Model 92 Cell (Bio-Rad, США). В лунки добавляли по 15-20 мкл (по 1-2 мкл буфера для нанесения на 5 мкл реакции). В качестве маркеров использовали ДНК бактериофага лямбда, обработанную эндонуклеазой HindIII (Lambda DNA/HindIII Marker, Thermo Scientific, США). Визуализацию результатов проводили после окрашивания агарозных гелей в течение 20 мин в растворе бромистого этидия (1мкг/мл). Для документирования полученных результатов использовали систему DOCPRINT (Vilber Lourmat, Франция). Полученные рестрикционные профили сравнивали с предсказанными *in silico* с помощью программы RestrictionMapper (restrictionmapper.org).

2.16 Секвенирование, сборка и аннотация геномов бактериофагов

Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов проводили в научно-исследовательском институте медицины труда РАМН. Библиотеку ДНК создавали с помощью набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina, США) и секвенировали на секвенаторе Illumina HiSeq T1500 (Illumina, США) согласно рекомендациям производителя, в результате чего получили около 1

миллиона 2×250 парных чтений. Контроль качества и первичную обработку проводили с использованием FASTQC и trimmomatic (с параметрами HEADCROP:20, SLIDINGWINDOW:3:24, MINLEN:200, CROP:200) (Bolger *et al.*, 2014). Нормализовали покрытие до x50 при помощи программы BBNorm (Bbtools, <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>). Сборку *de novo* выполняли с помощью ассемблера MIRA версии 4.9.6 (Chevreux, 2010). Полноту контигов подтверждали сравнением с близкородственными геномами, имеющими известную полноту сборки. Поиск открытых рамок считывания проводили с помощью программы MetaProdigal 2.6 (Hyatt *et al.*, 2012). Аннотацию проводили с использованием всех прорецензированных фаговых и бактериальных белков из UniProt (<https://www.uniprot.org>) и всех белков из баз данных детерминант антимикробной резистентности и факторов вирулентности бактерий: VFDB (Chen *et al.*, 2015), CARD (McArthur *et al.*, 2013), ARG-ANNOT (Gupta *et al.*, 2014) и Resfinder (Zankari *et al.*, 2012). Оставшиеся открытые рамки считывания аннотировали с помощью программы hmmscan (минимальное значение e-value 0.001) (Eddy, 2011), используя все бактериальные HMM профили из базы данных Pfam (<https://pfam.xfam.org>). тРНК аннотировали с помощью tRNAscan-SE 2.0 (Lowe and Chan, 2016). Все анализы, кроме специально отмеченных, проводили с использованием стандартных параметров. Использовали BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) для поиска сходства с другими бактериофагами, а также для расчета покрытия и средней нуклеотидной идентичности. Полные последовательности геномов фагов *K. pneumoniae* vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14 и vB_KpnS_FZ41 депонировали в GenBank под регистрационными номерами MK521904, MK521905, MK521906 и MK521907, соответственно. Исходные прочтения Illumina доступны в NCBI SRA под номерами доступа SRR10037530, SRR10037529, SRR10037528 и SRR10037527, соответственно. Номер доступа BioProject - PRJNA562287. Для визуализации полного генома использовали программу GenomeVx (Conant and Wolfe, 2008). Таксономическую

идентификацию проводили в GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) на основе схемы филогенетической классификации, используемой в базе данных NCBI Taxonomy Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

2.17 Воздействие коктейлем бактериофагов на клетки *Klebsiella pneumoniae* в режиме реального времени

Клетки из ночной культуры *K. pneumoniae* K1 315 суспендировали в ВНИ бульоне до 10^9 КОЕ/мл, 1 мл суспензии добавляли в чашку Петри со стеклянным дном и инкубировали в камере микроскопа 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария) в течение 1 ч 40 мин при 37 °С в аэробных условиях. Затем в чашку Петри добавляли коктейль бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 до конечной концентрации 10^9 БОЕ/мл. Смесь инкубировали в течение 3 ч 10 мин. В течение всего периода инкубации проводили видеосъемку роста и лизиса бактериальной культуры с помощью микроскопа 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария).

2.18 Воздействие коктейлем бактериофагов на биопленки *Klebsiella pneumoniae*

Для формирования биопленки использовали ночную культуру *K. pneumoniae* K1 315, выращенную на агаре Brain Heart Infusion (ВНИ) (HiMedia, Индия). Суспензию бактерий в концентрации 10^5 КОЕ/мл в объеме 5 мл встряхивали на вортекс-миксере Misrospin FV-2400 (Biosan, Латвия) и добавляли в чашки Петри с 20 мл бульона ВНИ (HiMedia, Индия). Стерильные стеклянные предметные стекла помещали на дно чашек Петри, затем стерильные обезжиренные покровные стекла помещали поверх предметных стекол и инкубировали в термостате (Binder GmbH, Германия) в течение 24-72 ч при 37 °С. После 24 ч инкубации добавляли 0,1 мл коктейля бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 с концентрацией 10^7 БОЕ/мл каждого фага и инкубировали в термостате (Binder GmbH, Германия) в течение 24–48 ч при 37 °С. Контрольные стекла инкубировали без добавления бактериофагов. Для визуализации под оптическим микроскопом покровные стекла снимали

пинцетом и помещали в чашки Петри с бумажными фильтрами на дне, не допуская высушивания препарата. Для сохранения естественной формы биопленок образцы фиксировали парами 25%-ного глутарового альдегида в течение 3 ч. После фиксации образцы окрашивали DAPI (Sigma-Aldrich, США). Образование и разрушение биопленок под воздействием бактериофагов оценивали с помощью светового микроскопа AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия). Для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) образцы фиксировали 2,5% глутаральдегидом в течение 60 мин, затем обезвоживали в градуированной серии этанола (30, 50, 70, 80 и 96%) и помещали в ацетон. Образцы высушивали в аппарате для сушки объектов в критической точке HCP-2 (Hitachi Ltd., Япония) и покрывали Au-Pd в ионной установке IB-3 (Eiko Engineering Co., Япония). Образцы визуализировали в сканирующем электронном микроскопе Camscan-S2 (Cambridge, Великобритания).

2.19 Внедрение в медицинскую практику

Совместно с федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии» (ФНКЦ РР) разрабатывали протоколы исследований применения бактериофагов для преодоления антибиотикорезистентности в условиях реанимационных и реабилитационных отделений, протоколы основывали на технологии адаптивной фаготерапии, которая предполагает адаптацию комплекса бактериофагов для конкретного лечебного учреждения и/или отделения на основе актуальной коллекции госпитальных штаммов бактерий, выделенных из биоматериала пациентов этого же учреждения/отделения.

Для лечения и профилактики рецидивов нозокомиальной пневмонии (НП) применяли базовый комплекс бактериофагов (БКБ), разработанный в НПЦ «Микромир», включающий бактериофаги, активные в отношении бактерий основных возбудителей бактериальной инфекции дыхательных путей, таких как *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter*

kobei, *Enterococcus faecium*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae*, *Cutibacterium acnes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus pyogenes*. В качестве активных в отношении *K. pneumoniae* в том числе использовали фаги vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14. БКБ разработан в НПЦ «Микромир» на основании данных, полученных в результате микробиологических исследований клинических образцов от больных с НП. Комплекс содержит от 3 до 4 вирулентных бактериофагов к каждому из 14 вышеперечисленных возбудителей НП.

Для адаптации базового комплекса под конкретное учреждение использовали чистые культуры микроорганизмов, выделенные из биоматериала пациентов данного учреждения (66 госпитальных антибиотикорезистентных штаммов, выделенных от 40 реанимационных пациентов ФНКЦ РР). Для проверки активности фагов использовали метод спот-тестирования. Осуществляли актуализацию состава базового комплекса, при большом проценте не чувствительных к нему культур, за счет добавления бактериофагов из музея НПЦ «Микромир».

Адаптированный на основании проведенных микробиологических исследований комплекс бактериофагов (АКБ), содержащий в том числе бактериофаги vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, передавали в лечебное учреждение. Комплекс бактериофагов поставляли в виде раствора для ингаляций. Состав 1 флакона содержал: действующее вещество – смесь стерильных очищенных фильтратов фаголизатов в концентрации по Грация 1×10^4 – $9,9 \times 10^7$ БОЕ/мл, вспомогательное вещество – физиологический раствор до 5 мл, в виде прозрачной, бесцветной жидкости, свободной от суспендированных частиц.

АКБ использовали в проспективном нерандомизированном открытом параллельном исследовании на базе отделений реанимации и интенсивной терапии ФНКЦ РР (пункт 21).

2.20 Адаптивная фаготерапия пациентов с рецидивирующими пневмониями

Вид клинического исследования: проспективное нерандомизированное открытое параллельное исследование.

Место проведения исследования: отделения реанимации и интенсивной терапии ФНКЦ РР, в которых проходит лечение пациентов с тяжелым повреждением головного мозга, преимущественно с последствиями острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК), черепно-мозговой травмы (ЧМТ), хирургического лечения опухолей головного мозга, аноксии и др. В данное исследование включали пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии, переведенных из реанимационных отделений других лечебных учреждений в ФНКЦ РР для продолжения интенсивной терапии.

Протокол исследования был рассмотрен и утвержден Локальным этическим комитетом ФНКЦ РР №4/20 от 22.09.2020.

Группы пациентов. В соответствии с Протоколом, в исследование проспективно включали взрослых пациентов, поступавших в ФНКЦ РР, при соответствии критериям включения:

1. Возраст пациента >18 лет.
2. Хроническое критическое состояние, лечение в ОРИТ более 2 недель, предшествующая антибиотикотерапия.
3. Перенесенная ранее пневмония с риском рецидива, клинические показания к антимикробной терапии (по данным КТ и др.)
4. Информированное согласие от пациента или ближайших родственников.

Критерии исключения:

1. Низкий шанс на выживание, по шкале SAPS II более 65 баллов.
2. Лечение иммуносупрессорами/кортикостероидами.
3. Признаки острой инфекции/сепсиса (критерии Sepsis-3).
4. Уровень прокальцитонина более 2 нг/мл.
5. Кандидемия.

Набор пациентов осуществляли поэтапно. На первом этапе исследования последовательный набор пациентов, соответствующих критериям, осуществляли пассивно, без вмешательства в лечебный процесс, с фиксацией показателей клинико-лабораторного и микробиологического мониторинга в четырех точках (1-й день поступления, 7, 14-й дни и исход к 28 дню).

На втором этапе пациентам, включенным в исследование, дополнительно к традиционной антимикробной терапии, назначали комплекс бактериофагов (оценка безопасности).

На третьем этапе части пациентов при концентрации прокальцитонина не более 0,5 нг/мл назначали только комплекс бактериофагов без применения антибиотиков.

В исследование включили 83 пациента.

Основную группу 1 составили 43 пациента, получавших комплекс бактериофагов ингаляционно по 1 дозе 5 мл 2–3 раза в день, не менее 14 дней. Эту группу разделили на 2 подгруппы: «фаготерапия с антибиотиками» (антибиотики + комплекс бактериофагов, 1А), $n=29$ и «фаготерапия без антибиотиков» (только комплекс бактериофагов, 1Б), $n=14$.

В группу 2 включили пациентов, получавших традиционную антибактериальную терапию, $n=40$.

Пациентам проводили комплекс лечебно-реабилитационных мероприятий: поддержание функций жизненно важных органов и систем, медикаментозную коррекцию уровня сознания, нутриционно-метаболическую терапию, симптоматическое лечение и др. Лечебные и реабилитационные мероприятия проводились специалистами, не владеющими информацией о включении пациентов в данное исследование.

Для анализа результатов компьютерной томографии органов грудной клетки использовали методику автоматического расчета объема поврежденной легочной ткани по типу матового стекла с помощью программного обеспечения «Ground glass» (InfoRad 3.0 DICOM Viewer, Москва, Россия). Проводили

сегментацию правого и левого легких и трахеи с порогом -250HU. Внутри легких выделяли области повреждения с плотностями в пользовательском диапазоне (по умолчанию от -785HU до 150HU). С помощью морфологической операции «закрытие» исключили мелкие сосуды, которые были приняты за повреждение. В ходе исследования пациенты находились под постоянным клинико-лабораторным мониторингом с оценкой объективных показателей состояния сердечно-сосудистой системы, неврологического статуса, функции органов дыхания, печени, почек, степени органной дисфункции по шкале SOFA. В динамике измеряли содержание биомаркеров сыворотки крови (СРБ, PCT). Определение концентраций альбумина, мочевины, креатинина и СРБ проводили на автоматическом биохимическом анализаторе AU 480 (Beckman Coulter, США) с применением оригинальных реагентов. Определение концентрации прокальцитонина осуществляли на иммунологическом анализаторе VIDAS (bioMérieux SA, Франция).

Независимыми врачами лабораторной диагностики проводились микробиологические исследования бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) с применением культуральных и ПЦР-методов. Для микробиологического исследования забирали утреннюю порцию мокроты в стерильные пробирки с соблюдением правил асептики. Временной интервал после последнего введения антибиотиков и забора мокроты составлял 8–12 ч. Транспортировку нативного клинического образца в бактериологическую лабораторию осуществляли незамедлительно. Идентификацию микроорганизмов и определение антибиотикочувствительности проводили на автоматизированной системе BD Phoenix-100 (США).

Для оценки таксономического состава БАЛ использовали набор реагентов для выделения ДНК из клинического материала «РИБО-преп» и наборы реагентов для выявления и количественного определения ДНК *P. aeruginosa*, ДНК энтеробактерий (семейства *Enterobacteriaceae*), стафилококков (*Staphylococcus*

spp.) и стрептококков (*Streptococcus* spp.) (Amlisens, Россия). Измерения проводили на амплификаторе планшетного типа CFX 96 (Bio-Rad; США).

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы Statistica 10.0. Применяли общепринятые математико-статистические методы расчета основных характеристик выборочных распределений. Для оценки характера распределения в совокупности по выборочным данным использовали тест Шапиро–Уилка. Для анализа ненормально распределенных переменных использовали тест Манна–Уитни. Для сравнительного анализа количественных переменных применили критерий Уилкоксона. Для сравнения долей (частот) использовали точный критерий Фишера. Для сравнения долей в разные моменты времени использовали критерий Мак-Нимара. Данные представили в виде медианы ± 25 –75 перцентилей (25–75 IQR). Критический уровень значимости установили на уровне 0,05, при наличии множественных попарных межгрупповых сравнений использовали поправку Бонферрони.

2.21 Применение коктейлей бактериофагов в пост-ковидной реабилитации

В проспективное пилотное исследование включали пациентов с постковидными синдромами ($n = 30$), которые получали комплексную программу реабилитации в Федеральном научно-клиническом центре реаниматологии и реабилитологии с декабря 2021 года по август 2022 года. К участию допускали пациентов, восстановившихся после COVID-19 за 3 и более месяцев до начала исследования, сообщивших об утомляемости на уровне, которого не было до COVID-19, и в остальном здоровых. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией и было одобрено Комитетом по этике ФНКЦ РР, код протокола ПП №4/20 от 22 сентября 2020 г.

Применяли следующие критерии включения:

- Пациенты после перенесенного COVID-19 средней степени тяжести (включая пребывание в отделении интенсивной терапии), выписанные из больницы более 3 месяцев назад;

- Наличие легочных очагов консолидации и фиброза на компьютерной томографии (КТ) грудной клетки (КТ 1-3);
- Оценка реабилитационной маршрутизации – менее 3 баллов;
- Отрицательный результат полимеразной цепной реакции (ПЦР) на SARS-CoV-2.

Критерии исключения:

- Температура выше 38 °С;
- Усиление одышки (более 30/мин);
- Повышение систолического артериального давления выше 180 мм рт. ст. или снижение ниже 90 мм рт. ст.

В исследовании использовали два различных коктейля бактериофагов. Оба коктейля были разработаны в НПЦ «Микромир» и включали фаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14. Коктейль для перорального применения включал 43 фага, активных против клинических штаммов *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kobei*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus succinus*, *Enterococcus faecium* и *Citrobacter freundii*. Препарат состоял из стерильной суспензии фаговых частиц в физиологическом растворе. Титр каждого бактериофага составлял от 10^5 до 10^6 БОЕ/мл. Коктейль для ингаляций включал 45 фагов, активных против клинических штаммов *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozanae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. caprae*, *S. succinus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*. Препарат состоял из стерильной суспензии фаговых частиц в физиологическом растворе. Титр каждого бактериофага составлял от 10^5 до 10^6 БОЕ/мл. Коктейль бактериофагов для перорального применения назначали *per os* 2 раза в день в течение 14 дней, утром и вечером. Количество принимаемой внутрь фаговой суспензии составляло 10

мл. Бактериофаговый коктейль для ингаляций применяли путем вдыхания через ультразвуковой небулайзер 2 раза в день в течение 14 дней, продолжительность каждой ингаляции составляла 15-20 мин, количество вдыхаемой фаговой суспензии - 5 мл.

Один образец кала и один образец венозной крови собирали у каждого испытуемого в день поступления (до начала терапии бактериофагами) и через 14 дней после начала терапии. Образцы кала собирали в одноразовый стерильный контейнер. Контейнеры доставлялись в лабораторию и сразу же проходили процедуру подготовки. Время от сбора образца до его анализа не превышало 12 ч.

Анализировали состав микробиоты кишечника с помощью наборов "Колонофлор-16" (АльфаЛаб, Россия) согласно рекомендациям производителя. Наборы включали реагенты для выделения ДНК, праймеры для ПЦР, специфичные для всей бактериальной ДНК (общая бактериальная масса), и видоспецифичные праймеры для 16 видов микроорганизмов. Измерения проводили с использованием системы детекции ПЦР в реальном времени CFX 96 (Bio-Rad, США).

Для анализа результатов КТ легких использовали метод автоматического расчета объема поврежденной легочной ткани в зависимости от типа матового стекла с помощью программного обеспечения "Ground glass" (InfoRad 3.0 DICOM Viewer, Москва, Россия). Сегментацию правого и левого легкого и трахеи проводили с порогом -250 HU, выявляли участки повреждения внутри легкого с плотностью в пользовательском диапазоне (от -785 HU до 150 HU).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выделение и изучение морфологии бактериофагов

С помощью методик, описанных выше, было выделено 4 бактериофага. Их морфологические особенности были изучены с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (**Рисунок 1**).

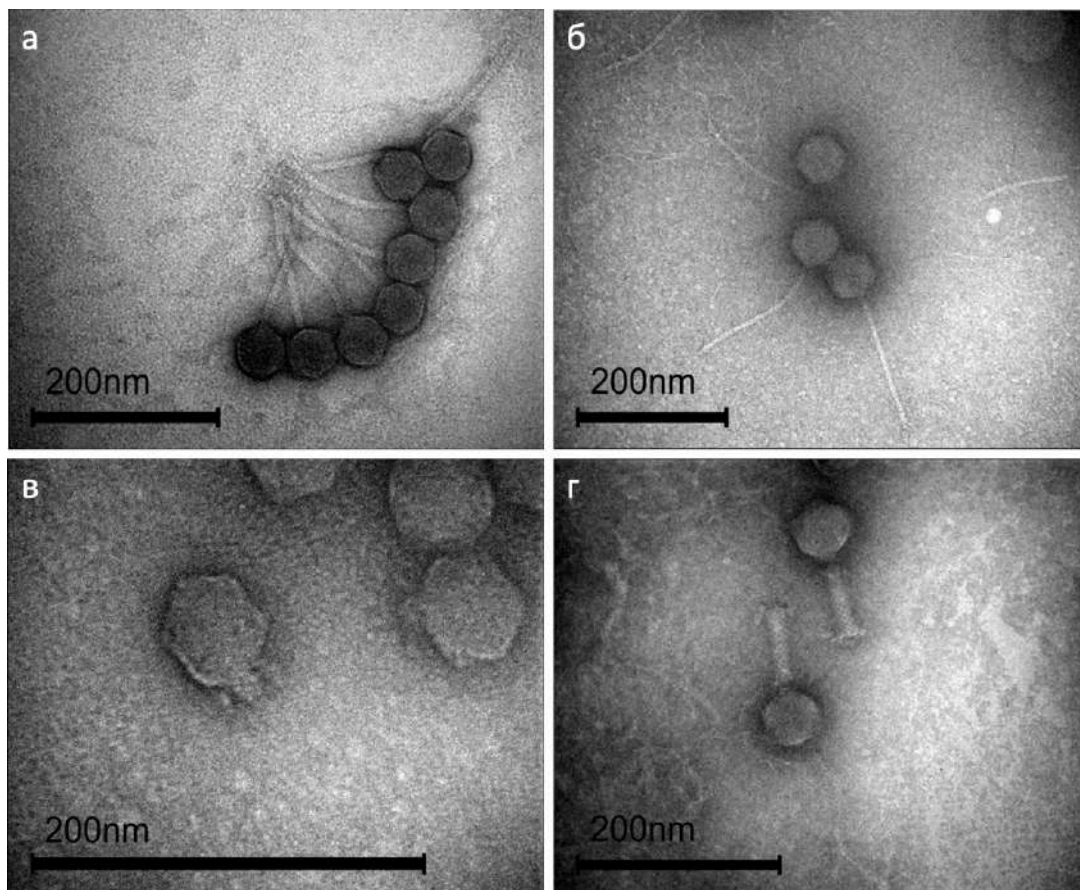


Рисунок 1. Электронные микрофотографии бактериофагов *vB_KpnS_FZ10* (а), *vB_KpnS_FZ41* (б), *vB_KpnP_FZ12* (в) и *vB_KpnM_FZ14* (г). Контрастирование 1% раствором уранилацетата в дистиллированной воде. Увеличение $\times 250k$ для микрофотографии а, $\times 200k$ для б, $\times 600k$ для в и $\times 300k$ для г.

Фаги были названы *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnS_FZ41*, *vB_KpnP_FZ12*, *vB_KpnM_FZ14* в соответствии с предложенной Kropinski *et al.* (2009) системой наименований: *vB_KpnM/S/P_FZno*, где *vB* = bacterial virus (бактериальный вирус); *Kpn* = аббревиатура REBASE для рода/вида бактерии-хозяина (*Klebsiella pneumoniae*); *M* = myovirus (миовирус), *S* = siphovirus (сифовирус), *P* = podovirus (подовирус); *FZno* = имя и номер фага. Бактериофаги *vB_KpnS_FZ10* и *vB_KpnS_FZ41* имеют изометрические капсиды и длинные несокращающиеся

хвосты и могут быть отнесены к сифовирусам (siphovirus) на основании морфологических характеристик. vB_KpnP_FZ12 имеет изометрический капсид и короткий несокращающийся хвост и может быть отнесен к подовирусам (podovirus) на основании морфологических характеристик. vB_KpnM_FZ14 имеет изометрический капсид и длинный сокращающийся хвост и может быть отнесен к миовирусам (myovirus) на основании морфологических характеристик.

Морфологические характеристики и морфология бляшек описаны в **таблице 1**.

Таблица 1. Морфологические характеристики и морфология бляшек выделенных бактериофагов K. pneumoniae.

	Бактериофаг vB_KpnS_FZ10	Бактериофаг vB_KpnS_FZ41	Бактериофаг vB_KpnP_FZ12	Бактериофаг vB_KpnM_FZ14
Морфология	Изометрический капсид, длинный несокращающийся хвост	Изометрический капсид, длинный несокращающийся хвост	Изометрический капсид, короткий несокращающийся хвост	Изометрический капсид, длинный сокращающийся хвост
Средний диаметр головки (\pmCO), нм	61 \pm 2	71 \pm 5	49 \pm 3	55 \pm 3
Длина хвоста (\pmCO), нм	158 \pm 13	227 \pm 25	-	79 \pm 5
Размер прозрачной бляшки, мм	1-2	0,3-0,5	0,7-2	0,7-1,5
Гало	+	-	+	+

Оценка морфологии бляшек показала, что бактериофаг vB_KpnS_FZ41 образует полностью прозрачные зоны лизиса. Все остальные исследованные фаги (vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14) образуют гало. Такие бляшки всегда имели центральную прозрачную часть, а размер гало увеличивался со временем инкубации. Морфология бляшек представлена на **Рисунке 2**.

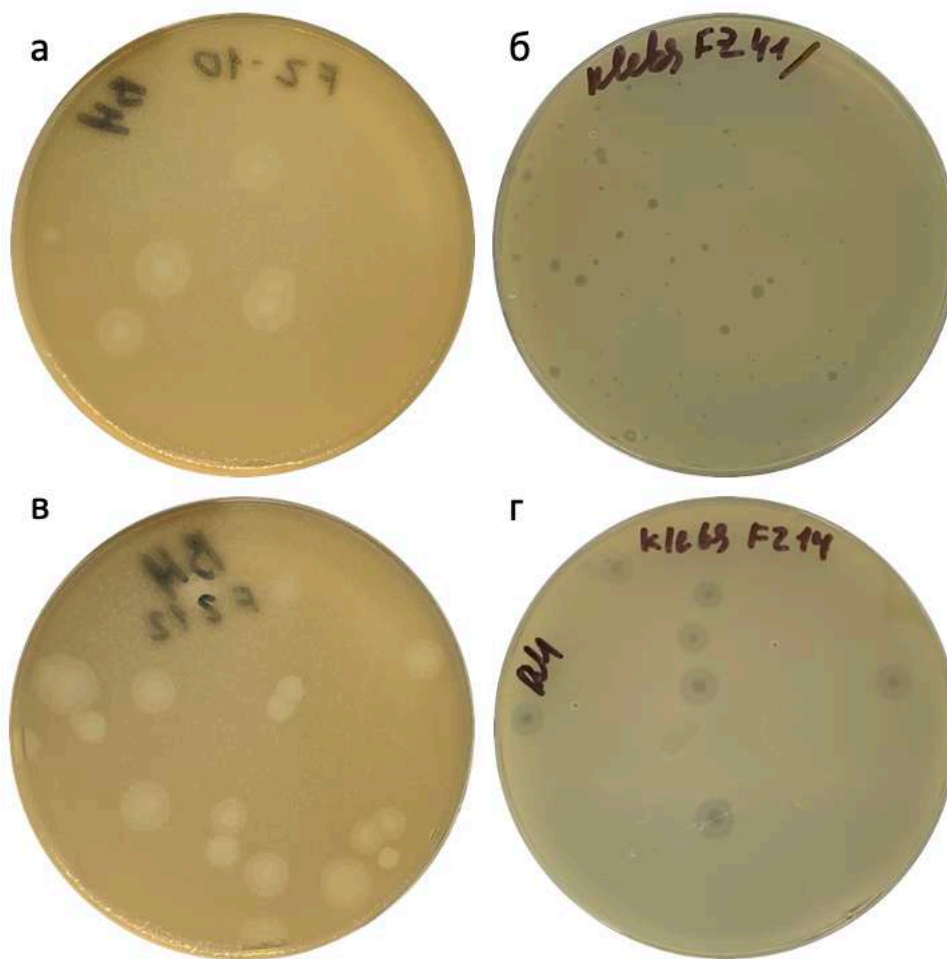


Рисунок 2. Фотографии бляшек, образованных бактериофагами *vB_KpnS_FZ10* (а), *vB_KpnS_FZ41* (б), *vB_KpnP_FZ12* (в) и *vB_KpnM_FZ14* (г). Бактериофаги *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14* образуют бляшки с гало. Бактериофаг *vB_KpnS_FZ41* образует полностью прозрачные зоны лизиса.

Формирование гало часто связывают с действием полисахарид-деполимераз (эндо-гликаногидролаз) (Hughes *et al.*, 1998). Известно, что наличие полисахарид-деградирующих ферментов является благоприятным фактором для фаговой терапии, так как они способствуют разрушению капсул и биопленок (Pires *et al.*, 2016). Их действие облегчает доступ к бактериальным клеткам как бактериофагов, так и клеток иммунной системы, а также лекарственных препаратов (Crisciolo *et al.*, 2017).

3.2 Определение литического спектра бактериофагов

Литическую активность каждого бактериофага исследовали на 14 клинических штаммах *K. pneumoniae*, полученных из различных больниц Московской области, Россия (Таблица 2). Кроме того, была протестирована

литическая активность различных комбинаций фагов. Все тесты проводили в трех повторностях.

Таблица 2. Литические спектры бактериофагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnS_FZ41*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*.

Штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i>	FZ10	FZ41	FZ12	FZ14	Комбинация (Все 4 фага)	Комбинация (FZ10+FZ12+FZ14)	Комбинация (FZ12+FZ41)
К1 А1265	-	-	+	-	+	+	+
К1 43816	+	-	+	+	+	+	+
К1 315	+	-	+	+	+	+	+
К1 3-53	+	-	+	+	+	+	+
К1 610	-	-	+	-	+	+	+
К1 7880	+	-	+	-	+	+	+
К1 327	+	-	+	-	+	+	+
К1 12-1	+	+	+	-	+	+	+
К1 27-89	-	+	-	-	+	-	+
К1 293	-	+	-	-	+	-	+
К1 263	-	-	+	+	+	+	+
К1 3273	+	-	+	-	+	+	+
К1 Т-14	+	-	-	-	+	+	-
К1 325	-	+	-	-	+	-	+
Всего «+»	8/14	4/14	10/14	4/14	14/14	11/14	13/14

" + " означает наличие чувствительности бактериального штамма к действию бактериофага. "-" указывает на отсутствие чувствительности бактериального штамма к действию бактериофага. Идентичные результаты были получены в 3 повторностях.

Бактериофаги *vB_KpnS_FZ10* и *vB_KpnP_FZ12* были активны против высокого процента бактериальных штаммов (57% и 71%, соответственно). В то время как литическая активность фагов *vB_KpnS_FZ41* и *vB_KpnM_FZ14* была ниже (по 29%). Бактериофаг *vB_KpnS_FZ41*, который не образует гало, имел значительно отличающийся спектр хозяев от бактериофагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*, образующих гало. Комбинация 4 бактериофагов лизировала все исследованные штаммы *K. pneumoniae*. Кроме того, для подтверждения факта образования пятен лизиса в результате

литического действия бактериофагов было проведено титрование по Грация (Таблица 3).

Таблица 3. Титры бактериофагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnS_FZ41*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*, полученные на различных штаммах *K. pneumoniae*.

Штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i>	FZ10	FZ41	FZ12	FZ14	Комбинация (Все 4 бактериофага)
KI A1265	-	-	3×10^7	-	$3,6 \times 10^6$
KI 43816	1×10^7	-	4×10^7	$4,6 \times 10^8$	2×10^8
KI 315	8×10^6	-	6×10^9	4×10^9	1×10^9
KI 3-53	$5,2 \times 10^6$	-	1×10^8	4×10^8	4×10^8
KI 610	-	-	1×10^7	-	2×10^6
KI 7880	4×10^8	-	8×10^6	-	2×10^8
KI 327	$3,2 \times 10^8$	-	2×10^6	-	1×10^8
KI 12-1	4×10^7	1×10^3	$1,4 \times 10^7$	-	1×10^7
KI 27-89	-	2×10^6	-	-	$1,8 \times 10^6$
KI 293	-	$4,4 \times 10^7$	-	-	4×10^6
KI 263	-	-	6×10^8	1×10^8	1×10^8
KI 3273	4×10^8	-	$2,2 \times 10^8$	-	2×10^7
KI T-14	$3,6 \times 10^8$	-	-	-	4×10^8
KI 325	-	8×10^8	-	-	$2,2 \times 10^8$

Титры оценивались после титрования по Грация. "-" означает отсутствие чувствительности бактериального штамма к действию бактериофага.

Ранее полученные данные по изучению литических спектров 32 бактериофагов *K. pneumoniae* (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013) показали, что фаги морфотипов *Siphoviridae* и *Podoviridae* лизируют от 7 до 15% штаммов, только один фаг (*Podoviridae*) был эффективен против 22% штаммов. Бактериофаги морфотипа *Myoviridae* были активны против 4-22% штаммов *K. pneumoniae*. Бактериофаги *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnS_FZ41*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14* показали сравнительно высокую литическую активность, что подтверждает их потенциал в профилактике и лечении бактериальных инфекций.

3.3 Оценка чувствительности бактериофагов к температуре и pH

Для изучения температурной устойчивости были выбраны следующие значения температур: 25, 40, 45, 50, 55, 60, 65 и 70 °C. Для оценки устойчивости анализировали титр вируса после 1 ч инкубации в Трис-НС1 буфере. Данные представлены на **Рисунке 3**.

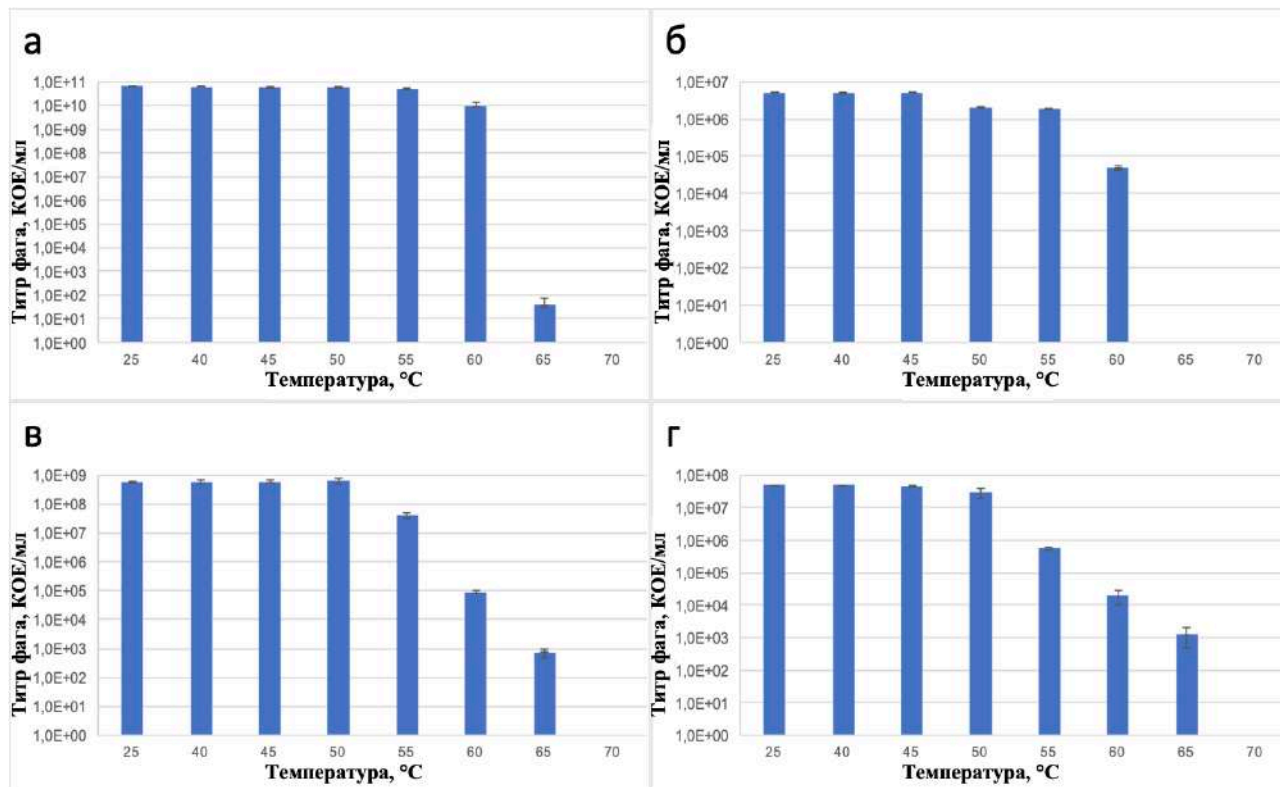


Рисунок 3. Зависимость биологического титра бактериофагов vB_KpnS_FZ10 (а), vB_KpnP_FZ12 (б), vB_KpnM_FZ14 (в) и vB_KpnS_FZ41 (г) от температуры инкубации. Инкубация в течение 1 ч при температурах 37, 50, 55, 60, 65 и 70 °C. Результаты основаны на трех повторениях. Отклонение от среднего значения указано на графике.

При 65 °C наблюдалось значительное снижение титра бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41 и vB_KpnM_FZ14, а фаг vB_KpnP_FZ12 был полностью инактивирован.

Для изучения устойчивости к pH были выбраны следующие значения: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13. Для оценки стабильности титр вируса анализировали после инкубации в течение 18 ч. Все бактериофаги были стабильны после инкубации при значениях pH от 5 до 11. При pH 4 наблюдалось снижение титра бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, а vB_KpnS_FZ41 был полностью инактивирован. При pH 12 наиболее стабильным

оказался νB_KpnP_FZ12 , у фага νB_KpnS_FZ10 было зафиксировано значительное снижение титра, бактериофаги νB_KpnM_FZ14 и νB_KpnS_FZ41 были полностью инактивированы. Данные представлены на **Рисунке 4**.

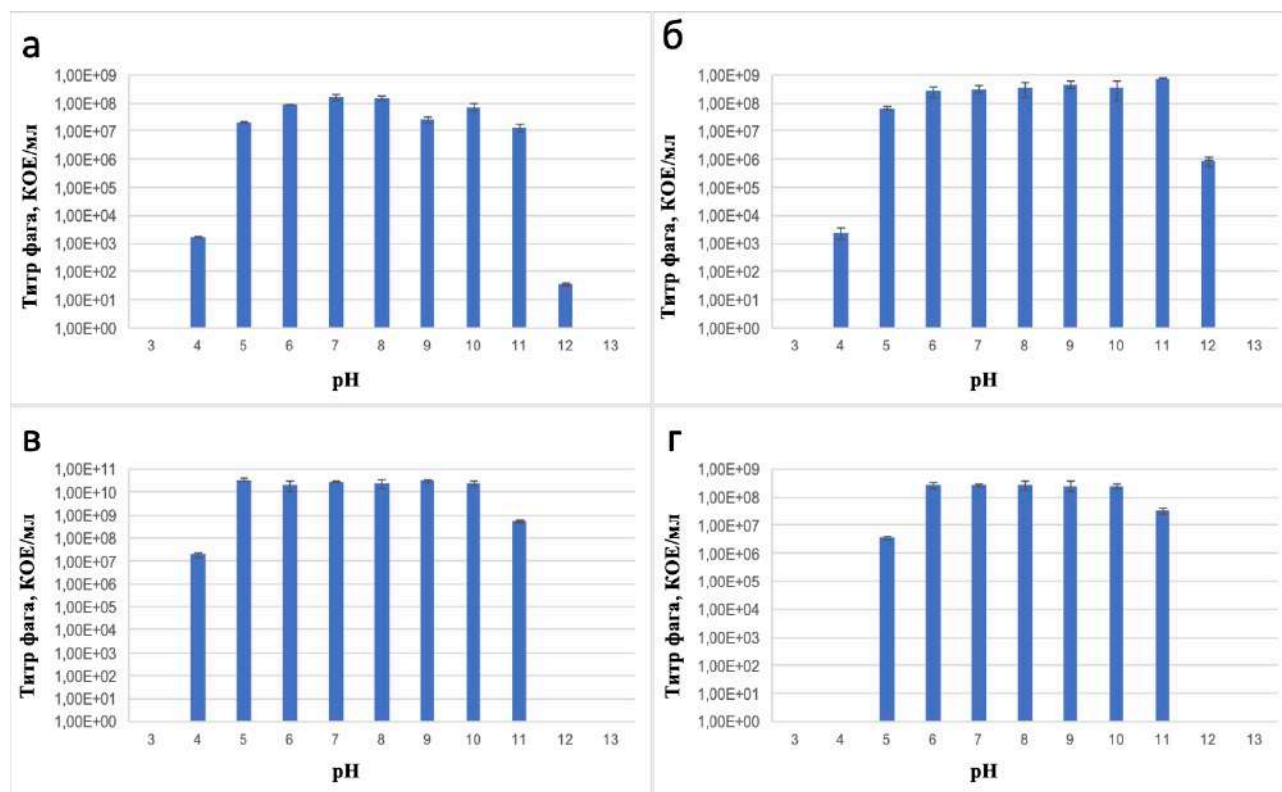


Рисунок 4. Зависимость биологического титра бактериофагов νB_KpnS_FZ10 (а), νB_KpnP_FZ12 (б), νB_KpnM_FZ14 (в) и νB_KpnS_FZ41 (г) от значений pH. Инкубация в течение 18 ч при значениях pH от 3 до 13. Результаты основаны на трех повторениях. Отклонение от среднего значения указано на графике.

Характеристики биофизической стабильности коррелируют с известными опубликованными данными по фагам *K. pneumoniae*, относящимся к сифовирусам, миовирусам и подовирусам (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013; Jamal *et al.*, 2015), а также с более ранними исследованиями Ackermann and Dubow (1987), которые предположили, что большинство фагов способны сохранять свою активность в широком диапазоне pH (5-9) при физиологических условиях, а инактивация при pH 1-3 может быть связана с денатурацией белков вириона в кислых условиях (Hazem, 2002). Кроме того, такой диапазон устойчивости свидетельствует о высокой стабильности всех бактериофагов, что предполагает возможность поддержания титра в условиях хранения и терапевтического

использования как в урогенитальной области, так и для лечения легочных инфекций.

3.4 Оценка скорости адсорбции бактериофагов на клетке-хозяине

В ходе эксперимента было установлено, что за 5 мин на клетках хозяев адсорбируется от 79% (vB_KpnS_FZ41) до 93% (vB_KpnP_FZ12) вирусных частиц в зависимости от фага. На основании полученных данных была посчитана константа адсорбции для каждого бактериофага. Данные представлены в **таблице 4**.

Таблица 4. Зависимость титров бактериофагов, не адсорбированных на клетках K. pneumoniae, от времени инкубации в системе фаг-клетка. Среднее значение (\pm CO) рассчитано по результатам трех повторений. Снижение титра отражало количество фагов, адсорбированных на клетках. Рассчитаны проценты адсорбированных на клетках вирусом и константа адсорбции.

Бактериофаг	Титр бактериофага, БОЕ/мл		% адсорб. фагов	Константа адсорбции, k
	Время инкубации, 0 мин	Время инкубации, 5 min		
vB_KpnS_FZ10	$2,8 \times 10^7 \pm 8,2 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$	89	$4,3 \times 10^{-9}$
vB_KpnS_FZ41	$1,1 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^5$	79	$3,1 \times 10^{-9}$
vB_KpnP_FZ12	$3,9 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6 \pm 1 \times 10^5$	93	$5,3 \times 10^{-9}$
vB_KpnM_FZ14	$2,3 \times 10^7 \pm 2 \times 10^6$	$3 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$	87	4×10^{-9}

Рекомендации по выбору терапевтических фагов указывают, что 70% частиц или более должны адсорбироваться в первые 10 мин, а константа адсорбции должна составлять 10^{-8} - 10^{-9} мл/мин (Bull and Gill, 2014). Константы адсорбции изученных фагов (10^{-9}) подтверждают их перспективность для терапии и профилактики бактериальных инфекций.

3.5 Единичный цикл размножения бактериофагов

На основании дынных единичных циклов размножения бактериофагов были рассчитаны латентный период и размер выхода для каждого фага (**Рисунок 5**).

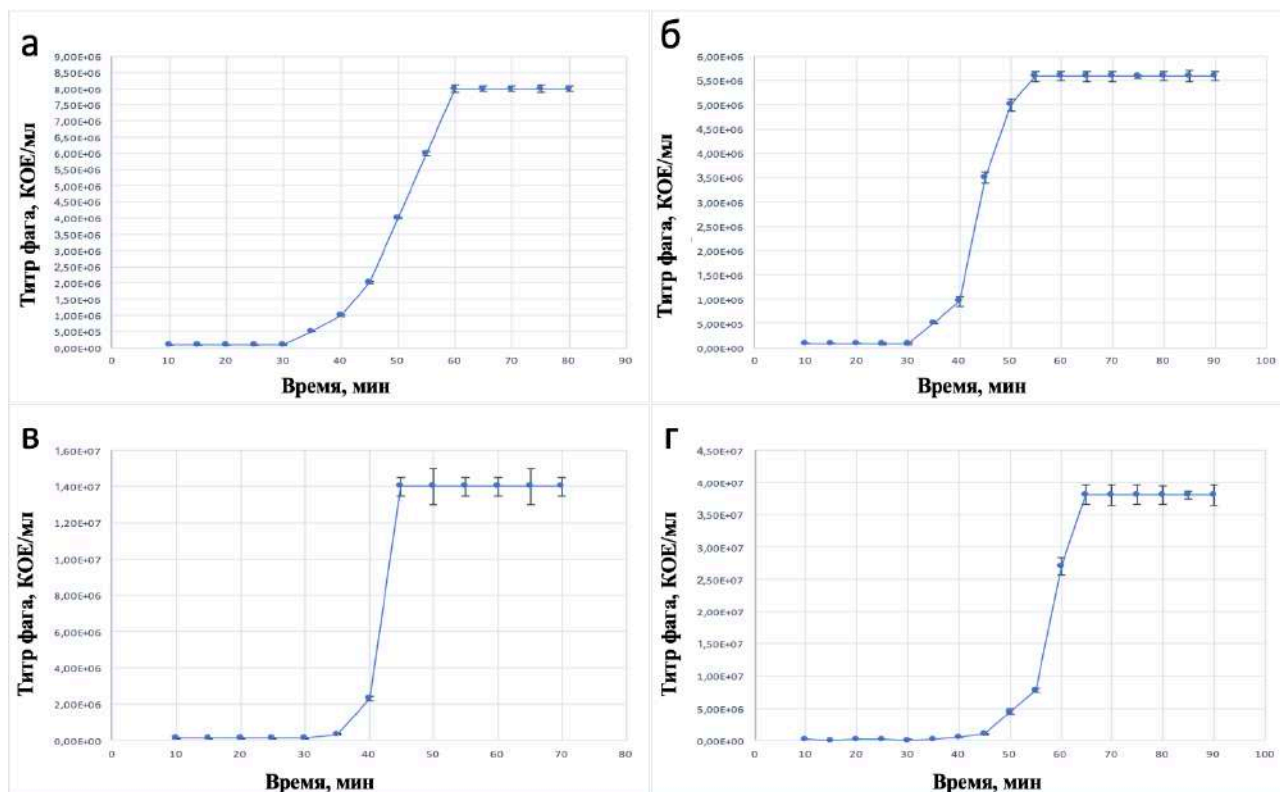


Рисунок 5. Кривые единичного цикла размножения бактериофагов *vB_KpnS_FZ10* (а), *vB_KpnP_FZ12* (б), *vB_KpnM_FZ14* (в) и *vB_KpnS_FZ41* (г). Показана зависимость титра бактериофага от времени инкубации в системе фаг-клетка с клетками *K. pneumoniae*. Результаты основаны на трех повторениях. Отклонение от среднего значения указано на графике.

Латентный период составил 30 мин для фагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*, а для *vB_KpnS_FZ41* - 35 мин. Размер всплеска составил приблизительно 80 частиц на бактериальную клетку для *vB_KpnS_FZ10* (80 ± 2) и *vB_KpnP_FZ12* (80 ± 7) и 120 частиц на бактериальную клетку для *vB_KpnS_FZ41* (118 ± 3) и *vB_KpnM_FZ14* (120 ± 5).

3.6 Оценка частоты генерации фагоустойчивых форм

Частота образования фагоустойчивых форм была исследована для каждого выделенного бактериофага и для комбинации фагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*. В коллекции бактерий НИЦ «Микромир» нет штамма, чувствительного сразу ко всем 4 фагам, поэтому коктейль для определения частоты генерации устойчивых к фагам форм бактерий состоял из 3 бактериофагов. Эксперимент проводился согласно описанной методике в трех

повторностях, частота генерации фагоустойчивых форм подсчитывалась по формуле:

$$F = \frac{n}{N}$$

n – среднее количество резистентных колоний после инкубации, шт

N – изначальная концентрация клеток в суспензии, КОЕ/мл

Были получены следующие данные:

- Бактериофаг vB_KpnS_FZ10 – $F = \frac{8 \pm 3}{2,3 \times 10^7} = (3,5 \pm 1,3) \times 10^{-7} \approx 4 \times 10^{-7}$;
- Бактериофаг vB_KpnS_FZ41 – $F = \frac{90 \pm 16}{10^8} = (9 \pm 1,6) \times 10^{-7} \approx 9 \times 10^{-7}$;
- Бактериофаг vB_KpnP_FZ12 – $F = \frac{50 \pm 10}{10^8} = (5 \pm 1) \times 10^{-7} \approx 5 \times 10^{-7}$;
- Бактериофаг vB_KpnM_FZ14 – $F = \frac{72 \pm 9}{10^8} = (7,2 \pm 0,9) \times 10^{-7} \approx 7 \times 10^{-7}$;
- Комбинация фагов (FZ10 + FZ12 + FZ14) – $F = \frac{0}{10^8} = 0$.

После инкубации с коктейлем из 3 бактериофагов не было обнаружено фагоустойчивых колоний. Таким образом, использование фаговых коктейлей в терапии позволяет не только повысить литическую эффективность препарата, но и значительно снизить риск образования фагорезистентных форм. Фотографии фагоустойчивых колоний, образовавшихся после инкубации с одиночными фагами и с коктейлем из 3 бактериофагов, представлены на **Рисунке 6**.

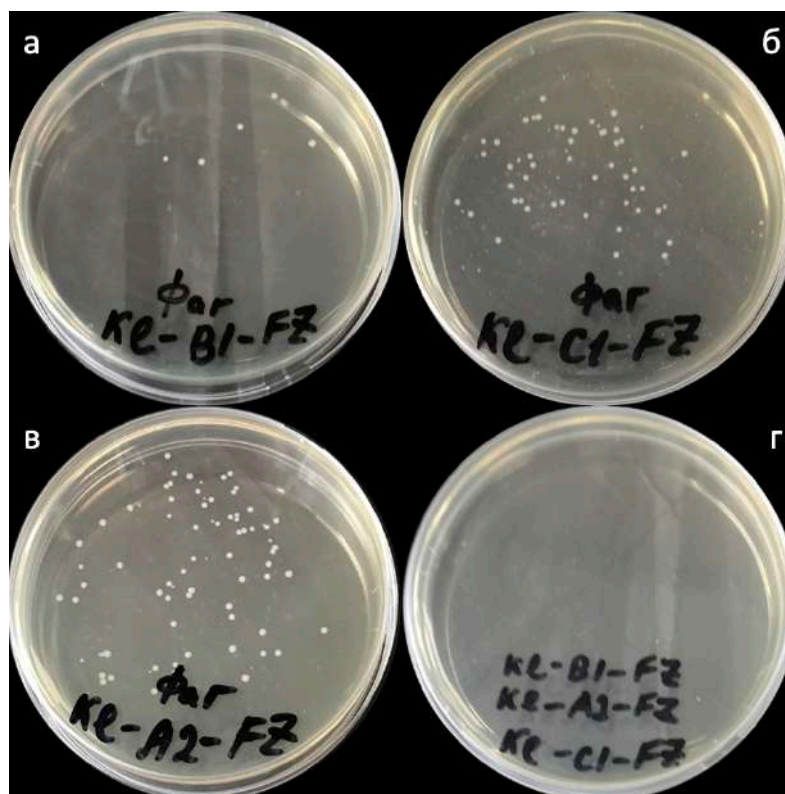


Рисунок 6. Фотографии устойчивых к фагам колоний *K. pneumoniae*, образовавшихся после инкубации с бактериофагами νB_{KpnS_FZ10} (а), νB_{KpnP_FZ12} (б), νB_{KpnM_FZ14} (в) и коктейлем из 3 фагов (г). Колонии *K. pneumoniae*, устойчивые к фагу, образовались после инкубации с одиночными фагами. После инкубации с коктейлем из всех 3 бактериофагов фагорезистентных колоний не наблюдалось. Идентичные результаты были получены в 3 повторениях.

Спот-тестирование обработанных хлороформом суспензий фагоустойчивых колоний не выявило присутствия профагов. Более того, в результате анализа обработанного митомицином С материала из полученных фагоустойчивых колоний на ТЭМ фаги не были обнаружены. Таким образом, в данных экспериментальных условиях не удалось индуцировать профаги из фагоустойчивой культуры *K. pneumoniae*. Чтобы исключить возможные предположения об умеренной природе изученных бактериофагов, их геномы были секвенированы.

3.7 Размножение фагов в жидкой питательной среде и последующая оценка титра бактериофагов.

Спустя 18 ч инкубации наблюдалось помутнение питательной среды в колбе с культурой клеток *K. pneumoniae*. Среда в колбах с добавлением фагов оставалась прозрачной. Концентрация наработанных фагов составила:

Средняя концентрация (\pm СО) размноженных бактериофагов по данным 3 титрований методом Грация составила:

- Бактериофаг vB_KpnS_FZ10 – $2,5 \times 10^{10} \pm 3,3 \times 10^9$ БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB_KpnS_FZ41 – $2,5 \times 10^9 \pm 4,2 \times 10^8$ БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB_KpnP_FZ12 – $5 \times 10^9 \pm 1,6 \times 10^9$ БОЕ/мл;
- Бактериофаг vB_KpnM_FZ14 – $9 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ БОЕ/мл.

Полученные титры при выращивании фагов в жидкой питательной среде позволяют сделать вывод, что исследованные значения константы адсорбции, латентного периода и выхода фага обеспечивают эффективное ингибирование роста культуры *K. pneumoniae* и свидетельствуют о достаточной продуктивности вирусов для получения высоких концентраций в конечном препарате.

3.8 Рестрикционный анализ ДНК бактериофагов

ДНК фага vB_KpnS_FZ10 гидролизуется ферментами рестрикции *HaeIII*, *SspI*, *VamHI*, *EcoRV*, *EcoRI* и не чувствительна к ферментам рестрикции *HindIII*, *SmaI*, *NotI* и *KpnI*. Для рестриктазы *NotI* *in silico* был предсказан один сайт разрезания в геноме, однако фаговая ДНК оказалась нечувствительна к данному ферменту. Для остальных ферментов рестрикции полученные результаты совпадают с предсказанными. Таким образом, можно сделать вывод, что бактериофаг vB_KpnS_FZ10 адаптирован к системам рестрикции-модификации бактерий-хозяев.

ДНК фага vB_KpnS_FZ41 гидролизуется ферментами рестрикции *EcoRI* (O), *VspI*, *NdeI*, *BglII*, *BglIII*, *EcoRV*, *PvuI*, *KpnI*, *EcoRI* (RI), *HinfI*, *VamHI* и не чувствительна к ферменту рестрикции *MspI*. Для рестриктазы *MspI* *in silico* было

предсказано 313 сайтов разрезания в геноме, однако фаговая ДНК оказалась нечувствительна к данному ферменту. Для остальных рестрикционных ферментов полученные результаты соответствуют предсказанным.

Бактериофаг vB_KpnP_FZ12 также представляет собой пример адаптации к системам рестрикции-модификации хозяина путем потери сайтов рестрикции. ДНК фага vB_KpnP_FZ12 гидролизуется ферментами рестрикции HinfI, EcoRV, MspI, KpnI и не чувствительна к ферментам рестрикции HindIII, SspI, BamHI и EcoRI. Профиль рестрикции полностью соответствует предсказанному *in silico*.

ДНК фага vB_KpnM_FZ14 гидролизуется ферментами рестрикции HindIII, EcoRV, EcoRI, SmaI, SalI, BamHI, KpnI, DraI, HinfI, MspI и не чувствительна к ферменту рестрикции NdeI. Для рестриктазы NdeI *in silico* было предсказано 9 сайтов разрезания в геноме, однако фаговая ДНК оказалась нечувствительна к данному ферменту. Для остальных ферментов рестрикции полученные результаты совпадают с предсказанными.

Результаты представлены на **Рисунке 7**.

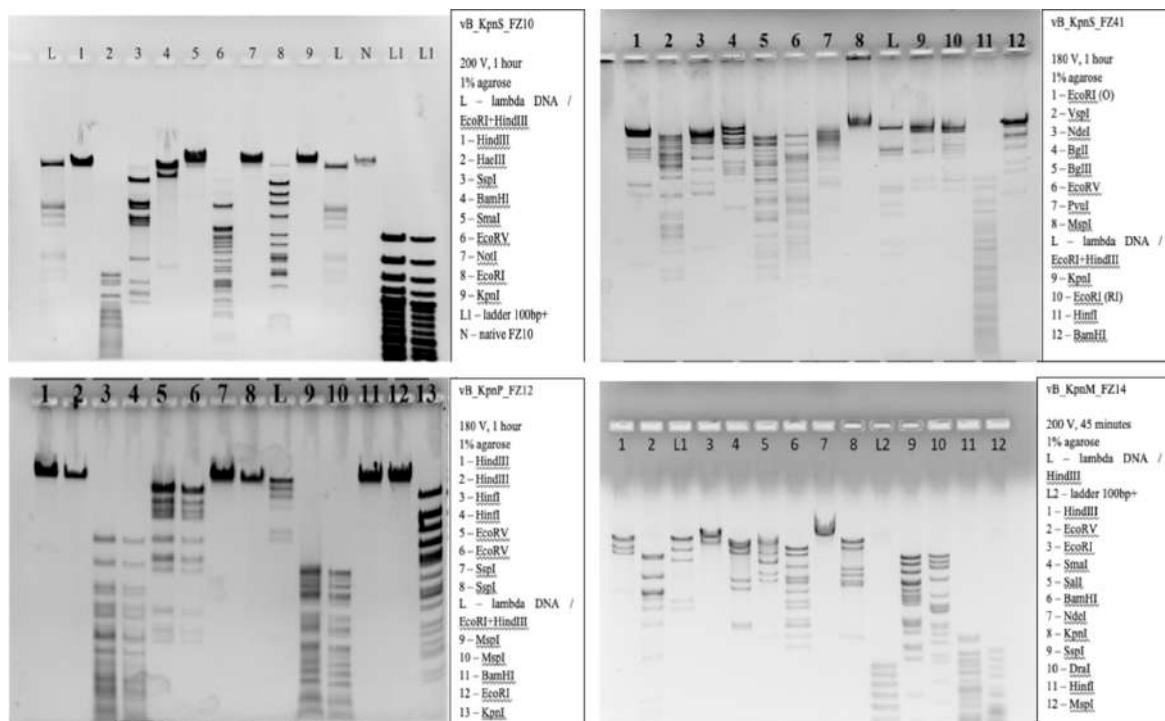


Рисунок 7. Электрофорез ДНК бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 после обработки ферментами рестрикции. Ферменты, маркеры и параметры электрофореза указаны в приложениях к рисункам.

Отличия полученных рестрикционных профилей от предсказанных *in silico* нельзя объяснить недостаточным качеством использованных ферментов, поскольку они действовали на геномы остальных бактериофагов. Ферменты рестрикции также устойчивы к Dam и Dcm метилированию, поэтому отсутствие разрезания не может быть связано с действием аденин/цитозин метилтрансфераз, однако геномы фагов характеризуются рядом модификаций помимо Dam и Dcm метилирования (Weigele and Raleigh, 2016), поэтому отклонение от предсказанных профилей рестрикции может быть связано с модификацией оснований.

3.9 Полногеномное секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности ДНК бактериофагов

Все бактериофаги содержат линейную двухцепочечную ДНК. Согласно полученным геномным данным, выделенные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности. Установлено, что бактериофаг vB_KpnS_FZ10 кодирует собственную аденин-метилтрансферазу (QCG76428.1) и цитозин-метилтрансферазу (QCG76436.1), что является способом защиты от систем рестрикции-модификации хозяина. Аналогичными свойствами обладает бактериофаг KP36 (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013). Данные секвенирования показали, что фаги vB_KpnS_FZ10 (MK521904) и KP36 (JF501022) имеют высокий уровень гомологии и, вероятно, принадлежат к одному роду *Webervirus*. Бактериофаги vB_KpnP_FZ12 (MK521905) и KP32 (GQ413937) (Kęsik-Szeloch *et al.*, 2013) также обладают не только схожими профилями рестрикции, но имеют высокий уровень гомологии и принадлежат к одному роду *Pzondovirus*. В ходе аннотации было обнаружено, что бактериофаг vB_KpnS_FZ41 кодирует собственные тРНК (всего предсказано 25 тРНК). Было показано, что некоторые фаги с достаточно большой кодирующей емкостью могут использовать собственные тРНК для кодонов, которые гораздо чаще встречаются в их геноме, чем в геноме бактерии-хозяина (Bailly-Bechet *et al.*, 2007).

Бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы, которые участвуют в разрушении биопленок и капсул. Поиск гомологии кодируемых белков с изученными полисахарид-деполимеразами родственных фагов показал, что ORFs (открытые рамки считывания) №14 (QCG76410.1) и №15 (QCG76411.1) vB_KpnS_FZ10 гомологичны ORFs №34 и №35 бактериофага KLPN1 (NC_028760), белковые продукты которого (хвостовые белки) имеют эндосиалидазный домен и, как было подтверждено в проведенном исследовании, обладают полисахарид-деградирующей активностью (Hoyles *et al.*, 2015). ORF №19 (QCG76457.1) vB_KpnP_FZ12 гомологичен ORF №31 (YP_003347549.1) бактериофага KP32 (NC_013647), белковый продукт которого (хвостовой тубулярный белок А) имеет домен гидролазы пептидогликана и, как было подтверждено в проведенном исследовании, обладают полисахарид-деградирующей активностью (Pyra *et al.*, 2017). ORF №8 (QCO71663.1) vB_KpnM_FZ14 гомологичен ORFs №42 (YP_009597570.1; YP_009615313.1) бактериофагов KpV52 (NC_041900), KpV79 (NC_042041), белковый продукт которых (предполагаемый белок семейства хвостовых фибрилл) имеет домен гиалуронат-лиазы и пектат-лиазы 3 и обладает деградирующей полисахаридами активностью (Соловьева, 2018). Таким образом, результаты аннотации геномов бактериофагов подтвердили связь действия полисахаридных деполимераз с образованием гало, что также было описано во многих работах (Hsu *et al.*, 2013; Hoyles *et al.*, 2015; Pyra *et al.*, 2017; Tabassum *et al.*, 2018). Бактериофаг vB_KpnS_FZ41, который не кодирует каких-либо полисахарид-деполимераз, имел значительно отличающийся спектр хозяев от бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, кодирующих деполимеразы полисахаридов. Эти данные показывают, что в коктейли бактериофагов следует включать фаги как с присутствием, так и без присутствия полисахарид-деградирующих ферментов, поскольку это может расширить их литический спектр и повысить эффективность терапевтических фаговых коктейлей.

Выравнивание последовательностей всех перечисленных белков было проведено с помощью BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Результаты представлены на **Рисунке 8**.



Рисунок 8. Выравнивание последовательностей полисахарид-деполимераз бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 с деполимеразами родственных фагов. Выравнивание с последовательностями изученных белков с подтвержденной полисахарид-деградирующей активностью проводили с помощью BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). ORFs №14 (QCG76410.1) и №15 (QCG76411.1) vB_KpnS_FZ10 были выровнены с ORFs №34 и №35 бактериофага KLPN1 (NC_028760). ORF №19 (QCG76457.1) vB_KpnP_FZ12 выровнена с ORF №31 (YP_003347549.1) бактериофага KP32 (NC_013647). ORF №8 (QCO71663.1) vB_KpnM_FZ14 выровнена с ORFs №42 (YP_009597570.1; YP_009615313.1) бактериофагов KpV52 (NC_041900), KpV79 (NC_042041).

Исходя из различий в морфологии и литических спектрах, можно предположить, что все фаги имеют сродство к различным поверхностным структурам на бактерии-хозяине. Белки хвостовых фибрилл всех изученных в данной работе вирусов отличаются по своей укладке и доменной структуре, что было установлено при анализе гомологов структурных белков из базы UniProt (vB_KpnS_FZ10-A0A4D6T3L6; vB_KpnP_FZ12-A0A4D6T3P7; vB_KpnM_FZ14-A0A4D8SZG4; vB_KpnS_FZ41-A0A4D6T3Y8).

Подробная информация о полученных геномных данных представлена в **таблице 5**.

Таблица 5. Геномные данные бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14 и vB_KpnS_FZ41.

Бактериофаг	Размер генома, по	Г-Ц состав, %	Покрытие	ORFs №	Таксономическое положение (Семейство, род)	Родственный вирус	Идентичность и покрытие
vB_KpnS_FZ10	50381	50,66	65,38	42	<i>Drexlerviridae, Webervirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage NJR15, (MH633487)	96,71% (94% покрытие)
vB_KpnP_FZ12	39519	53,06	71,03	43	<i>Autographiviridae, Przondovirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnP_KpV763 (KX591654)	94,43% (93% покрытие)
vB_KpnM_FZ14	49370	48,58	71,60	35	<i>Caudoviricetes, Jedunavirus</i>	<i>Klebsiella</i> phage vB_KpnM_KpV52 (KX237516)	96,58% (79% покрытие)
vB_KpnS_FZ41	106104	45,22	72,25	103	<i>Demereviridae, Sugarlandvirus</i>	<i>Klebsiella</i> phages vB_Kpn_IME260 and Sugarland (KX845404, NC_042093)	96,77% и 97,52% (93% и 89% покрытие)

"родственный вирус" означает лучшее совпадение по NCBI BLAST, средняя идентичность и покрытие рассчитывались с помощью BLASTn.

BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) использовался для расчета средней идентичности и покрытия. Таксономическую идентификацию проводили с помощью программы GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) на основе схемы филогенетической классификации, используемой в базе данных NCBI Taxonomy Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

На основании полученных данных были построены карты геномов бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 (Рисунок 9).

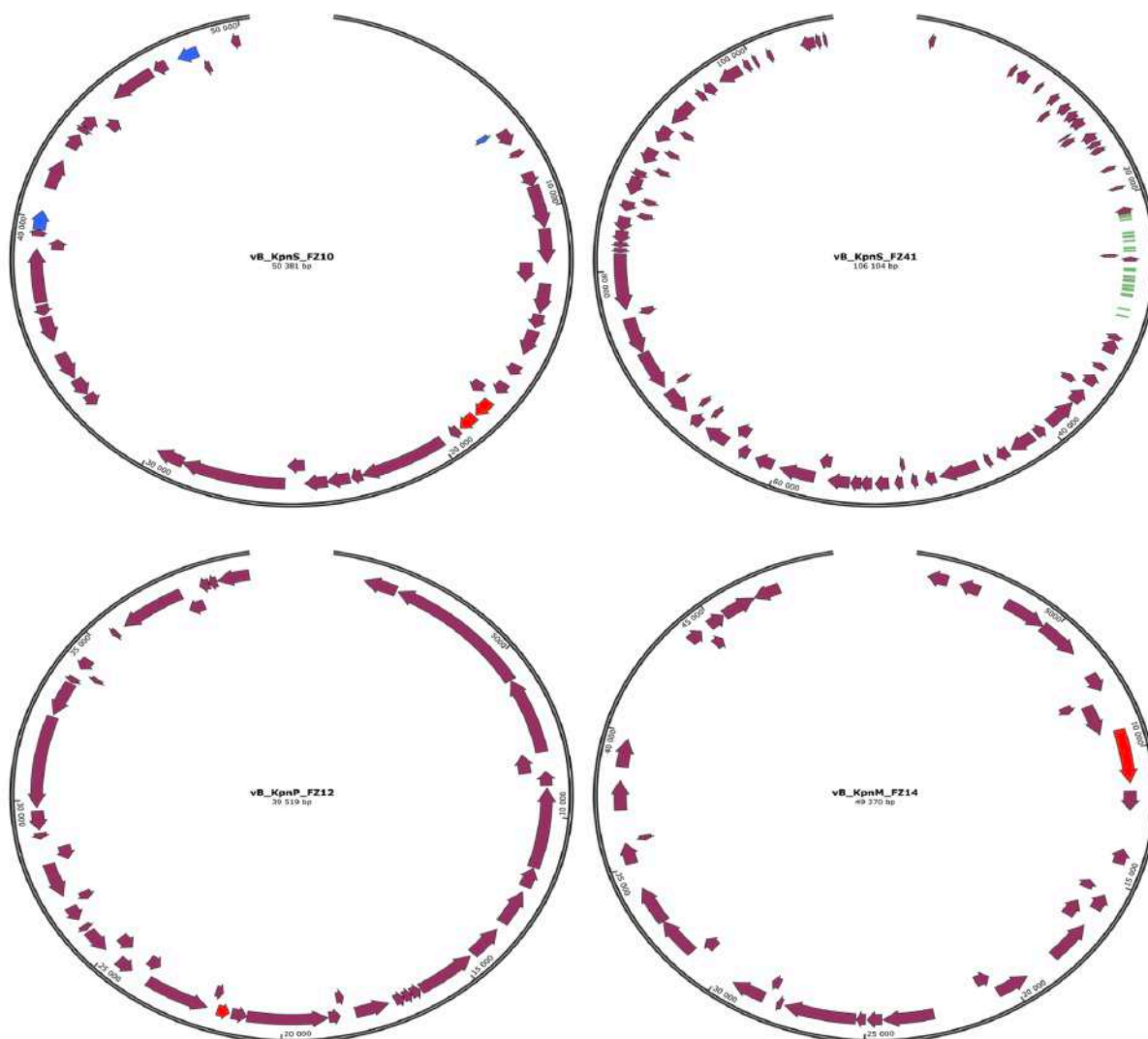


Рисунок 9. Карты геномов бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14. Синим цветом отмечены рамки, кодирующие метилтрансферазы, красным – полисахадир-деполимеразы, зеленым – тРНК, фиолетовым – все остальные.

На геномных картах показаны гены в геноме бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14 и vB_KpnS_FZ41. Рамки, кодирующие метилтрансферазы, отмечены синим цветом, деполимеразы полисахаридов - красным, тРНК - зеленым, а все остальные - фиолетовым. Более подробные карты генома представлены в **Приложении 3**.

3.10 Анализ лизиса культуры *Klebsiella pneumoniae* коктейлем бактериофагов в режиме реального времени

В фазе роста культуры, до добавления комплекса бактериофагов, наблюдалось увеличение количества бактерий в поле зрения микроскопа (Рисунок 10).

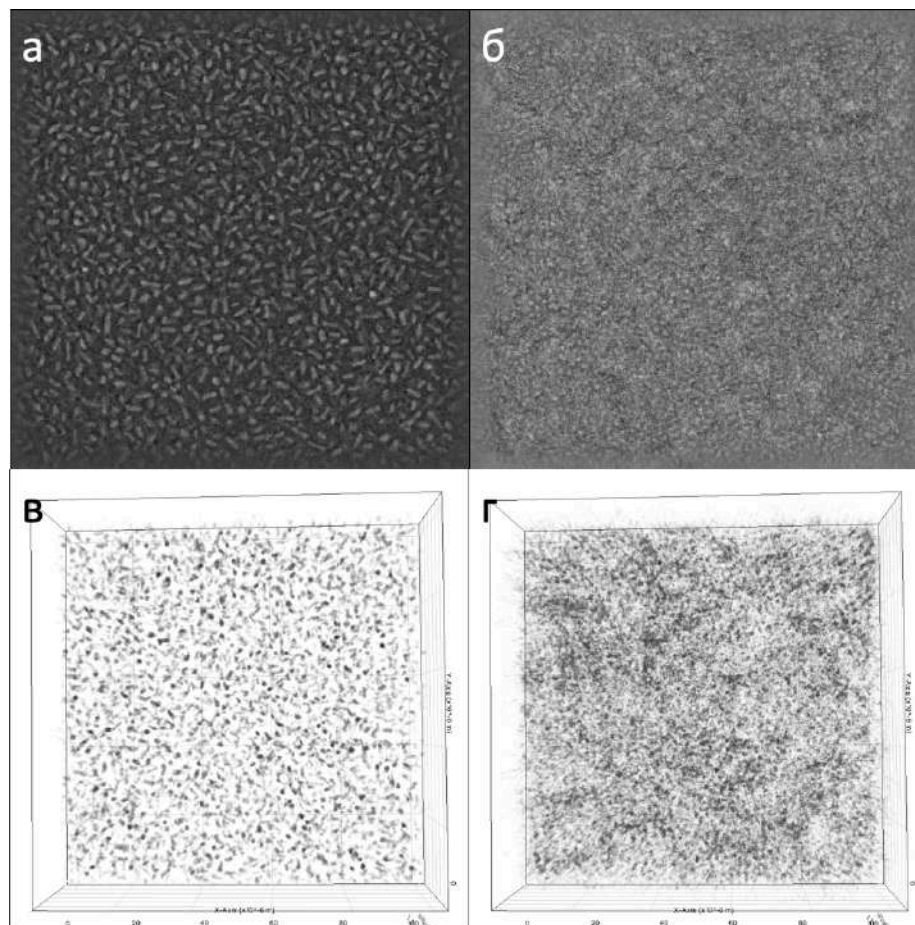
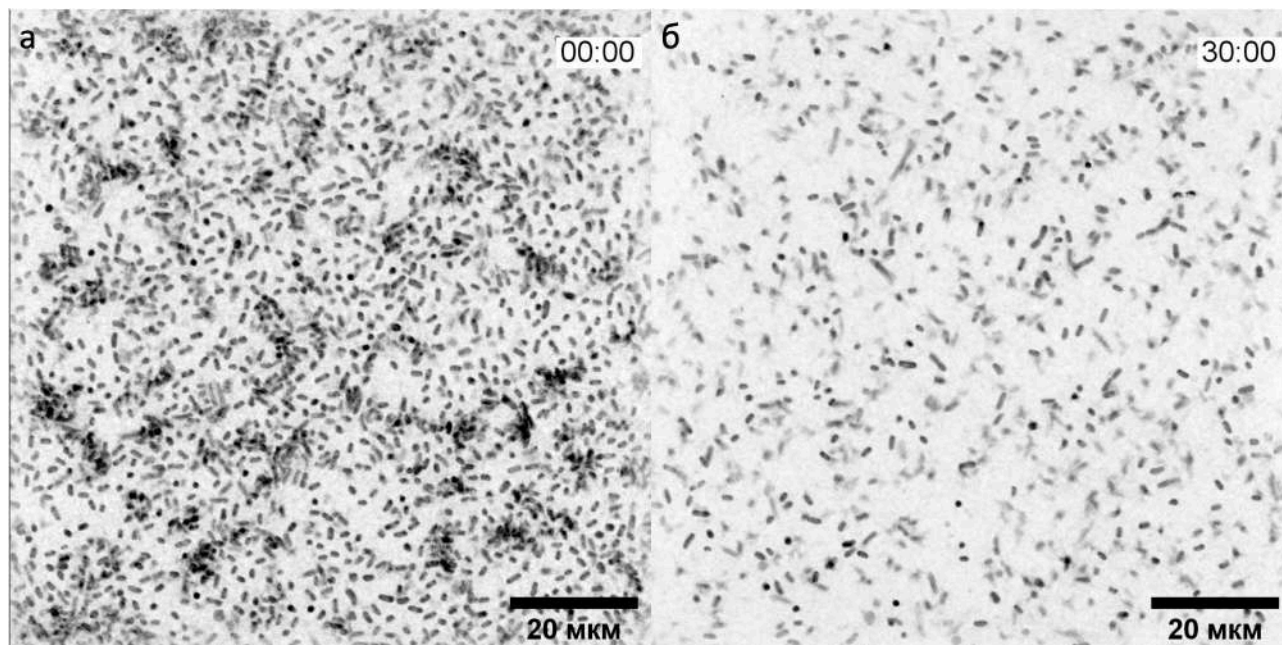


Рисунок 10. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (Kl 315), сделанные с помощью микроскопа 3D Cell Explorer: (а, в) в начале инкубации; (б, г) после 1 ч 40 мин инкубации. Увеличение $\times 58$, размер поля зрения 100×100 мкм. Эксперимент проводился в одной повторности.

В ходе исследования не было возможности наблюдать образование биопленки под микроскопом из-за короткого времени инкубации. Однако первые этапы формирования биопленки – адгезия на стекле и образование микроколоний – были зафиксированы.

Коктейль бактериофагов был добавлен через 1 ч 40 мин после начала инкубации и съемки. В течение 2 ч 30 мин после добавления фагов наблюдалось незначительное снижение количества бактерий в поле зрения, но

сформированные бактериальные микроколонии все еще были заметны. Активное снижение количества бактерий в поле зрения началось через 2 ч 30 мин после добавления комплекса бактериофагов, и в течение 30 мин все микроколонии были разрушены (**Рисунок 11**).



*Рисунок 11. Микрофотографии культуры *K. рнеитопіае* (К1 315 сделанные с помощью микроскопа 3D Cell Explorer: (а) через 2 ч 30 мин; (б) через 3 ч после добавления коктейля бактериофагов. Увеличение $\times 58$. Эксперимент проводился в одной повторности.*

В течение 30 мин наблюдалось уменьшение процента поверхности, покрытой бактериальными клетками, с 27,9% до 10,5% (**Рисунок 12**).

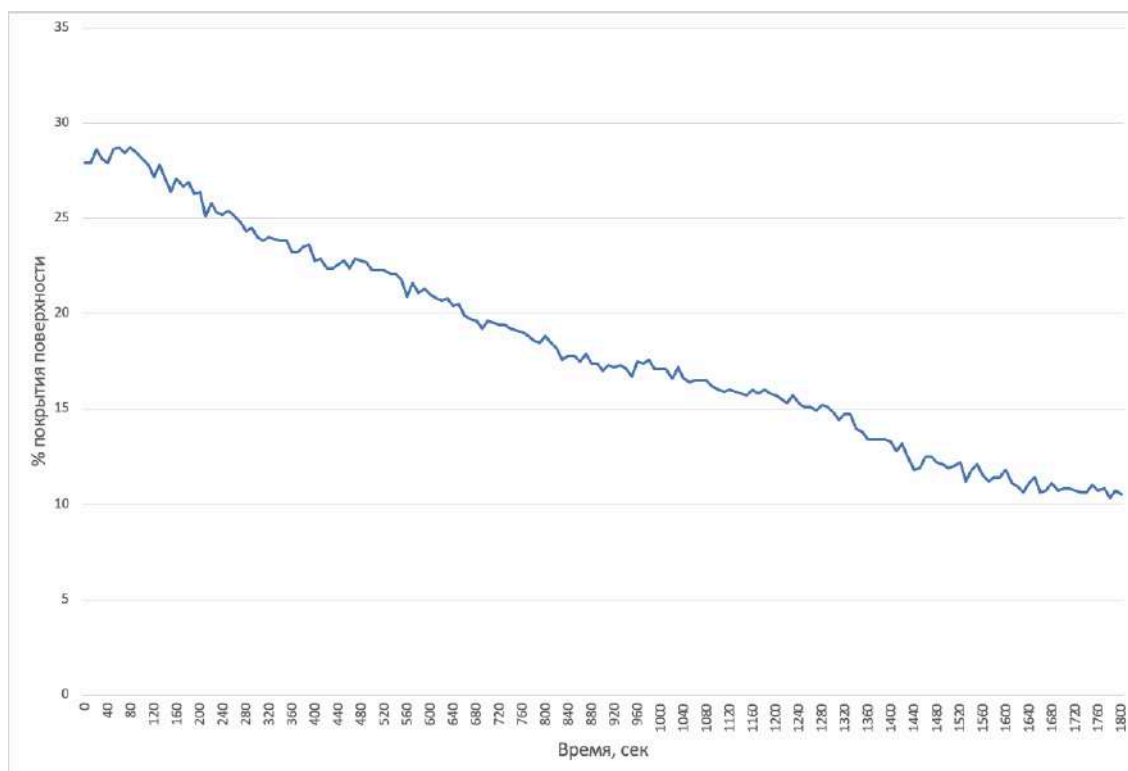


Рисунок 12. Уменьшение процента поверхности, покрытой бактериальными клетками, наблюдаемое с помощью микроскопа 3D Cell Explorer в течение 30 мин (через 2 ч 30 мин после добавления коктейля бактериофагов в культуру K1 315). Эксперимент был проведен в одной повторности.

Наблюдаемая задержка лизиса объясняется тем, что фаговый коктейль добавляли в чашку Петри сбоку через микрошприц, чтобы избежать значительного перемешивания бактериальной культуры, а съемка проводилась в центральной части чашки Петри. Таким образом, лизис бактерий начинался неравномерно в исследуемом объеме и достигал поля зрения микроскопа через 2 ч и 30 мин после добавления комплекса бактериофагов. Активный лизис продолжался в течение 30 мин, и при дальнейшей инкубации не наблюдалось снижения количества бактерий в поле зрения. Это может быть связано со сложными популяционными отношениями между бактериофагами и бактериями. Известно, что фаги наиболее активно размножаются в экспоненциально растущих популяциях бактерий, в то время как в бедной культуре лизис может прекратиться, и вирусы могут перейти в так называемую фазу гибернации (Bryan *et al.*, 2016). Кроме того, бактериофаги обычно активно

лизируют популяции с высокой плотностью. Таким образом, бактериофаги действуют как регулятор бактериальных популяций в природе. Это наблюдалось в данном эксперименте, когда активный лизис прекращался после значительного уменьшения количества бактерий. Выбранный метод позволяет визуализировать рост бактериальной популяции и лизис бактерий после добавления бактериофагов, однако закрытый тип системы не позволяет отбирать из нее пробы, поэтому корректно оценить литическую эффективность культуральными методами не представляется возможным. Обычно методы, используемые для визуализации действия бактериофагов, не позволяют регистрировать лизис в реальном времени. В данном исследовании мы впервые визуализировали лизис бактериофагов в реальном времени с помощью микроскопа 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария). Анализ с использованием микроскопа 3D Cell Explorer (Nanolive, Швейцария) может стать перспективным методом исследования, поскольку позволяет наблюдать лизис в реальном времени, что редко осуществляется при работе с фагами, так как более распространенным методом визуализации является электронная микроскопия, которая предполагает фиксацию образца и окрашивание.

Вместе с результатами эксперимента опубликовано полное видео фазы роста, фазы лизиса бактерий и момента лизиса бактерии, адгезированной на стекле в центре поля зрения микроскопа (Zurabov *et al*, 2022).

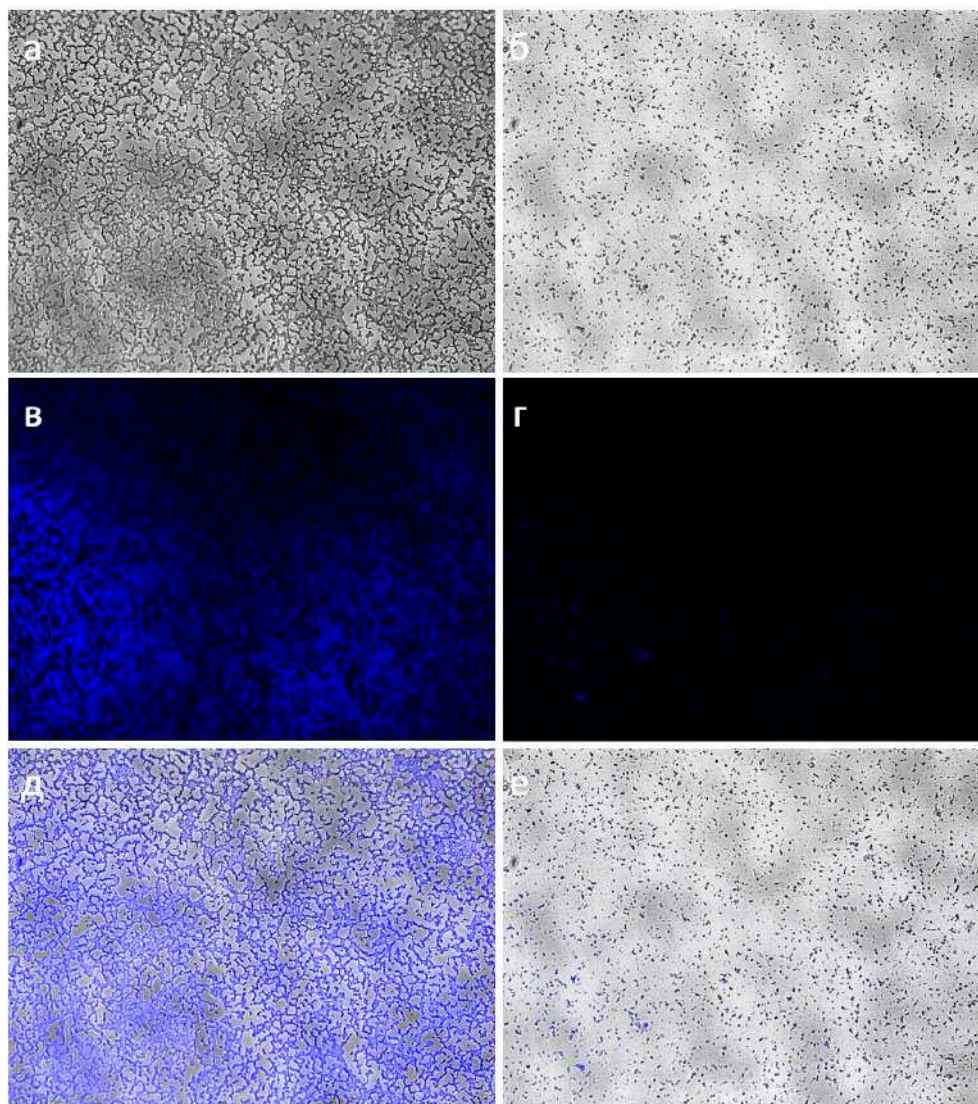
3.11 Визуализация воздействия коктейлем бактериофагов на биопленки *Klebsiella pneumoniae* с помощью оптического микроскопа

В предыдущих исследованиях были описаны различные эффекты воздействия бактериофагов на биопленки. Было показано, что фаги 117 и 31 влияют на развитие капсулы, но не оказывают существенного влияния на формирование биопленки (Tan *et al.*, 2019). Исследователи сообщили, что фаговый коктейль (117 + 31) обладает значительно более высокой антимикробной активностью, чем отдельные фаги. Другие исследователи изучали фаг vB_KpnS_Kp13, который эффективно лизирует инкапсулированные

бактерии (Horváth *et al.*, 2020). Результаты анализа его генома показали, что указанная активность связана с кодируемой ORF2 капсульной деполимеразой. Фаг значительно разрушал биопленку и снижал биомассу на ~ 73% через 48 ч после начала воздействия. В исследовании бактериофага TSK1 было показано, что после обработки биопленок *K. pneumoniae* разного возраста биомасса снижалась на 85-100% (Tabassum *et al.*, 2018). Предварительная обработка биопленок *K. pneumoniae* бактериофагом TSK1 снижала биомассу на >99% в первые 24 ч инкубации. При этом эффективность воздействия была приблизительно одинаковой для биопленок разных возрастов. Также известно, что комбинация предварительно адаптированного бактериофага и антибиотика использовалась для лечения пациента с инфекцией панрезистентным штаммом *K. pneumoniae*, связанной с переломом (Eskenazi *et al.*, 2022). Комбинация была высокоэффективной *in vitro*, на 7-дневных зрелых биопленках и в суспензиях. Исследователи отметили, что цефтазидим/авибактам в зависимости от дозы и времени снижал количество бактерий *K. pneumoniae* в зрелых биопленках, но без полной элиминации. Высокие дозы фага также не уничтожали бактерии в таких зрелых биопленках. Однако комбинации высоких доз предварительно адаптированного фага M1 и умеренных концентраций цефтазидима/авибактама оказались значительно эффективнее, чем только антибиотик. Терапия пациента привела к объективному клиническому, микробиологическому и рентгенологическому улучшению ран и общего состояния.

В ходе настоящего исследования через 24 ч после образования биопленки K1 315 к ней был добавлен коктейль бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 и проведена дополнительная инкубация в течение 24 и 48 ч. Контрольные стекла инкубировали в течение 48 и 72 ч без добавления фагового коктейля. После 48 ч инкубации на контрольных стеклах наблюдалось образование цепочек и кластеров, что характерно для биопленок всех видов бактерий, в то время как на экспериментальных стеклах с

добавлением коктейля фагов наблюдались только одиночные клетки и небольшие колонии (**Рисунок 13**).

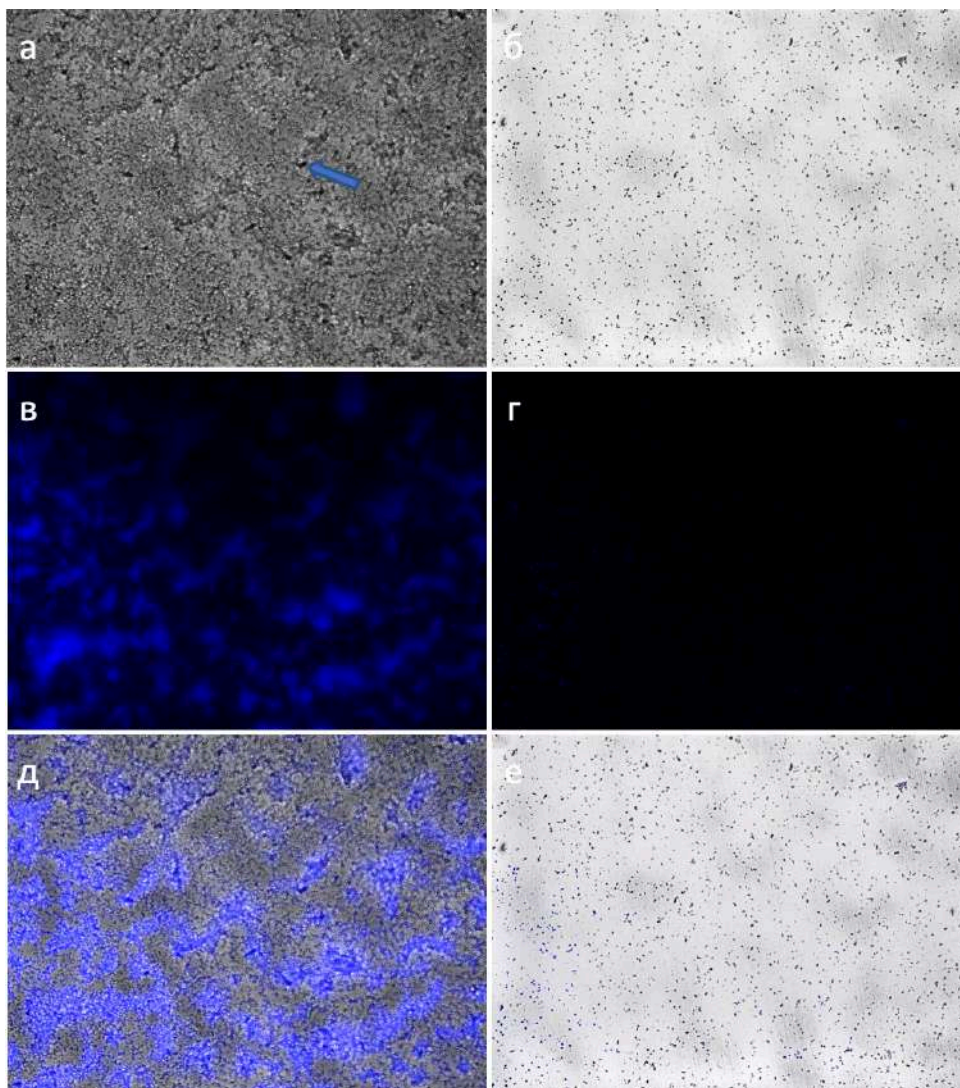


*Рисунок 13. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315) в световом микроскопе AxioImager A1: (а, в, д) после 48 ч инкубации без фагов; (б, г, е) 24 ч инкубации + 24 ч инкубации после добавления коктейля бактериофагов; (а, б) микрофотографии в проходящем свете; (в, г) микрофотографии с флуоресценцией DAPI; (д, е) комбинированные микрофотографии в проходящем свете + флуоресценция DAPI. Увеличение $\times 400$. Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.*

Данные временные точки были выбраны на основании предыдущих исследований (Tabassum *et al.*, 2018) и для отслеживания влияния бактериофагов на переход к более зрелым стадиям формирования биопленки, поскольку коктейль может быть потенциально использован для обработки различных

медицинских изделий (включая катетеры и трубки аппарата искусственной вентиляции легких) с целью предотвращения образования на них биопленки.

Через 72 ч инкубации на контрольных стеклах образовалась зрелая биопленка с водными каналами (**Рисунок 14; а, в, д**). На экспериментальных стеклах с добавлением фагового коктейля наблюдались только одиночные клетки и небольшие колонии (**Рисунок 14; б, г, е**).



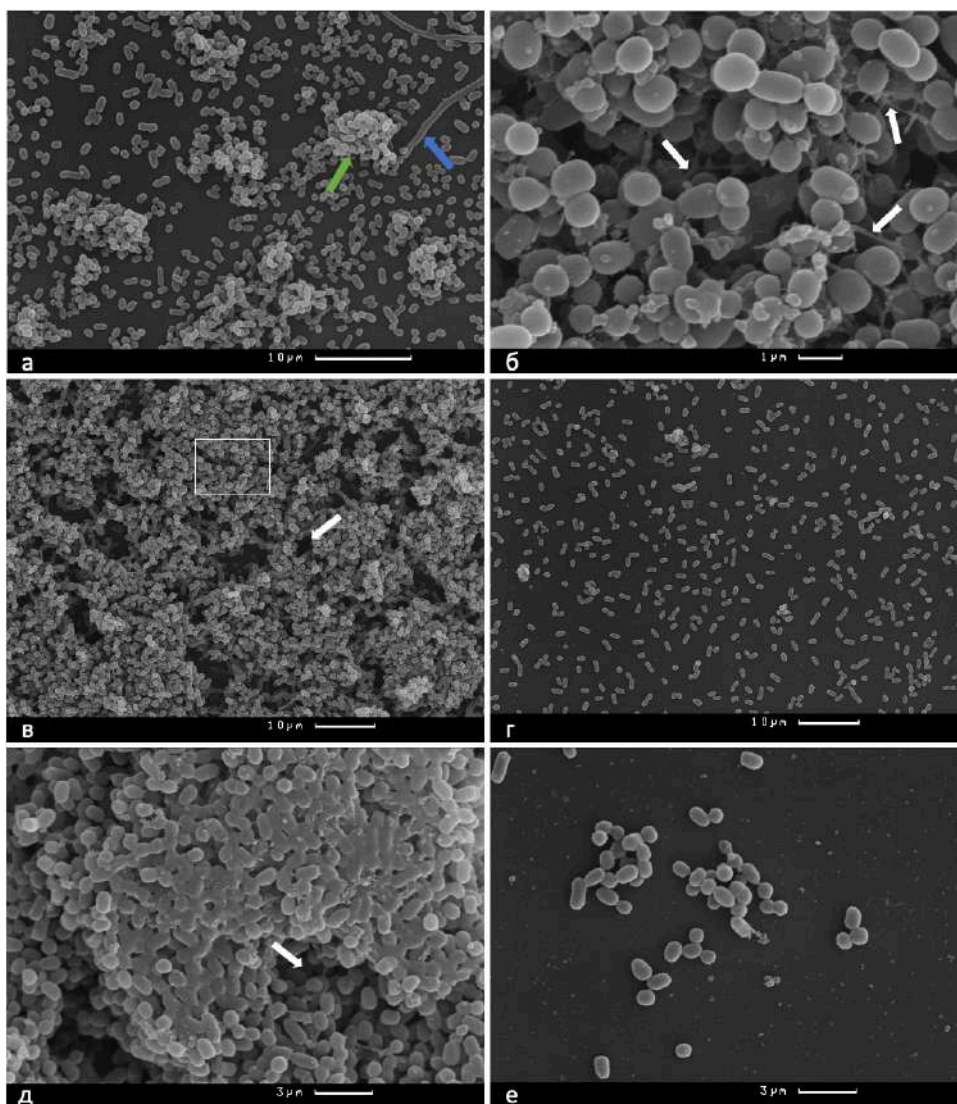
*Рисунок 14. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315) в световом микроскопе AxioImager A1: (а, в, д) после 72 ч инкубации без фагов; (б, г, е) 24 ч инкубации + 48 ч инкубации после обработки коктейлем бактериофагов; (а, б) микрофотографии в проходящем свете; (в, г) микрофотографии с флуоресценцией DAPI; (д, е) комбинированные микрофотографии в проходящем свете + флуоресценция DAPI; (а) водный канал отмечен синей стрелкой. Увеличение $\times 400$. Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.*

Добавление бактериофагов к культуре клеток предотвращало образование биопленки. В образцах с фагами наблюдались только отдельные клетки и небольшие микроколонии. Полного лизиса не отмечалось, но можно предположить, что этого крайне сложно достичь при воздействии бактериофагами, поскольку даже между литическими фагами и бактериями существуют более сложные механизмы, регулирующие лизис, такие как кворум сенсинг, гибернация или транзиторная устойчивость (Silpe and Bassler, 2019; Bryan *et al.*, 2016; Obradović *et al.*, 2023). Исследователи также наблюдали исходно восприимчивые, но фенотипически устойчивые к антибиотикам субпопуляции бактерий (Johnson and Levin, 2013), присутствие персистеров в бактериальной популяции также может потенциально влиять на фаговую инфекцию. Тем не менее, полученные результаты показывают потенциал выбранного фагового коктейля в обработке различных медицинских изделий на ранней стадии для предотвращения образования на них биопленки. Более того, полное уничтожение может быть необязательным даже при медицинском лечении, поскольку у человека представители *K. pneumoniae* могут быть обнаружены в качестве комменсалов желудочно-кишечного тракта, полости рта и носоглотки (Gonzalez-Ferrer *et al.*, 2021), поэтому значительное снижение титров, разрушение биопленки и восстановление нормального баланса микробиоты может стать клинически значимым. Комбинированная фаго- и антибиотикотерапия может стать решением в тех случаях, когда необходимо добиться полной эрадикации биопленок и бактериальной колонизации (Eskenazi *et al.*, 2022; Anbumani *et al.*, 2021). Полученные данные указывают на потенциал выбранного коктейля бактериофагов в борьбе с биопленками *K. pneumoniae*.

3.12 Визуализация воздействия коктейлем бактериофагов на биопленки *Klebsiella pneumoniae* с помощью сканирующего электронного микроскопа

После 24 ч инкубации (формирования биопленки K1 315) на покровных стеклах, инкубированных без коктейля бактериофагов, наблюдались небольшие

микроколонии и сформировавшиеся филаменты (нити) (**Рисунок 15; а**). После инкубации в течение дополнительных 24-48 ч в культуре без добавления коктейля бактериофагов наблюдалось формирование биопленки с кластерами и каналами (**Рисунок 15; б, в**). Инкубация в течение 72 ч привела к образованию зрелой биопленки на поверхности покровных стекол (**Рисунок 15; д**). В образцах, обработанных коктейлем бактериофагов после инкубации в течение 24 ч и последующей инкубации в течение 24 и 48 ч, наблюдались только отдельные бактериальные клетки и небольшие скопления (**Рисунок 15; г, е**).



*Рисунок 15. Микрофотографии культуры *K. pneumoniae* (K1 315), полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S2: (а) после 24 ч инкубации без фагов, зеленой стрелкой отмечена сформировавшаяся микроколония, синей стрелкой отмечены филаменты *K. pneumoniae*, увеличение $\times 2500$; (б) после 48 ч инкубации без фагов, белыми стрелками отмечены экзополисахаридные связи между бактериальными клетками, увеличение $\times 10000$, микрофотография представляет собой увеличенную секцию белого поля рисунка 15в; (в) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 48 ч инкубации без фагов, белые*

стрелки указывают на каналы для жидкости, увеличение $\times 1500$; (г) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 24 ч инкубации + 24 ч после обработки коктейлем бактериофагов, увеличение $\times 1500$; (д) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 72 ч инкубации без фагов, белые стрелки указывают на каналы для жидкости, увеличение $\times 4800$; (е) культура *K. pneumoniae* (K1 315) после 24 ч инкубации + 48 ч после обработки коктейлем бактериофагов, увеличение $\times 4800$.

Эксперимент проводился как минимум в трех повторениях; представлены репрезентативные слайды.

В ходе настоящего исследования продемонстрирована способность коктейля бактериофагов, состоящего из трех бактериофагов (vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14) с деполимеразной активностью, эффективно контролировать устойчивые к антибиотикам биопленки *K. pneumoniae*. В ходе эксперимента наблюдались все стадии формирования биопленки – от единичных адгезированных клеток, образования небольших колоний, кластеров и до формирования и созревания биопленки. Примечательно, что в данном исследовании наблюдалось образование филаментов клетками *K. pneumoniae*. Образование филаментов связывают с процессом формирования биопленки, и современные исследования показывают, что филаментация играет важнейшую роль в развитии биопленки (Anbumani *et al.*, 2021). Существуют также доказательства того, что воздействие бета-лактамовых антибиотиков связано с увеличением частоты образования филаментов (Buijs *et al.*, 2008), сообщалось, что клетки *K. pneumoniae* могут образовывать филаменты в ответ на цефотиам и цефазолин (Nakao *et al.*, 1981). В этой связи можно предположить, что поскольку биопленка состоит из гетерогенных клеток с различным метаболизмом, что играет ключевую роль в адаптации (Stoodley *et al.*, 2002; Nadell *et al.*, 2016), возможно, воздействие антибиотиков приводит к отбору филаментных клеток, которые уже представлены в популяции.

3.13 Адаптивная фаготерапия пациентов с рецидивирующими пневмониями

Общие характеристики пациентов, включенных в исследование, представлены в **Таблице 6**.

Таблица 6. Общая характеристика пациентов, включенных в исследование. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.

Показатели	Значения показателей в группах				p 1А+1Б vs. 2
	1, n=43			2, n=40	
	1А, n=29	1Б, n=14	1А+1Б		
Возраст, медиана	62 (39–71)	50 (32–74)	60 (38–72)	64 (54–72)	0,177
Пол муж/жен, n	20/9	10/4	30/13	21/19	0,120
Диагноз, n (%)					
Последствия:					
ОНМК	16 (55)	6 (43)	22 (51)	26 (65)	0,267
ЧМТ	9 (31)	4 (29)	13 (30)	7 (18)	0,206
операции на мозге	1 (4)	2 (14)	3 (7)	4 (10)	0,706
аноксии	3 (10)	2 (14)	5 (12)	3 (7)	0,714
Тяжесть состояния по шкале АРАСНЕ II, 1-е сут., медиана	12 (8–15)	11 (10-16)	12 (10–15)	10 (8–14)	0,287
Потребность в ИВЛ, в 1-е сут., n (%)	14 (48)	5 (36)	19 (44)	24 (60)	0,189
Число антибиотикорезистентных бактерий в первом образце БАЛ, суммарно (в среднем на 1 пациента)	46/29 (1,6)	25/14 (1,8)	71 (1,7)	72 (1,8)	–

Группы были сопоставимы по полу, возрасту, этиологии повреждения головного мозга, тяжести состояния по шкалам и потребности в ИВЛ.

Оценку безопасности и эффективности применения комплексного препарата бактериофагов проводили с использованием клинических и лабораторных методов мониторинга.

Неврологический статус всех пациентов в хроническом критическом состоянии динамики не претерпел. Не регистрировали различий между группами по степени выраженности острой дыхательной недостаточности, также не выявили статистически значимой динамики соотношения PaO_2/FiO_2 (индекс оксигенации) в группах. В группе 1А отмечали статистически значимую положительную динамику выраженности повреждения легких по данным компьютерной томографии легких (КТ). В группе 1Б подобной динамики не наблюдали (Таблица 7).

Таблица 7. Динамика степени повреждения легких по данным компьютерной томографии легких. * – данные КТ легких приведены не для всех пациентов, а лишь для 34 из 43 (80%) в связи с тем, что на некоторых снимках метод автоматического расчета объема поврежденной легочной ткани оказался неприменим. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.

Показатель	Сутки	Значение показателей в подгруппах		p (1А vs. 1Б) сравнение независимых групп Манна-Уитни
		1А, n=22*	1Б, n=12*	
Объем легких, мл ³	1	3198 (2524–4221)	3125 (2580–3441)	0,510
	21	3844 (2341–4503)	2983 (2336–3705)	0,292
p (1 vs. 21 сутки) сравнение парных выборок по критерию Уилкоксона		0,485	0,530	-
Объем повреждения легких, %	1	33 (16–40)	30 (18–37)	0,683
	21	22 (10–38)	30 (4–56)	0,736
p (1 vs. 21 сутки) сравнение парных выборок по критерию Уилкоксона		0,027	0,859	-

В группе 1Б за время наблюдения на самостоятельное дыхание перевели 1 пациента (6,7%), в группе 1А – 1 пациента (3,1%). Оценка степени органной дисфункции по шкале SOFA в группах не превышала 4-5 баллов во всех группах в течение исследования. Статистически значимых различий между группами по частоте применения вазоактивных препаратов не выявили. В рамках исследования не регистрировали каких-либо клинически значимых побочных эффектов применения комплексного препарата бактериофагов. Летальность к 28-м суткам была сопоставима, в группе 1 – 5% (2/43), в группе 2 – 5% (2/40) (p=1), следует отметить, что в подгруппе 1Б летальных случаев не было.

Потребность в проведении ИВЛ имела тенденцию к росту у пациентов, получавших антибиотики (группа 2 и подгруппа 1А) и, напротив, снижалась в подгруппе 1Б, где применяли только бактериофаги. При мониторинге биохимических показателей в группе 2 выявили статистически значимое снижение концентрации альбумина на 7-е сутки. Данные приведены в **Таблице 8**.

Таблица 8. Динамика клинико-лабораторных показателей в первые две недели лечения в группах сравнения. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.

Клинико-лабораторные показатели	Значения показателей в группах				p (1А+1Б vs. 2)
	1, n=43			2, n=40	
	1А, n=29	1Б, n=14	1А+1Б		
ИВЛ, 1 сутки, n (%)	14/29 (48)	5/14 (36)	19/43 (44)	24/40 (60)	0,189
ИВЛ, 7 сутки, n (%)	18/29 (62)	3/14 (21)	21/43 (49)	25/40 (63)	0,270
ИВЛ, 14 сутки, n (%)	15/27 (56)	2/14 (14)	17/41 (41)	25/39 (64)	0,048
Альбумин, 1 сут., г/л	30 (27–33)	31 (25–35)	30 (26–32)	28 (24–35)	0,549
Альбумин, 7 сут., г/л	30 (28–32)	29 (27–37)	29 (27–31)	26 (24–29)	0,001
Альбумин, 14 сут., г/л	29 (27–31)	31 (25–34)	29 (26–32)	26 (24–30)	0,071

Проводили сравнение групп по числу выявленных случаев превышения референсных значений биохимических показателей печеночной или почечной дисфункции. Данные приведены в Таблице 9.

Таблица 9. Число случаев повышения лабораторных показателей печеночной или почечной дисфункции выше референсных значений к 14 дню лечения по сравнению с данными в 1-й день наблюдения. * – критерий Мак-Нимара. Сравнивали доли пациентов с повышенными лабораторными показателями на 1-е и 14-е сутки в обобщенной группе 1 (1 сутки vs. 14 сут., в динамике); аналогично – для группы 2. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.

Число случаев превышающих норму биохимических показателей	Число пациентов, n (%)							
	Группа 1				p*	Группа 2		
	1А		1Б			1 день	14 дней	p*
	1 день	14 дней	1 день	14 дней				
Билирубин	0/29	0/27	0/14	0/14	-	1/40 (2)	1/39 (3)	0,900
АЛТ	7/29 (24)	8/27 (30)	6/14 (43)	2/14 (14)	0,804	10/40 (25)	14/39 (36)	0,424
АСТ	5/29 (17)	4/27 (15)	2/14 (14)	0/14	0,900	6/40 (15)	7/39 (18)	0,900
Мочевина	11/29 (38)	5/27 (18)	4/14 (29)	4/14 (29)	0,021	12/40 (30)	9/39 (23)	0,791
Креатинин	5/29 (17)	5/27 (18)	2/14 (14)	0/14	0,625	12/40 (30)	8/39 (20)	0,424

Было выявлено, что в группе 2 и подгруппе 1А, где применяли антибиотики в течение 2-х недель, доля пациентов с повышенными значениями биохимических показатели печеночной или почечной дисфункции сохранялась или даже возрастала по сравнению с исходной точкой отсчета. В то же время в подгруппе 1Б, где пациентов лечили только бактериофагами без антибиотиков,

такой закономерности не наблюдали, напротив, имела место тенденция к снижению числа случаев с повышенными биохимическими показателями, например АЛТ, АСТ, креатинин.

Одним из маркеров, позволяющих обоснованно отказаться от назначения антимикробной терапии, является прокальцитонин. У большинства пациентов в хроническом критическом состоянии концентрация прокальцитонина была ниже референсных значений (0,25-0,50 нг/мл) в течение всего периода наблюдения, лишь менее чем у трети пациентов встречали незначительные превышения (0,51-0,80 нг/мл). По данным лабораторного мониторинга в течение двух недель от момента включения в исследование статистически значимых различий в подгруппах не отмечали. Данные приведены в **Таблице 10**.

Таблица 10. Концентрация прокальцитонина (PCT) в подгруппах 1А и 1Б пациентов, получавших комплекс бактериофагов на 1-е, 7-е и 14-е сутки наблюдения, медиана (интерквартильный размах). «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов.

Сроки исследования, сутки	PCT (нг/мл) в подгруппах		p 1А vs. 1Б
	1А	1Б	
1	0,08 (0,05–0,36)	0,11 (0,05–0,35)	0,771
7	0,14 (0,08–0,56)	0,14 (0,05–0,51)	0,866
14	0,12 (0,05–0,80)	0,1 (0,05–0,43)	0,525

Содержание С-реактивного белка превышало референсные значения (5 мг/л) в десятки раз у всех пациентов. Динамику СРБ оценивали по дельте снижения на тридцать и более процентов по сравнению с исходными значениями. В группе 1 на 7-е сутки снижение концентрации СРБ наблюдали в 40% случаев, в то время как в группе 2 – только в 30% случаев.

При оценке динамики микробиологических показателей важно отметить, что на момент включения в исследование в образцах БАЛ рост госпитальных грамотрицательных микроорганизмов наблюдали у пациентов разных групп примерно с равной частотой. К концу первой недели от момента включения в исследование в группе 2 сохранялась персистенция антибиотикорезистентных

штаммов, таких как *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*. В то же время у пациентов группы 1, получавших комплекс бактериофагов, наблюдали снижение основных проблемных грамотрицательных микроорганизмов, таких как *Acinetobacter spp.*, *E. coli* и *K. pneumoniae*. Штаммы *Serratia spp.* встречались реже, но хуже поддавались элиминации, а в группе антибиотикотерапии их количество даже нарастало. Данные приведены в **Таблице 11.**

Таблица 11. Количество случаев выделения микроорганизмов из образцов БАЛ у пациентов в 1-й и 7-й дни от начала лечения в группах сравнения. «1А» – группа, получавшая антибиотики + комплекс бактериофагов; «1Б» – группа, получавшая только комплекс бактериофагов; «2» – группа, получавшая антибактериальную терапию без комплекса бактериофагов.

Микроорганизмы	Группы					
	1, n=43		2, n=40	1, n=43		2, n=40
	1А, n=29	1Б, n=14		1А, n=29	1Б, n=14	
	1-е сут.			7-е сут.		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	4	11	4	8	13
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	10	26	16	6	25
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	8	3	13	3	2	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	–	3	1	–	1
<i>Staphylococcus aureus/haemolyticus</i>	–	–	5	–	–	4
<i>Escherichia coli</i>	5	1	7	3	–	5
<i>Serratia plymuthica/Serratia marcescens</i>	2	3	3	5	4	6
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	–	2	2	2	–	3
<i>Proteus mirabilis/vulgaris</i>	2	–	6	5	1	9
<i>Providencia stuartii/alcalifaciens</i>	2	–	4	2	2	2
Другие:						
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	1		–	–	–	
<i>Alcaligenes faecalis</i>		1				2
<i>Morganella morganii</i>		1				

Примеры клинических наблюдений:

Клиническое наблюдение 1. Пациент П., 38 л., пострадал в ДТП (мотоциклист). Сочетанная травма головного мозга и органов брюшной полости,

выполнены операции: лапаротомия, спленэктомия, санация, дренирование брюшной полости. Течение заболевания осложнилось присоединением полиорганной недостаточности (дыхательной, сердечно-сосудистой, печеночно-клеточной, почечной, белково-энергетической). На 49-е сутки переведен в НИИ Реабилитологии ФНКЦ РР для дальнейшего проведения реабилитационных мероприятий. При поступлении общее состояние пациента крайней степени тяжести, уровень сознания – вегетативное состояние.

За время госпитализации в ФНКЦ РР пациент трижды перенес нозокомиальную пневмонию (НП), последний рецидив НП на 70-е сутки с момента травмы, получал повторные курсы антибиотикотерапии, включая антибиотики последних поколений, основным возбудителем тяжелых инфекционных осложнений был антибиотико-устойчивый штамм *K. pneumoniae*. На 80-е сутки с целью профилактики рецидива НП применили комплекс бактериофагов, активных в отношении антибиотикоустойчивых бактерий, предварительно адаптированный для ФНКЦ РР на основании микробиологических данных биоматериала пациентов отделения ОРИТ. В связи с тяжестью состояния и высоким риском рецидива пневмонии назначили длительный курс ингаляционного применения комплекса бактериофагов в течение 4-х недель. За период использования комплекса рецидивов НП не отмечали. Концентрация прокальцитонина оставалась ниже референсных значений (менее 0,25 нг/мл). При исследовании бронхоальвеолярного лаважа в динамике титр *K. pneumoniae* снизился, причем исходный множественно-устойчивый к антибиотикам штамм был элиминирован, а выделенный штамм после курса лечения оказался чувствителен к широкому спектру антибактериальных препаратов.

Клиническое наблюдение 2. Пациент Ч., 82 года, перенес операцию на головном мозге – удаление опухоли глубинных отделов левой лобной и теменной доли. В послеоперационном периоде развилось осложнение – двусторонняя полисегментарная пневмония, сепсис, септический шок. Получал

множественные повторные курсы антибиотикотерапии. На 84-е сутки переведен в НИИ Реабилитологии ФНКЦ РР для дальнейшего проведения реабилитационных мероприятий. При поступлении общее состояние пациента крайней степени тяжести, уровень сознания – минимальное. Клинически и по результатам компьютерной томографии диагностирован рецидив двусторонней полисегментарной пневмонии. Пациенту назначили комбинацию двух антибиотиков – ванкомицина и меропенема. Однако, несмотря на антибиотикотерапию, отмечали отрицательную клиническую динамику, прогрессирование дыхательной недостаточности, пациент был переведен на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) в режиме ВІРАР. При микробиологическом исследовании БАЛ выявили полирезистентные штаммы *Acinetobacter baumannii* и *K. pneumoniae*. На 89-е сутки к лечению НП добавили комплекс бактериофагов, активных в отношении антибиотикоустойчивых бактерий (содержащего в том числе фаголизаты *A. baumannii*, *K. pneumoniae*), предварительно адаптированный для ФНКЦ РР на основании данных микробиологических исследований биоматериала пациентов. По результатам микробиологического исследования на 96-е и повторно на 102-е сутки (то есть после 7 и 14 дней лечения с применением комплекса бактериофагов) в бронхоальвеолярном лаваже *K. pneumoniae* не обнаружили, полирезистентный штамм *A. baumannii* сохранялся. Учитывая положительную клиническую динамику, к 10-му дню от начала лечения комплексом бактериофага отменили антибактериальный препарат ванкомицин, к 14-у дню отменили меропенем.

Таким образом, начиная с 104-х суток, пациент получал только комплекс бактериофагов. По результатам КТ отметили положительную динамику. С 107-х суток (19 день с момента начала применения комплекса бактериофагов) пациента перевели на самостоятельное дыхание через трахеостомическую канюлю. Аускультативно определяли положительную динамику, выразившуюся в исчезновении или уменьшении влажных хрипов. Пациент не лихорадил, уровень воспалительных маркеров не повышался. Изменились

качественные и количественны характеристики мокроты: мокрота приобрела слизистую консистенцию и уменьшилась количественно. Концентрация прокальцитонина была ниже референсных значений (менее 0,25 нг/мл), что подтверждало отсутствие бактериальной инфекции. На 109-е сутки (21 день с момента начала применения комплекса бактериофагов) при микробиологическом исследовании БАЛ получены данные об отсутствии роста бактерий, что подтвердило эффективность комплекса бактериофагов.

Клиническое наблюдение 3. Пациент С., 73 лет, поступил в отделение реанимации ФНКЦ РР из клиники ГКБ №3 им. М.П. Кончаловского с диагнозом: последствия инфаркта головного мозга в бассейне левой средней мозговой артерии. На вторые сутки с момента поступления течение основного заболевания осложнилось рецидивом правосторонней полисегментарной НП. В связи с чем, пациенту была назначена эмпирическая антимикробная терапия (Цефоперазон, Ванкомицин) и начат курс комплексной фаготерапии. По данным микробиологического исследования мокроты возбудителем пневмонии являлась смешанная полирезистентная флора: *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa*.

На фоне проводимого лечения пневмонии антибиотиками и бактериофагами у пациента отмечена положительная динамика, что выражалось в снижении температуры тела и лейкоцитоза крови, нормализации биохимических маркеров воспаления, уменьшением проявления дыхательной недостаточности и снижением количества гнойной мокроты. По данным повторной компьютерной томографии органов грудной клетки также отмечена положительная динамика - снижение зон консолидации и улучшение пневматизации легочной ткани.

Учитывая положительную клинико-инструментальную картину, были отменены антибактериальные препараты (Цефоперазон, Ванкомицин). Однако, в связи с тяжестью состояния пациента и высоким риском рецидива пневмонии, принято решение о продолжении курса применения АКБ с профилактической целью весь период лечения пациента в отделении реанимации. Таким образом,

начиная с 16-х суток с момента поступления в отделение реанимации ФНКЦ РР, пациент получал только комплекс бактериофагов.

По результатам контрольного микробиологического исследования мокроты на 20-е сутки *K. pneumoniae* не обнаружилась, полирезистентный штамм *P. aeruginosa* сохранялся в сниженном, клинически незначимом титре. На 57-й день пациент выписан с улучшением, рецидивов пневмонии больше не отмечалось.

Таким образом, в ходе исследования ингаляционного применения коктейля бактериофагов у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии, при тщательном клинико-лабораторном мониторинге не выявили каких-либо нежелательных явлений при использовании комплекса бактериофагов в режиме ингаляционного введения по 1 дозе 5 мл 2-3 раза в день, не менее 14 дней.

В литературе имеются единичные публикации, в которых описан опыт ингаляционного (Rubalskii *et al.*, 2020) или внутривенного (Petrovic Fabijan *et al.*, 2020) введения бактериофагов у пациентов с пневмониями, бронхитами, инфекционным эндокардитом и др., авторы которых также констатируют безопасность и отсутствие побочных реакций при применении бактериофагов с лечебной целью.

В ходе настоящей работы практически впервые была оценена безопасность применения бактериофагов у тяжелого контингента пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии. Была отмечена хорошая переносимость, отсутствие локальных и общих нежелательных явлений. Основные клинические показатели результатов лечения в группе 1 с применением комплекса бактериофагов не уступают таковым при традиционной антибиотикотерапии. Кроме того, в группе комбинированного применения антибиотиков и бактериофагов (1А) отметили снижение выраженности повреждения легких по данным КТ, что отражает эффективность данной лекарственной комбинации в лечении нозокомиальной пневмонии. Характерной особенностью хронического

критического состояния является гипервоспаление, характеризующееся высоким уровнем СРБ, превышающим референсные значения более чем в 10 раз (Парфенов *и др.*, 2020; Черневская *и др.*, 2020). Одним из эффектов применения бактериофагов может быть уменьшение напряженности воспалительной реакции, сопутствующей бактериальной инфекции, в частности – снижение содержания СРБ (Miedzybrodzki *et al.*, 2009). И действительно, в исследовании выявили тенденцию к снижению концентрации СРБ в группе с применением комплекса бактериофагов. Результаты микробиологического мониторинга показали, что у ряда пациентов применение комплекса бактериофагов способствовало элиминации основных полирезистентных грамотрицательных бактерий.

Как известно, в организме человека антибиотики связываются с белками, подвергаются конъюгации, метаболизируются, активно выводятся органами, что требует энергетических затрат и создает дополнительную нагрузку на организм длительно болеющего человека. При оценке динамики биохимических показателей крови получили интересные данные: при отказе от применения антибиотиков в подгруппе 1Б в течение двух недель случаи активации печеночных ферментов АЛТ и АСТ отсутствовали. Таким образом, применение бактериофагов может быть крайне актуально для пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии и нуждающихся в реабилитации. В работе использовали технологию адаптивной фаготерапии, когда набор бактериофагов в препарате строго соответствует потребностям конкретного ОРИТ. Отсутствие необходимости индивидуального подбора антибактериальных средств в зависимости от результатов микробиологического исследования каждого конкретного пациента, в перспективе, при внедрении в практику, позволит сократить время принятия решения при необходимости начать лечение немедленно, тем самым повышая эффективность терапии пациентов в критическом состоянии.

3.15 Применение коктейлей бактериофагов в пост-ковидной реабилитации

Ранее считалось, что фаги вызывают минимальные изменения в составе и разнообразии микробиоты кишечника в экспериментальных исследованиях по сравнению с антибиотиками (Galtier *et al.*, 2016). Другие исследования с использованием гнотобиотических мышей показали, что воздействие фагов приводит к композиционным изменениям в микробиоте кишечника мышей (Reyes, *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2019). Проведенное исследование по применению коктейля бактериофагов, направленного против кишечной палочки, показало снижение количества кишечной палочки в кале. Значительных изменений параметров альфа- и бета-разнообразия не наблюдалось, что свидетельствует о том, что потребляемые фаги не нарушали микробиоту. Однако наблюдалось увеличение числа представителей бутират-продуцирующего рода *Eubacterium* и снижение доли таксонов, наиболее тесно связанных с *Clostridium perfringens*. Продукция короткоцепочечных жирных кислот, маркеры воспаления и липидный обмен практически не изменились, однако наблюдалось небольшое, но значительное снижение циркулирующего интерлейкина-4 (ИЛ-4). В совокупности эти данные продемонстрировали потенциал бактериофагов для избирательного снижения количества целевых микроорганизмов без нарушения кишечного сообщества (Febvre *et al.*, 2019). Однако проведенное клиническое исследование продемонстрировало практически неизменный профиль микробиоты в течение 4 недель фаговой терапии при добавлении к системным антибиотикам у одного пациента с инфекцией *Staphylococcus aureus* (Mu *et al.*, 2021). Все исследования подтверждают безопасность и заявляют об отсутствии побочных реакций при использовании бактериофагов в терапевтических целях.

В настоящем исследовании возраст пациентов составлял от 19 до 82 лет (медиана: 62 (53; 67) года); 16 участников исследования были женщинами (53%), 14 – мужчинами (47%), индекс массы тела (ИМТ) составлял 33 (26; 37). У всех испытуемых были признаки поражения легких на компьютерной томограмме в

диапазоне от 10% до 75% (I стадия – 50%, II – 31%, III – 12, IV – 7%) во время острого COVID-19. Антибактериальная терапия назначалась более чем 25% субъектов во время основного заболевания (цефалоспорины третьего поколения, амоксициллин в комбинации с ингибиторами бета-лактамаз). Группу сравнения составили испытуемые (n = 8), также перенесшие в прошлом COVID-19 и получавшие комплексную программу реабилитации в августе 2022 года, но не получавшие коктейли бактериофагов. Возраст составлял от 21 до 77 лет (медиана: 53 (44; 62) года); 7 участников исследования были женщинами (87%), 1 – мужчиной (13%).

В результате реабилитационной программы, включающей фаговую терапию, у пациентов повысилась сатурация, нормализовалась частота дыхания, а частота сердечных сокращений снизилась в пределах референсных значений (Таблица 12).

Таблица 12. Клинические показатели у лиц, получавших терапию бактериофагами (фаготерапию). Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха.

**Корреляция статистически значима.*

Показатели	Пациенты, Медиана (Q1; Q3)		p-значение
	До фаготерапии	После фаготерапии	
Сатурация, %	96 (95; 96)	98 (98; 99)	<0,001 *
Частота дыхания (вдохов/мин)	19 (18; 20)	16 (16; 16)	<0,001 *
Частота сердечных сокращений (ударов/мин)	78 (74; 82)	72 (70; 72)	<0,001 *
Гемоглобин, г/л	135 (124; 150)	142 (132; 153)	0,007 *
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6 (5; 7)	5 (5; 8)	0,436
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/ч	13 (8; 23)	9 (5; 13)	0,007 *

Было зарегистрировано статистически значимое повышение уровня гемоглобина и снижение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) по сравнению с контрольной группой. Показатели контрольной группы приведены в **Приложении 4**.

Наблюдалась тенденция к нормализации уровня лейкоцитов. Оценка рентгеновской визуализации при сравнении объема поражения легочной ткани "ретроспективно/сейчас" выявила следующие результаты: остаточный и ограниченный пневмофиброз у 55% пациентов, разрешение пневмонии от 5% до 20% (ранее 60%) в 30% случаев, и разрешение пневмонии до 40% (ранее 80%).

Результаты оценки с помощью компьютерной томографии объема легких у лиц, получавших терапию бактериофагами, представлена в Приложении 5. Пример анализа компьютерной томограммы с использованием программного обеспечения "Ground Glass" представлен на **Рисунке 16**.

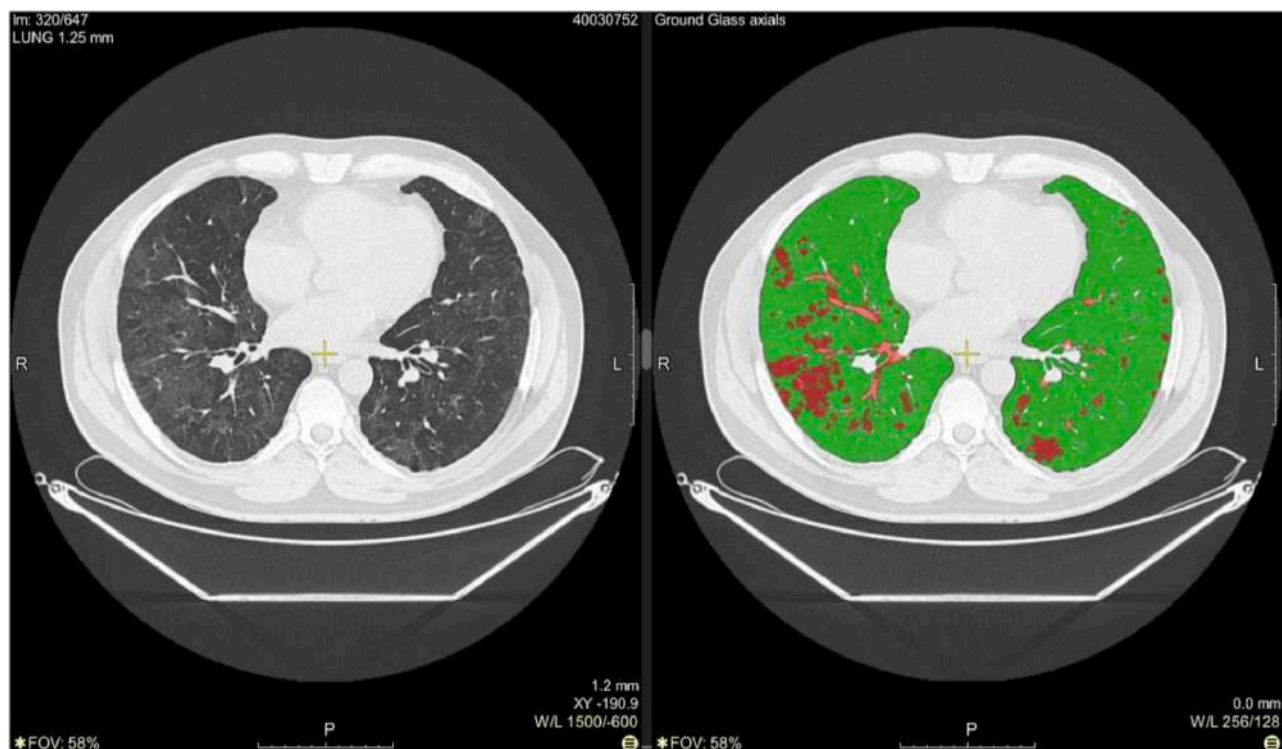


Рисунок 16. Визуализация данных КТ легких с помощью программного обеспечения "Ground glass" (Пациент №20). Объем легких 3220 см³, поражение легких 800 см³ (26%), поражение левого легкого 436 см³ (22%), поражение правого легкого 364 см³ (31%).

Практически у всех пациентов биохимические параметры не превышали референсных значений (**Таблица 13**).

*Таблица 13. Изменения в биохимических показателях крови у лиц, получавших терапию бактериофагами. * Корреляция статистически значима.*

Показатели	Референсные значения	Пациенты, Медиана (Q1; Q3)		p-значение
		До фаготерапии	После фаготерапии	
Билирубин	5–21 мкмоль/л	15,6 (11,4; 18,8)	12,5 (11,2; 18,5)	0,058
Общий белок	66–83 г/л	69,1 (66,3; 71,5)	71,2 (68,4; 72,6)	0,038 *
Креатинин	74–110 мкмоль/л	82 (74; 103)	89 (80; 98)	0,657
Глюкоза	4,1–5,9 мкмоль/л	5,7 (5,1; 5,9)	5,6 (5,2; 6,0)	0,236
Холестерин	0–5,2 мкмоль/л	5,5 (4,5; 7,1)	5,9 (4,5; 6,2)	0,154
Лактатдегидрогеназа	0–247 ед/л	198 (168; 223)	197 (168; 229)	0,137
Аланинаминотрансфераза (АЛТ)	0–50 ед/л	21 (17; 32)	20 (15; 31)	0,679
Аспаратаминотрансфераза (АСТ)	0–50 ед/л	23 (19; 32)	24 (19; 29,5)	0,225
С-реактивный белок (СБР)	0–5 мг/л	0,6 (0,1; 0,9)	0,12 (0,1; 0,6)	0,061

Также выявлено статистически значимое повышение уровня общего белка, что может косвенно свидетельствовать об улучшении процессов всасывания в кишечнике на фоне нормализации состояния биоценоза кишечника. Следует отметить снижение уровня С-реактивного белка (СРБ) как маркера воспаления (Δ 0,12 «после» по сравнению с Δ 0,6 «до»). Уровень С-реактивного белка был повышен у 4 из 24 (17%) пациентов при поступлении и у 2 (8%) при выписке ($p = 0,894$).

При поступлении на реабилитацию у 100% обследуемых микробиота характеризовалась различными маркерами дисбиоза: чрезмерным бактериальным ростом (92%), повышенной концентрацией (lg КОЕ/г) провоспалительных видов микроорганизмов (*Bacteroides fragilis* group, *Candida spp.*, *S. aureus*, *Proteus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*), превышающих референсные значения в 1,5-2 раза, и низкими уровнями *Bacteroides thetaiotomicron*, *Akkermansia muciniphila* по сравнению с референсными значениями (Таблица 14).

Таблица 14. Таксономическое разнообразие микробиоты кишечника у пациентов до и после терапии бактериофагами. * Корреляция статистически значима.

Показатели	Референсные значения	Пациенты, Медиана (Q1; Q3)		Индикация изменений	p-значение
		До фаготерапии	После фаготерапии		
Общая бактериальная масса	$<10^{12}$	4×10^{13} (9×10^{12} ; 9×10^{13})	2×10^{13} (10^{13} ; 6×10^{13})	↓	0,171
<i>Lactobacillus spp.</i>	10^7-10^8	4×10^7 (7×10^5 ; 5×10^8)	5×10^7 (8×10^6 ; 10^8)	↑	0,951
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^9-10^{10}	3×10^{10} (4×10^9 ; 7×10^{10})	2×10^{10} (3×10^9 ; 6×10^{10})	↓	0,535
<i>Escherichia coli</i>	10^7-10^8	2×10^8 (10^7 ; 10^9)	6×10^7 (3×10^7 ; 6×10^8)	↓	0,394
<i>Bacteroides spp.</i>	10^9-10^{12}	4×10^{13} (9×10^{12} ; 9×10^{13})	2×10^{13} (10^{13} ; 6×10^{13})	↓	0,171
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	10^8-10^{11}	9×10^{10} (9×10^9 ; 4×10^{11})	2×10^{11} (2×10^{10} ; 6×10^{11})	↑	0,122
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	10^9-10^{12}	5×10^9 (4×10^8 ; 2×10^{10})	2×10^9 (7×10^8 ; 10^{10})	↓	0,327
<i>Akkermansia muciniphila</i>	$<10^{11}$	2×10^7 (10^7 ; 10^{12})	5×10^6 (2×10^5 ; 5×10^8)	↓	0,93
<i>Enterococcus spp.</i>	$<10^8$	4×10^{12}	5×10^5		-
<i>Escherichia coli enteropathogenic</i>	$<10^4$	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$<10^4$	$<10^5$	$<10^5$	-	-

<i>Klebsiella oxytoca</i>	<10 ⁴	-	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	<10 ⁴	2 × 10 ⁶ (3 × 10 ⁵ ; 2 × 10 ⁷)	2 × 10 ⁶ (3 × 10 ⁵ ; 3 × 10 ⁶)	-	0,23
<i>Staphylococcus aureus</i>	<10 ⁴	2 × 10 ⁷ (8 × 10 ⁵ ; 4 × 10 ⁷)	7 × 10 ⁵ (10 ⁵ ; 2 × 10 ⁶)	↓	0,999
<i>Clostridium difficile</i>	-	3 × 10 ⁷	10 ⁵	↓	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	3 × 10 ⁶ (2 × 10 ⁶ ; 10 ⁷)	3 × 10 ⁵ (10 ⁵ ; 3 × 10 ⁶)	↓	0,23
<i>Proteus vulgaris/mirabilis</i>	<10 ⁴	10 ⁷ (10 ⁷ ; 10 ⁷)	2 × 10 ⁶ (4 × 10 ⁵ ; 5 × 10 ⁶)	↓	0,18
<i>Citrobacter spp.</i>	<10 ⁴	10 ⁸ (2 × 10 ⁵ ; 5 × 10 ¹³)	-	↓	-
<i>Enterobacter spp.</i>	<10 ⁴	3 × 10 ⁶ (8 × 10 ⁵ ; 3 × 10 ⁷)	10 ⁷ (4 × 10 ⁶ ; 10 ⁸)	↑	0,53
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	4,5 × 10 ⁵ (10 ⁵ ; 7 × 10 ⁵)	4 × 10 ⁵ (10 ⁵ ; 7 × 10 ⁵)	-	1,00
<i>Parvimonas micra</i>	-	3 × 10 ⁵ (10 ⁵ ; 4 × 10 ⁵)	9 × 10 ⁵ (6 × 10 ⁵ ; 10 ⁶)	-	0,19
Соотношение <i>Bacteroides fragilis group</i> / <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	0,1–100	252 (80; 10,000)	111 (50; 500)	↓	0,033 **

Состав микробиоты кишечника включал *Clostridium difficile* и *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium nucleatum* и *Parvimonas micra*, которые не встречаются в значительной концентрации в здоровом кишечнике. Также было отмечено высокое соотношение *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* – признак анаэробного дисбаланса, состояния, характерного для воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона, а также аутоиммунной патологии как показателя нарушенного состояния местного кишечного иммунитета. Таким образом, микробиота обследуемых при поступлении характеризовалась наличием провоспалительных типов микроорганизмов и низким уровнем противовоспалительных микроорганизмов, как у пациентов с пост-ковидным синдромом. Эти результаты согласуются с ранее выявленными нарушениями микробиоты после COVID-19 (Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2020; Yeoh *et al.*, 2021). Ранее подобные изменения этого соотношения наблюдались при хронических критических заболеваниях, достигая максимальных значений во время массивной антибиотикотерапии (Chernevskaya *et al.*, 2020).

После бактериофаговой терапии была выявлена тенденция к снижению общей бактериальной массы, а также снижение концентрации провоспалительных микроорганизмов (lg КОЕ/г): *S. aureus*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Proteus spp.*, *Citrobacter spp.*

После 14 дней применения коктейля бактериофагов было выявлено статистически значимое снижение воспалительного коэффициента (**Рисунок 17**).

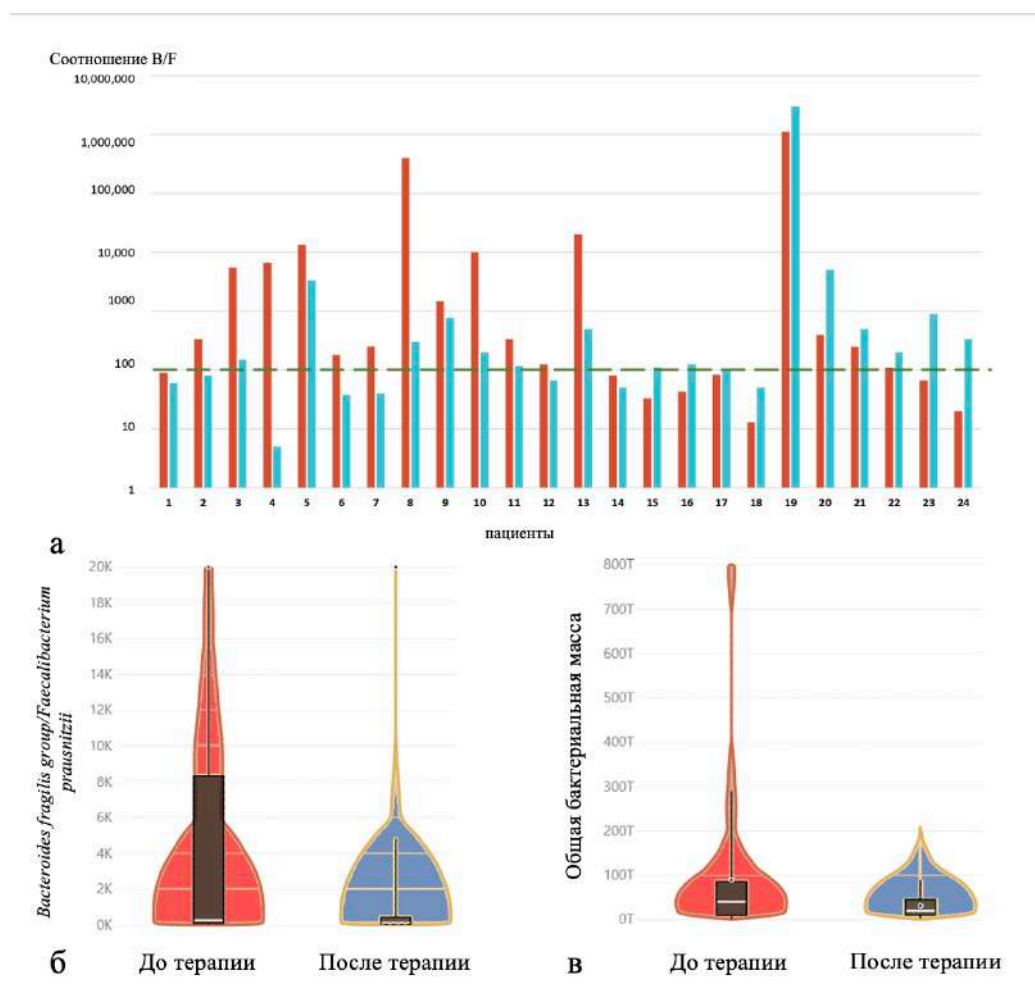


Рисунок 17. (а). Соотношение *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* у субъектов во время терапии коктейлем бактериофагов; красные столбики - до терапии, синие - после. Зеленая пунктирная линия - граница референсного значения. (б). График распределения значений показателя соотношения группы *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii* во время терапии коктейлем бактериофагов; красный - до терапии, синий - после. (с). График распределения значений показателя общей бактериальной массы во время терапии коктейлем бактериофагов; красный - до терапии, синий - после.

Только у 25% испытуемых наблюдалось увеличение соотношения *Bacteroides fragilis group*/*Faecalibacterium prausnitzii* по сравнению с исходным уровнем.

Была обнаружена статистически значимая положительная связь между количеством *E. coli* и общей бактериальной массой ($R = 0,42$, $p = 0,003$), общей бактериальной массой и коэффициентом воспаления ($R = 0,48$, $p < 0,001$), а также количеством *E. coli* и *Bacteroides spp.* ($R = 0,43$, $p = 0,003$). Количество бифидобактерий отрицательно коррелировало с коэффициентом воспаления ($R = -0,32$, $p = 0,028$) (Рисунок 18).

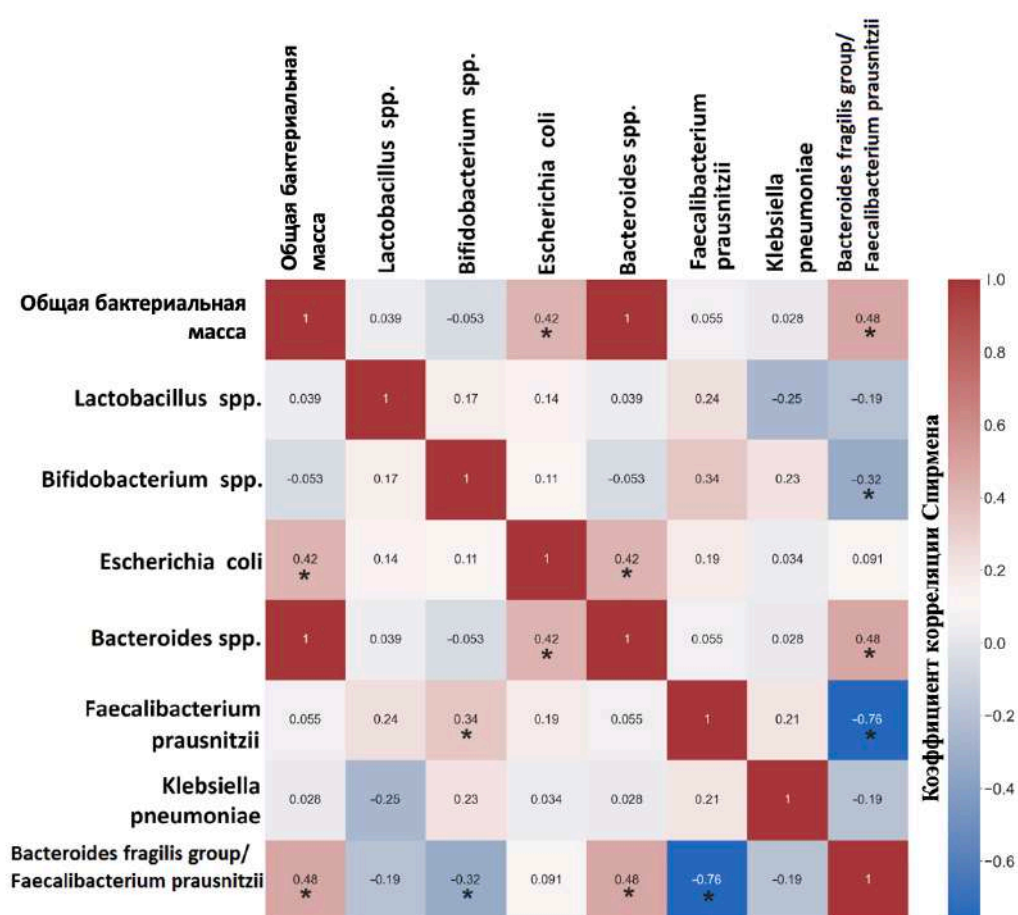


Рисунок 18. Тепловая карта корреляционных связей между микроорганизмами. Красные клетки - положительные корреляции, синие - отрицательные. * Корреляция статистически значима.

Полученные результаты продемонстрировали потенциал коктейля бактериофагов в модуляции микробиоты кишечника. Применение фаговых

коктейлей в течение двух недель не вызвало побочных эффектов у испытуемых, нормализовался стул и уменьшилась выраженность желудочно-кишечных симптомов. После фаговой терапии было выявлено статистически значимое трехкратное снижение коэффициента анаэробного дисбаланса. Хотя корреляции между этим коэффициентом и С-реактивным белком обнаружено не было, наблюдалась нормализация этого биомаркера и статистически значимое снижение СОЭ, параметра, который также может указывать на воспаление. Уменьшение интенсивности воспалительной реакции, связанной с бактериальной инфекцией, в частности, снижение уровня СРБ, может быть одним из эффектов применения бактериофагов (Miedzybrodzki *et al.*, 2009).

Бактериофаги в природе играют важную роль в качестве регуляторов популяций бактерий, а также в регулировании количества бактерий в микробиоме кишечника человека. Понимание этой роли бактериофагов стало основой для разработки концепции иммунитета, основанного на адгезии фагов к слизистым (bacteriophage adherence to mucus immunity) (Barr *et al.*, 2013). Бактериофаги на слизистых оболочках считаются первой линией противодействия развитию дисбиоза, они реагируют на процесс бактериальной пролиферации еще до реакции клеточных и гуморальных механизмов иммунной системы и способствуют более быстрому достижению микробиомом новой точки равновесия в случае развития дисбиоза (Almeida *et al.*, 2019).

Значимым клиническим эффектом ингаляции бактериофага в ходе постковидной реабилитации можно считать статистически достоверное увеличение сатурации и нормализацию частоты дыхания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности комбинации исследованных бактериофагов для дальнейшего применения в фаготерапии в составе комплексного лечебно-профилактического фагового препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе впервые выделено 4 ранее не изученных бактериофага vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14, принадлежащих к классу *Caudoviricetes*. Исследованы их морфологические характеристики, температурная стабильность, устойчивость к различным значениям pH среды и литические свойства на 14 клинических изолятах *Klebsiella pneumoniae*, в том числе на штаммах, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. По результатам исследований фаги оказались устойчивы в широких диапазонах температур и pH, что свидетельствует о высокой стабильности всех изученных бактериофагов и предполагает возможность поддержания титра в условиях хранения и терапевтического использования. Полученные титры при выращивании фагов в жидкой питательной среде позволяют сделать вывод, что исследованные значения константы адсорбции, латентного периода и выхода фага обеспечивают эффективное ингибирование роста культуры *K. pneumoniae* и свидетельствуют о достаточной продуктивности вирусов для получения высоких концентраций в конечном препарате.

Изучен синергизм в составе комплексного фагового препарата и показано, что отдельные фаги менее эффективны, чем их комбинация. После инкубации штамма K1 315 *K. pneumoniae* с коктейлем из 3 бактериофагов (vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12, vB_KpnM_FZ14) не было обнаружено фагоустойчивых колоний, а комбинация 4 выделенных бактериофагов лизировала все исследованные штаммы *K. pneumoniae*. Таким образом, было установлено, что использование фаговых коктейлей в терапии позволяет не только повысить литическую эффективность препарата, но и значительно снизить риск образования фагорезистентных форм.

В работе проведено полногеномное секвенирование и анализ нуклеотидных последовательностей ДНК выделенных бактериофагов. Согласно полученным геномным данным установлено, что выделенные фаги не несут

генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности, а бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы, которые участвуют в разрушении биопленок и капсул. Показана способность комбинации бактериофагов, кодирующих полисахарид-деполимеразы, эффективно разрушать биопленки клинических штаммов *K. pneumoniae* с множественной лекарственной устойчивостью. Впервые разработан новый метод визуализации лизиса бактериальной культуры бактериофагами в режиме реального времени с помощью голографического микроскопа 3D Cell Explorer.

Исследованные бактериофаги vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 были включены в фаговый препарат широко спектра действия и впервые была произведена оценка безопасности применения у пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии. В ходе исследования не выявили каких-либо нежелательных явлений при использовании комплекса бактериофагов в режиме ингаляционного введения по 1 дозе 5 мл 2-3 раза в день, не менее 14 дней. Была отмечена хорошая переносимость, отсутствие локальных и общих нежелательных явлений. Основные клинические показатели результатов лечения в группе с применением комплекса бактериофагов не уступают таковым в группе традиционной антибиотикотерапии. Кроме того, в группе комбинированного применения антибиотиков и бактериофагов отметили снижение выраженности повреждения легких по данным КТ, что отражает эффективность данной лекарственной комбинации в лечении нозокомиальной пневмонии. В исследовании также выявили тенденцию к снижению концентрации СРБ в группе с применением комплекса бактериофагов. Результаты микробиологического мониторинга показали, что у ряда пациентов применение комплекса бактериофагов способствовало элиминации основных полирезистентных грамотрицательных бактерий. При оценке динамики биохимических показателей крови установили, что при отказе от применения антибиотиков в течение двух недель случаи активации печеночных ферментов

АЛТ и АСТ отсутствовали. Таким образом, применение бактериофагов может быть крайне актуально для пациентов, находящихся в хроническом критическом состоянии и нуждающихся в реабилитации. В работе использовали технологию адаптивной фаготерапии, когда набор бактериофагов в препарате строго соответствует потребностям конкретного ОРВИ. Отсутствие необходимости индивидуального подбора антибактериальных средств в зависимости от результатов микробиологического исследования каждого конкретного пациента в перспективе может позволить сократить время принятия решения и тем самым повысить эффективность терапии пациентов в критическом состоянии.

Также впервые изучена безопасность и эффективность применения ингаляционных и пероральных форм комплексных фаговых препаратов в реабилитации пациентов, перенесших COVID-19. В состав комплексных препаратов для ингаляционного и перорального применения вошли бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14. Полученные результаты продемонстрировали потенциал коктейля бактериофагов в модуляции микробиома кишечника. Применение фаговых коктейлей в течение двух недель не вызвало побочных эффектов у испытуемых, нормализовался стул и уменьшилась выраженность желудочно-кишечных симптомов. После фаговой терапии было выявлено статистически значимое трехкратное снижение коэффициента анаэробного дисбаланса. Хотя корреляции между этим коэффициентом и С-реактивным белком обнаружено не было, наблюдалась нормализация этого биомаркера и статистически значимое снижение СОЭ, параметра, который также может указывать на воспаление. Значимым клиническим эффектом ингаляции бактериофага в ходе пост-ковидной реабилитации можно считать статистически достоверное увеличение сатурации и нормализацию частоты дыхания.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что комбинация выделенных и охарактеризованных бактериофагов обладает высоким потенциалом применения в фаготерапии.

ВЫВОДЫ

1. Впервые выделены и охарактеризованы бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, активные в отношении бактерий *Klebsiella pneumoniae*.

2. Выделенные бактериофаги устойчивы в широких диапазонах температур и pH, а также обладают высокой продуктивностью.

3. Применение «коктейля» исследуемых бактериофагов повышает литическую активность и снижает частоту генерации фагоустойчивых форм бактерий, по сравнению с их отдельным применением, комбинация исследуемых бактериофагов способна эффективно ингибировать рост клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

4. Проведено полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnS_FZ41, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, в результате анализа нуклеотидных последовательностей установлено, что все исследованные фаги не несут генов устойчивости к антибиотикам, вирулентности или лизогенности, а бактериофаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 кодируют полисахарид-деполимеразы.

5. Комбинация бактериофагов vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 с полисахарид-деполимеразной активностью способна эффективно предотвращать рост биопленок, а также разрушать зрелые биопленки *Klebsiella pneumoniae in vitro*.

6. Ингаляционное применение бактериофагов vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14 в составе фагового препарата широко спектра действия при лечении хронических реанимационных пациентов с рецидивирующими пневмониями демонстрирует безопасность, а эффективность подтверждена результатами лечения, сопоставимыми с традиционной антибиотикотерапией.

7. Пероральное и ингаляционное применение комплексных фаговых препаратов, включающих фаги vB_KpnS_FZ10, vB_KpnP_FZ12 и vB_KpnM_FZ14, при реабилитации пациентов, перенесших COVID-19, показало отсутствие побочных эффектов, привело к улучшению клинико-лабораторных показателей и к снижению коэффициента анаэробного дисбаланса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин А.В. Исторический обзор опыта применения бактериофагов в России // Медицинский Совет. 2015. Т. 7. С. 12-17. doi:10.21518/2079-701X-2015-7-12-17.
2. Белобородова, Н.В., Гречко, А.В., Зурабов, А.Ю., Зурабов, Ф.М., Кузовлев, А.Н., Петрова, М.В., Черневская, Е.А., Яковлев, А.А. Перспективы применения технологии адаптивной фаготерапии в реабилитации пациентов, перенесших новую коронавирусную инфекцию // Физическая и реабилитационная медицина, медицинская реабилитация. 2021. Т. 3(3). С. 254-259. doi:10.36425/rehab80658.
3. Парфенов, А.Л., Петрова, М.В., Пичугина, И.М., Лугинина, Е.В. Формирование коморбидности у пациентов с тяжелым повреждением мозга и исходом в хроническое критическое состояние (обзор) // Общая реаниматология. 2020. Т. 16 (4). С. 72-89. doi:10.15360/1813-9779-2020-4-72-89.
4. Правительство РФ. Распоряжение № 2045-р от 25 сентября 2017 года // <http://government.ru/docs/29477>. 2017.
5. Соловьева, Е.В. Капсулоспецифичные бактериофаги и их полисахариддеградирующие ферменты, активные в отношении гипермукоидных штаммов *Klebsiella pneumoniae* // Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 2018. obolensk.org/center/diss/solovieva/Диссертация_Соловьева%20ЕВ.pdf.
6. Черневская, Е.А., Меглей, А.Ю., Бужкова, И.В., Ковалева, Н.Ю., Горшков, К.М., Захарченко, В.Е., Белобородова, Н.В. Таксономический дисбиоз микробиоты и сывороточные биомаркеры как отражение тяжести поражения центральной нервной системы // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2020. Т. 5. С. 58-63. doi:10.24075/vrgmu.2020.053.
7. Abedon, S.T., Yin, J. Bacteriophage plaques: theory and analysis // *Methods in Molecular Biology*. 2009. V. 501. P. 61-74.
8. Ackermann, H.-W. Bacteriophage classification // *Bacteriophages: Biology and Applications*. 2005. P. 169-187.

9. Ackermann, H.-W. Basic phage electron microscopy // *Bacteriophages: Methods and Protocols*. 2009. V. 1. P. 113-126.
10. Ackermann, H.-W. Classification of bacteriophages // *The Bacteriophages*. 2nd edition. 2006. P. 8-16.
11. Ackermann, H.-W. Tailed bacteriophages: the order Caudovirales // *Advances in Virus Research*. 1999. V. 51. P. 135-201.
12. Ackermann, H.-W., Dubow, M.S. General Properties of Bacteriophages // *Viruses of Prokaryotes*. 1987. V. 1. P. 13-28, 33-47, 49-101, 143-172, 202.
13. Ackermann, H.-W., Grzegorz Węgrzyn. General Characteristics of Bacteriophages // *Phage Therapy: Current Research and Applications*. 2014. P. 3-22.
14. Ackermann, H.-W., Heldal, M. Electron microscopy of aquatic viruses // *Manual of Aquatic Virus Ecology*. 2009. P. 182-192.
15. Anbumani, S., da Silva, A.M., Carvalho, I.G.B., Fischer, E.R., de Souza E Silva, M., von Zuben, A.A.G., Carvalho, H.F., de Souza, A.A., Janissen, R., Cotta, M.A. Controlled spatial organization of bacterial growth reveals key role of cell filamentation preceding *Xylella fastidiosa* biofilm formation // *NPJ biofilms and microbiomes*. 2021. V. 7(1). P. 86. doi:10.1038/s41522-021-00258-9.
16. Angly, F.E., Felts, B., Breitbart, M., Salamon, P., Edwards, R.A., Carlson, C., Chan, A.M., Haynes, M., Kelley, S., Liu, H., Mahay, J.M., Mueller, J.E., Nulton, J., Olson, R., Parsons, R., Rayhawk, S., Sule, C.A., Rohwer, F. The marine viromes of four oceanic regions // *PLoS Biology*. 2006. V. 4 P. 2121-2131.
17. Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis // *Lancet*. 2022. V. 399 (10325). P. 629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
18. Asadulghani, M., Ogura, Y., Ooka, T., Itoh, T., Sawaguchi, A., Iguchi, A., Nakayama, K., Hayashi, T. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants // *PLoS Pathogens*. 2009. V. 5(5). e1000408.
19. Ashelford, K.E., Day, M.J., Fry, J.C. Elevated abundance of bacteriophage

infecting bacteria in soil // *Applied and Environmental Microbiology*. 2003. V. 69. P. 285-289.

20. Aslam, S., Courtwright, A.M., Koval, C., Lehman, S.M., Morales, S., Furr, C. L., Rosas, F., Brownstein, M.J., Fackler, J.R., Sisson, B.M., Biswas, B., Henry, M., Luu, T., Bivens, B.N., Hamilton, T., Duplessis, C., Logan, C., Law, N., Yung, G., Turowski, J., Anesi, J., Strathdee, S.A., Schooley, R. T. Early clinical experience of bacteriophage therapy in 3 lung transplant recipients // *American journal of transplantation: official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2019. V. 19(9). P. 2631-2639. doi:10.1111/ajt.15503.

21. Bailly-Bechet, M., Vergassola, M., Rocha, E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages // *Genome research*. 2007. V. 17(10). P. 1486-1495. doi:10.1101/gr.6649807.

22. Bakhshinejad, B., Ghiasvand, S. Bacteriophages in the human gut: Our fellow travelers throughout life and potential biomarkers of health or disease // *Virus Research*. 2017. V. 240. P. 47-55.

23. Balestrino, D., Ghigo, J.M., Charbonnel, N., Haagensen, J.A., Forestier, C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides // *Environmental microbiology*. 2008. V. 10(3). P. 685-701. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01491.x.

24. Barr, J.J., Auro, R., Furlan, M., Whiteson, K.L., Erb, M.L., Pogliano, J., Stotland, A., Wolkowicz, R., Cutting, A.S., Doran, K.S., Salamon, P., Youle, M., Rohwer, F. Bacteriophage adhering to mucus provide a non-host-derived immunity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. V. 110(26). P. 10771-10776.

25. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science*. 2007. V 315. P. 1709-1712.

26. Bbtools. <https://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/>.
27. Beamud, B., García-González, N., Gómez-Ortega, M., González-Candelas, F., Domingo-Calap, P., Sanjuan, R. Genetic determinants of host tropism in Klebsiella phages // *Cell Reports*. 2023. V. 42(2). P. 112048. doi:10.1016/j.celrep.2023.112048.
28. Bertozzi Silva, J., Storms, Z., Sauvageau, D. Host receptors for bacteriophage adsorption // *FEMS Microbiology Letters*. 2016. V. 363.
29. Boehme, J., Frischer, M.E., Jiang, S.C., Kellogg, C.A., Pichard, S., Rose, J.B., Steinway, C., Paul, J.H. Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the southeastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools // *Marine Ecology Progress Series*. 1993. V. 97. P. 1-10.
30. Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. V. 30(15). P. 2114-2120.
31. Borysowski, J., Międzybrodzki, R., Wierzbicki, P., Kłosowska, D., Korczak-Kowalska, G., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A. A3R Phage and Staphylococcus aureus Lysate Do Not Induce Neutrophil Degranulation // *Viruses*. 2017. V. 9(2). P. 36. doi:10.3390/v9020036.
32. Bratbak, G., Heldal, M. Total count of viruses in aquatic environments // *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. 1993. P. 135-138.
33. Brives, C., Pourraz, J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures // *Palgrave Communications*. 2020. V. 6. P. 100. doi:10.1057/s41599-020-0478-4.
34. Broecker, N.K., Barbirz, S. Not a barrier but a key: How bacteriophages exploit host's O-antigen as an essential receptor to initiate infection // *Molecular Microbiology*. 2017. V. 105. P. 353-357.
35. Broecker, N.K., Kiele, F., Casjens, S.R., Gilcrease, E.B., Thalhammer, A., Koetz, J., Barbirz, S. *In Vitro* Studies of Lipopolysaccharide-Mediated DNA Release of Podovirus HK620 // *Viruses*. 2018. V. 10(6). P. 289. doi:10.3390/v10060289.
36. Brussaard, C.P.D. Enumeration of bacteriophages using flow cytometry // *Bacteriophages: Methods and Protocols*. 2009. V. 1 P. 97-111.

37. Bruttin, A., Brüßow, H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005. V. 49(7). P. 2874-2878. doi:10.1128/AAC.49.7.2874-2878.2005.
38. Bryan, D., El-Shibiny, A., Hobbs, Z., Porter, J., Kutter, E.M. Bacteriophage T4 infection of stationary phase E. coli: life after log from a phage perspective // *Frontiers in microbiology*. 2016. V. 7. P. 1391. doi:10.3389/fmicb.2016.01391.
39. Buijs, J., Dofferhoff, A.S., Mouton, J.W., Wagenvoort, J.H., van der Meer, J.W. Concentration-dependency of beta-lactam-induced filament formation in Gram-negative bacteria // *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008. V. 14(4). P. 344-349. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01940.x.
40. Bull, J.J., Gill, J.J. The habits of highly effective phages: population dynamics as a framework for identifying therapeutic phages // *Frontiers in Microbiology*. 2014. V. 5. P. 618. doi:10.3389/fmicb.2014.00618.
41. Canchaya, C., Proux, C., Fournous, G., Bruttin, A., Brüßow, H. Prophage genomics // *Microbiology and molecular biology reviews*. 2003. V. 67(2). P. 238-276.
42. Cano, E.J., Caflisch, K.M., Bollyky, P.L., Van Belleghem, J.D., Patel, R., Fackler, J., Brownstein, M.J., Horne, B., Biswas, B., Henry, M., Malagon, F., Lewallen, D.G., Suh, G.A. Phage therapy for limb-threatening prosthetic knee *Klebsiella pneumoniae* infection: case report and in vitro characterization of anti-biofilm activity // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2021. V. 73(1). P. e144-e151. doi:10.1093/cid/ciaa705.
43. Carlet, J. The world alliance against antibiotic resistance: Consensus for a declaration // *Clinical Infectious Diseases*. 2015. V. 60. P. 1837-1841.
44. Chan, B. K., Siström, M., Wertz, J.E., Kortright, K. E., Narayan, D., Turner, P.E. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa* // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. A. 26717. doi:10.1038/srep26717.
45. Chattopadhyay, S., Puls, R.W. Forces dictating colloidal interactions between viruses and soil // *Chemosphere*. 2000. V. 41. P. 1279-1286.

46. Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., Jin, Q. VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis – 10 years on // *Nucleic acids research*. 2015. V. 44. P. 694-697.
47. Chen, Y.E., Fischbach, M.A., Belkaid, Y. Skin microbiota-host interactions // *Nature*. 2018. V. 553(7689). P. 427-436.
48. Chevreux, B. Sequence assembly with MIRA3 // *DNA Sequence*. 2010.
49. Chhibber S., Kaur S., Kumari S. Therapeutic potential of bacteriophage in treating *Klebsiella pneumoniae* B5055-mediated lobar pneumonia in mice // *Journal of Medical Microbiology*. 2008. V. 57. P. 1508-1513.
50. Chhibber, S., Nag, D., Bansal, S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage // *BMC Microbiology*. 2013. V.13. P. 174. doi:10.1186/1471-2180-13-174.
51. Chong, Y., Yakushiji, H., Ito, Y., Kamimura, T. Clinical and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a long-term study from Japan // *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2011. V. 30(1). P. 83-87. doi:10.1007/s10096-010-1057-1.
52. Clements, A., Tull, D., Jenney, A.W., Farn, J.L., Kim, S.H., Bishop, R.E., McPhee, J.B., Hancock, R.E., Hartland, E.L., Pearse, M.J., Wijburg, O.L., Jackson, D. C., McConville, M.J., Strugnell, R.A. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides // *The Journal of biological chemistry*. 2007. V. 282(21). P. 15569-15577. doi:10.1074/jbc.M701454200.
53. Clokie, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., Heaphy, S. Phages in nature // *Bacteriophage*. 2011. V. 1. P. 31-45.
54. Cochlan, W.P., Wikner, J., Steward, G.F., Smith, D.C., Azam, F. Spatial distribution of viruses, bacteria and chlorophyll a in neritic, oceanic and estuarine environments // *Marine Ecology Progress Series*. 1993. V. 92. P. 77-87.

- 55.** Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., Goodridge, L.D. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family – A Review // *Frontiers in microbiology*. 2017. V. 8. P. 1108. doi:10.3389/fmicb.2017.01108.
- 56.** Conant, G.C., Wolfe, K.H. GenomeVx: simple web-based creation of editable circular chromosome maps // *Bioinformatics*. 2008. V. 24(6). P. 861-862. doi:10.1093/bioinformatics/btm598.
- 57.** Corbellino, M., Kieffer, N., Kutateladze, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Tsertsvadze, G., Rimoldi, S.G., Nizharadze, D., Hoyle, N., Nadareishvili, L., Antinori, S., Pagani, C., Scorza, D.G., Romanò, A.L.L., Ardizzone, S., Danelli, P., Gismondo, M.R., Galli, M., Nordmann, P., Poirel, L. Eradication of a multidrug-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate following oral and intra-rectal therapy with a custom made, lytic bacteriophage preparation // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020. V. 70(9). P. 1998-2001. doi:10.1093/cid/ciz782.
- 58.** Cornelissen, A., Ceysens, P.J., T'Syen, J., Van Praet, H., Noben, J.P., Shaburova, O.V., Krylov, V.N., Volckaert, G., Lavigne, R. The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties // *PLoS One*. 2011. V. 6(4). doi:10.1371/journal.pone.0018597.
- 59.** Cornelissen, A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Blangy, S., Spinelli, S., Casey, E., Mahony, J., Noben, J.P., Dal Bello, F., Cambillau, C., van Sinderen, D. The Baseplate of *Lactobacillus delbrueckii* Bacteriophage Ld17 Harbors a Glycerophosphodiesterase // *The Journal of biological chemistry*. 2016. V. 291(32). P. 16816-16827.
- 60.** Criscuolo, E., Spadini, S., Lamanna, J., Ferro, M., Burioni, R. Bacteriophages and Their Immunological Applications against Infectious Threats // *Journal of immunology research*. 2017. V. 2017. P. 3780697.
- 61.** D'Andrea, M.M., Marmo, P., Henrici De Angelis, L., Palmieri, M., Ciacci, N., Di Lallo, G., Demattè, E., Vannuccini, E., Lupetti, P., Rossolini, G. M., Thaller, M. C.

φBO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage // *Scientific Reports*. 2017. V. 7. P. 2614. doi: 10.1038/s41598-017-02788-9.

62. D'Herelle F. On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917 // *Research in Microbiology*. 2007. V. 158. P. 553-554.

63. Danovaro, R., Manini, E., Dell'Anno, A. Higher abundance of bacteria than of viruses in deep Mediterranean sediments // *Applied and Environmental Microbiology*. 2002. V. 68. S. 1468-1472.

64. Danovaro, R., Serresi, M. Viral density and virus-to-bacterium ratio in deep-sea sediments of the Eastern Mediterranean // *Applied and Environmental Microbiology*. 2000. V 66. P. 1857-1861.

65. David, H.L., Clavel, S., Clement, F. Adsorption and growth of the bacteriophage D29 in selected mycobacteria // *Annales de l Institut Pasteur Virologie*. 1980. V131. P. 167-184. doi:10.1016/0769-2617(80)90031-3.

66. Debarbieux, L., Pirnay, J.P., Verbeken, G., De Vos, D., Merabishvili, M., Huys, I., Patey, O., Schoonjans, D., Vaneechoutte, M., Zizi, M., Rohde, C. A bacteriophage journey at the European Medicines Agency // *FEMS microbiology letters*. 2015. V. 363(2). P. 225.

67. Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A., Russell, D.A., Ford, K., Harris, K., Gilmour, K.C., Soothill, J., Jacobs-Sera, D., Schooley, R. T., Hatfull, G. F., Spencer, H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* // *Nature medicine*. 2019. V. 25(5). P. 730-733. doi:10.1038/s41591-019-0437-z.

68. Dion, M.B., Oechslin, F., Moineau, S. Phage diversity, genomics and phylogeny // *Nature reviews Microbiology*. 2020. V. 18(3). P. 125-138. doi:10.1038/s41579-019-0311-5.

69. Dowah, A., Clokie, M. Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria // *Biophysical reviews*. 2018. V.10(2). P. 535-542.
70. Duckworth, D. History and basic properties of bacterial viruses // *Phage Ecology*. 1987. P. 1-44.
71. Dufresne, K., Paradis-Bleau, C. Biology and assembly of the bacterial envelope // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2015. V. 883. P. 41-76.
72. Dutilh, B.E., Cassman, N., McNair, K., Sanchez, S.E., Silva, G.G., Boling, L., Barr, J.J., Speth, D.R., Seguritan, V., Aziz, R.K., Felts, B., Dinsdale, E.A., Mokili, J. L., Edwards, R.A. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes // *Nature communications*. 2014. V. 5. P. 4498. doi:10.1038/ncomms5498.
73. Eddy, S.R. Accelerated Profile HMM Searches // *PLoS computational biology*. 2011. V. 7(10). e1002195. doi:10.1371/journal.pcbi.1002195.
74. El-Shibiny, A., El-Sahhar, S. Bacteriophages: The possible solution to treat infections caused by pathogenic bacteria // *Canadian Journal of Microbiology*. 2017. V. 63. P. 865-879.
75. Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A., Albeck, S., Amitai, G., Sorek, R. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions // *Nature*. 2017. V. 541(7638). P. 488-493.
76. Eskenazi, A., Lood, C., Wubbolts, J., Hites, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Kvachadze, L., van Noort, V., Wagemans, J., Jayankura, M., Chanishvili, N., de Boer, M., Nibbering, P., Kutateladze, M., Lavigne, R., Merabishvili, M., Pirnay, J.P. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* // *Nature communications*. 2022. V. 13(1). P. 302. doi:10.1038/s41467-021-27656-z.

- 77.** Fancello, L., Raoult, D., Desnues, C. Computational tools for viral metagenomics and their application in clinical research // *Virology*. 2012. V. 434. P. 162-174.
- 78.** Farzana, R., Jones, L.S., Rahman, M.A., Andrey, D.O., Sands, K., Portal, E., Watkins, W.J., Pervin, M., Banerjee, M., Walsh, T.R. Outbreak of hypervirulent multidrug-resistant *Klebsiella variicola* causing high mortality in neonates in Bangladesh // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2019. V. 68(7). P. 1225-1227. doi:10.1093/cid/ciy778.
- 79.** Fauconnier A. Phage therapy regulation: from night to dawn // *Viruses*. 2019. V. 11(4). P. 352. doi:10.3390/v11040352.
- 80.** Fauconnier, A. Regulating phage therapy: The biological master file concept could help to overcome regulatory challenge of personalized medicines // *EMBO reports*. 2017. V. 18(2). P. 198-200.
- 81.** Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Manilo, J., Desselberger, U., Ball, J.A. Virus Taxonomy // VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2005. P. 43-94, 279-299, 443-446, 741-749.
- 82.** Febvre, H.P., Rao, S., Gindin, M., Goodwin, N.D.M., Finer, E., Vivanco, J.S., Lu, S., Manter, D.K., Wallace, T.C., Weir, T.L. PHAGE Study: Effects of Supplemental Bacteriophage Intake on Inflammation and Gut Microbiota in Healthy Adults // *Nutrients*. 2019. V. 11(3). P. 666. doi:10.3390/nu11030666.
- 83.** Feiner, R., Argov, T., Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Herskovits, A.A. A new perspective on lysogeny: Prophages as active regulatory switches of bacteria // *Nature Reviews Microbiology*. 2015. V. 13. P. 641-650.
- 84.** Fernández, L., Gutiérrez, D., Rodríguez, A., García, P. Application of Bacteriophages in the Agro-Food Sector: A Long Way Toward Approval // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018. V. 8. P. 296. doi:10.3389/fcimb.2018.00296.
- 85.** Field, A.M. Diagnostic virology using electron microscopy // *Advances in Virus Research*. 1982. V. 27. P. 1-69.

- 86.** Fokine, A., Rossmann, M.G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages // *Bacteriophage*. 2014. V. 4.
- 87.** Fortier, L.C., Sekulovic, O. Importance of prophages to evolution and virulence of bacterial pathogens // *Virulence*. 2013. V. 4(5). P. 354-365.
- 88.** Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data // *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2012. V. 28(23). P. 3150-3152. doi:10.1093/bioinformatics/bts565.
- 89.** Galtier, M., De Sordi, L., Maura, D., Arachchi, H., Volant, S., Dillies, M.A., Debarbieux, L. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition // *Environmental microbiology*. 2016. V. 18(7). P. 2237-2245. doi:10.1111/1462-2920.13284.
- 90.** Gill, J., Hyman, P. Phage choice, isolation, and preparation for the phage therapy // *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2010. V 11. P. 2-14. doi:10.2174/138920110790725311.
- 91.** Gill, J., Young, R.F. II. Therapeutic applications of phage biology: history, practice and recommendations // *Emerging Trends in Antibacterial Discovery: Answering the Call to Arms*. 2011. P. 367-400.
- 92.** Gorski, A., Borysowski, J., Miedzybrodzki, R. Weber-Dąbrowska, B. Bacteriophages in medicine // *Bacteriophage: Genetics and Microbiology*. 2007. P. 125-158.
- 93.** Gratia, A. Des relations numeriques entre bactéries lysogenes et particules de bactériophage // *Annales de l'Institut Pasteur*. 1936. V. 57. P. 652-676.
- 94.** Gu, S., Chen, Y., Wu, Z., Chen, Y., Gao, H., Lv, L., Guo, F., Zhang, X., Luo, R., Huang, C., Lu, H., Zheng, B., Zhang, J., Yan, R., Zhang, H., Jiang, H., Xu, Q., Guo, J., Gong, Y., Tang, L., Li, L. Alterations of the gut microbiota in patients with coronavirus disease 2019 or H1N1 influenza // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020. V. 71(10). P. 2669-2678. doi:10.1093/cid/ciaa709.

- 95.** Guerin, E., Shkoporov, A., Stockdale, S.R., Clooney, A.G., Ryan, F. J., Sutton, T.D.S., Draper, L.A., Gonzalez-Tortuero, E., Ross, R.P., Hill, C. Biology and Taxonomy of crAss-like Bacteriophages, the Most Abundant Virus in the Human Gut // Cell host and microbe. 2018. V. 24(5). P. 653-664.e6. doi:10.1016/j.chom.2018.10.002.
- 96.** Gupta, S.K., Padmanabhan, B.R., Diene, S.M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., Rolain, J.M. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes // Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014. V. 58(1). P. 212–220. doi:10.1128/AAC.01310-13.
- 97.** Gutiérrez, D., Martínez, B., Rodríguez, A., García, P. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential // BMC genomics. 2012. V. 13. P. 228. doi:10.1186/1471-2164-13-228.
- 98.** Harper, D.R., Parracho, H., Walker, J., Sharp, R., Hughes, G., Werthén, M., Lehman, S., Morales, S. Bacteriophages and Biofilms // Antibiotics. 2014. V. 3(3). P. 270-284. doi:10.3390/antibiotics3030270.
- 99.** Hazem, A. Effects of temperatures, pH-values, ultra-violet light, ethanol and chloroform on the growth of isolated thermophilic *Bacillus* phages // New Microbiologica. 2002. V. 25. P. 469-476.
- 100.** Hennes, K.P., Suttle, C.A. Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy // Limnology and Oceanography. 1995. V. 40. P. 1050-1055.
- 101.** Herridge, W.P., Shibu, P., O'Shea, J., Brook, T.C., Hoyles, L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses // Journal of medical microbiology. 2020. V. 69(2). P. 176-194. doi:10.1099/jmm.0.001141.
- 102.** Hewson, I., O'Neill, J.M., Fuhrman, J.A., Dennison, W.C. Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries // Limnology and Oceanography. 2001. V. 46. P. 1734-1746.

- 103.** Holt, K.E., Wertheim, H., Zadoks, R.N., Baker, S., Whitehouse, C.A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T.R., Hsu, L.Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M.B., Edwards, D.J., Nguyen, K.V., Nguyen, T.V., Dao, T.T., Mensink, M., Minh, V.L., Nhu, N.T., Schultsz, C., Kuntaman, K., Newton, P.N., Moore, C.E., Strugnell, R.A., Thomson, N.R.. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2015. V. 112. P. E3574-E3581. doi:10.1073/pnas.1501049112.
- 104.** Hoyles, L., Murphy, J., Neve, H., Heller, K.J., Turton, J.F., Mahony, J., Sanderson, J.D., Hudspith, B., Gibson, G.R., McCartney, A.L., van Sinderen, D. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* – bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman // PeerJ. 2015. V. 3. e1061. doi:10.7717/peerj.1061.
- 105.** Hsieh, P.F., Lin, H.H., Lin, T.L., Chen, Y.Y., Wang, J.T. Two T7-like bacteriophages, K5-2 and K5-4, each encodes two capsule depolymerases: isolation and functional characterization // Scientific reports. 2017. V. 7(1). P. 4624. doi:10.1038/s41598-017-04644-2.
- 106.** Hsu, B.B., Gibson, T.E., Yeliseyev, V., Liu, Q., Lyon, L., Bry, L., Silver, P.A., Gerber, G.K. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model // Cell host and microbe. 2019. V. 25(6). P. 803-814.e5. doi:10.1016/j.chom.2019.05.001.
- 107.** Hsu, C.R., Lin, T.L., Pan, Y. J., Hsieh, P.F., Wang, J.T. Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase // PloS One. 2013. V. 8(8). e70092. doi:10.1371/journal.pone.0070092.
- 108.** Hughes, K.A., Sutherland, I.W., Clark, J., Jones, M.V. Bacteriophage and associated polysaccharide depolymerases – novel tools for study of bacterial biofilms // Journal of Applied Microbiology. 1998. V. 85. P. 583-590. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853541.x.

- 109.** Hurwitz, B. L., U'Ren, J.M. Viral metabolic reprogramming in marine ecosystems // *Current opinion in microbiology*. 2016. V. 31. P. 161-168. doi:10.1016/j.mib.2016.04.002.
- 110.** Hyatt, D., LoCascio, P.F., Hauser, L.J., Uberbacher, E.C. Gene and translation initiation site prediction in metagenomic sequences // *Bioinformatics*. 2012. V. 28(17). P. 2223-2230. doi:10.1093/bioinformatics/bts429.
- 111.** Jamal, M., Hussain, T., Das, C.R., Andleeb, S. Characterization of *Siphoviridae* phage Z and studying its efficacy against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* planktonic cells and biofilm // *Journal of Medical Microbiology*. 2015. V. 64. P. 454-462.
- 112.** Jault, P., Leclerc, T., Jennes, S., Pirnay, J.P., Que, Y.A., Resch, G., Rousseau, A.F., Ravat, F., Carsin, H., Le Floch, R., Schaal, J.V., Soler, C., Fevre, C., Arnaud, I., Bretaudeau, L., Gabard, J. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial // *The Lancet Infectious diseases*. 2019. V. 19(1). P. 35-45. doi:10.1016/S1473-3099(18)30482-1.
- 113.** Jensen, E.C., Schrader, H.S., Rieland, B., Thompson, T.L., Lee, K.W., Nickerson, K.W., Kokjohn, T.A. Prevalence of broad-host-range lytic bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* // *Applied and Environmental Microbiology*. 1998. V.64(2). P. 575-580.
- 114.** Johnson, P.J., Levin, B.R. Pharmacodynamics, population dynamics, and the evolution of persistence in *Staphylococcus aureus* // *PLoS genetics*. 2013. V. 9(1). P. e1003123. doi:10.1371/journal.pgen.1003123.
- 115.** Kaur, T., Nafissi, N., Wasfi, O., Sheldon, K., Wettig, S., Slavcev, R. Immunocompatibility of bacteriophages as nanomedicines // *Journal of Nanotechnology*. 2012. V. 2012. P. 1-13.
- 116.** Kęsik-Szeloch, A., Drulis-Kawa, Z., Weber-Dąbrowska, B., Kassner, J., Majkowska-Skrobek, G., Augustyniak, D., Łusiak-Szelachowska, M., Żaczek, M., Górski, A., Kropinski, A.M. Characterising the biology of novel lytic bacteriophages

infecting multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* // Virology Journal. 2013. V. 10. P. 100. doi:10.1186/1743-422X-10-100.

117. Khan, E., Schneiders, T., Zafar, A., Aziz, E., Parekh, A., Hasan, R. Emergence of CTX-M Group 1-ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* from a tertiary care centre in Karachi, Pakistan // Journal of infection in developing countries. 2010. V. 4(8). P. 472–476. doi:10.3855/jidc.674.

118. Khawaldeh, A., Morales, S., Dillon, B., Alavidze, Z., Ginn, A.N., Thomas, L., Chapman, S.J., Dublanche, A., Smithyman, A., Iredell, J.R. Bacteriophage therapy for refractory *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection // Journal of medical microbiology. 2011. V. 60. P. 1697-1700. doi:10.1099/jmm.0.029744-0.

119. Kim, E.J., Yu, H.J., Lee, J.H., Kim, J.O., Han, S.H., Yun, C.H., Chun, J., Nair, G.B., Kim, D.W. Replication of *Vibrio cholerae* classical CTX phage // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2017. V. 114(9). P. 2343-2348.

120. Knight, D.R., Squire, M.M., Collins, D.A., Riley, T.V. Genome analysis of *Clostridium difficile* PCR Ribotype 014 lineage in Australian pigs and humans reveals a diverse genetic repertoire and signatures of long-range interspecies transmission // Frontiers in Microbiology. 2017. V. 7. P. 2138.

121. Knowles, B., Silveira, C.B., Bailey, B.A., Barott, K., Cantu, V.A., Cobián-Güemes, A.G., Coutinho, F.H., Dinsdale, E.A., Felts, B., Furby, K.A., George, E.E., Green, K.T., Gregoracci, G.B., Haas, A.F., Haggerty, J.M., Hester, E.R., Hisakawa, N., Kelly, L.W., Lim, Y.W., Little, M., Luque, A., McDole-Somera, T., McNair, K., de Oliveira, L.S., Quistad, S.D., Robinett, N.L., Sala, E., Salamon, P., Sanchez, S.E., Sandin, S., Silva, G.G., Smith, J., Sullivan, C., Thompson, C., Vermeij, M.J., Youle, M., Young, C., Zgliczynski, B., Brainard, R., Edwards, R.A., Nulton, J., Thompson, F., Rohwer, F. Lytic to temperate switching of viral communities // Nature. 2016. V. 531(7595). P. 466-470. doi:10.1038/nature17193.

- 122.** Kropinski A.M, Prangishvili D, Lavigne R. Position paper: the creation of a rational scheme for the nomenclature of viruses of bacteria and archaea // *Environmental Microbiology*. 2009. V. 11. P. 2775-2777.
- 123.** Kuipers, S., Ruth, M.M., Mientjes, M., de Sévaux, R.G.L., van Ingen, J. A Dutch case report of successful treatment of chronic relapsing urinary tract infection with bacteriophages in a renal transplant patient // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2019. V. 64(1). P. e01281-19. doi:10.1128/AAC.01281-19.
- 124.** Kurzepa, A., Dabrowska, K., Skaradzinski, G., Gorski, A. Bacteriophage interactions with phagocytes and their potential significance in experimental therapy // *Clinical and Experimental Medicine*. 2009. V. 9. P. 93-100.
- 125.** Kutter, E.M., Kuhl, S.J., Abedon, S.T. Re-establishing a place for phage therapy in western medicine // *Future Microbiology*. 2015. V. 10. P. 685-688. doi:10.2217/fmb.15.28.
- 126.** Labrie, S.J., Samson, J.E., Moineau, S. Bacteriophage resistance mechanisms // *Nature Reviews Microbiology*. 2010. V. 8. P. 317-327.
- 127.** Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V. 227(5259). P. 680-685.
- 128.** Langdon, A., Crook, N., Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation // *Genome medicine*. 2016. V. 8(1). P. 39. doi:10.1186/s13073-016-0294-z.
- 129.** Law, N., Logan, C., Yung, G., Furr, C. L., Lehman, S.M., Morales, S., Rosas, F., Gaidamaka, A., Bilinsky, I., Grint, P., Schooley, R.T., Aslam, S. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient // *Infection*. 2019. V. 47(4). P. 665-668. doi:10.1007/s15010-019-01319-0.
- 130.** Leiman, P.G., Battisti, A.J., Bowman, V.D., Stummeyer, K., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Scholl, D., Molineux, I.J. The structures of bacteriophages K1E and K1-5 explain processive degradation of polysaccharide capsules and evolution of new host specificities // *Journal of Molecular Biology*. 2007. V. 371. P. 836-849.

- 131.** Letarov, A.V., Kulikov, E.E. Adsorption of bacteriophages on bacterial cells // *Biochemistry*. 2017. V. 82. P 1632-1658.
- 132.** Letkiewicz, S., Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Górski, A. Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis-case report // *Folia microbiologica*. 2009. V. 54(5). P. 457-461. doi:10.1007/s12223-009-0064-z.
- 133.** Liang, G., Bushman, F.D. The human virome: assembly, composition and host interactions // *Nature reviews Microbiology*. 2021. V. 19(8). P. 514-527. doi:10.1038/s41579-021-00536-5.
- 134.** Lim, E.S., Wang, D., Holtz, L.R. The bacterial microbiome and virome milestones of infant development // *Trends in microbiology*. 2016. V. 24(10). P. 801-810. doi:10.1016/j.tim.2016.06.001.
- 135.** Lin, H., Paff, M. L., Molineux, I. J., Bull, J. J. Therapeutic application of phage capsule depolymerases against K1, K5, and K30 capsulated *E. coli* in mice // *Frontiers in microbiology*. 2017. V. 8. P. 2257. doi:10.3389/fmicb.2017.02257.
- 136.** Ling, L.L., Schneider, T., Peoples, A.J., Spoering, A.L., Engels, I., Conlon, B.P., Mueller, A., Schäberle, T.F., Hughes, D.E., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V.A., Cohen, D.R., Felix, C.R., Fetterman, K.A., Millett, W.P., Nitti, A.G., Zullo, A.M., Chen, C., Lewis, K.A. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance // *Nature*. 2015. V. 517. P. 455-459.
- 137.** Llobet, E., Martínez-Moliner, V., Moranta, D., Dahlström, K. M., Regueiro, V., Tomás, A., Cano, V., Pérez-Gutiérrez, C., Frank, C.G., Fernández-Carrasco, H., Insua, J.L., Salminen, T.A., Garmendia, J., Bengoechea, J.A. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015. V. 112(46). P. E6369-E6378. doi:10.1073/pnas.1508820112.
- 138.** Lloyd-Price, J, Abu-Ali G, Huttenhower, C. The healthy human microbiome // *Genome Medicine*. 2016. V. 8. P.51.

- 139.** Lobočka, M., Hejnowicz, M. S., Gagala, U., Weber-Dąbrowska, B., Wêgrzyn, G., Dadlez, M. The first step to bacteriophage therapy – how to choose the correct phage // *Phage Therapy: Current Research and Applications*. 2014. P. 23-69.
- 140.** Loc-Carrillo, C., Abedon, S.T. Pros and cons of phage therapy // *Bacteriophage*. 2011. V. 1. P. 111-114. doi:10.4161/bact.1.2.14590
- 141.** Lood, R., Ertürk, G., Mattiasson, B. Revisiting antibiotic resistance spreading in wastewater treatment plants – bacteriophages as a much neglected potential transmission vehicle // *Frontiers in microbiology*. 2017. V. 8. P. 2298. doi:10.3389/fmicb.2017.02298.
- 142.** Lowe, T.M., Chan, P.P. tRNAscan-SE On-line: integrating search and context for analysis of transfer RNA genes // *Nucleic acids research*. 2016. V. 44(W1). P. W54-W57. doi:10.1093/nar/gkw413.
- 143.** Łusiak-Szelachowska, M., Żaczek, M., Weber-Dąbrowska, B., Międzybrodzki, R., Letkiewicz, S., Fortuna, W., Rogóż, P., Szufnarowski, K., Jończyk-Matysiak, E., Olchawa, E., Walaszek, K.M., Górski, A. Antiphage activity of sera during phage therapy in relation to its outcome // *Future Microbiology*. 2017. V. 12. P. 109-117.
- 144.** Ma, Y., Li, E., Qi, Z., Li, H., Wei, X., Lin, W., Zhao, R., Jiang, A., Yang, H., Yin, J., Yuan, J., Zhao, X. Isolation and molecular characterisation of *Achromobacter* phage phiAxp-3, an N4-like bacteriophage // *Scientific Reports*. 2016. V. 6. A.N. 24776. doi:10.1038/srep24776.
- 145.** Manrique, P., Bolduc, B., Walk, S.T., van der Oost, J., de Vos, W.M., Young, M.J. Healthy human gut phageome // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016. V. 113(37). P. 10400-10405. doi:10.1073/pnas.1601060113.
- 146.** Manrique, P., Dills, M., Young, M.J. The human gut phage community and its implications for health and disease // *Viruses*. 2017. V. 9(6). P. 141. doi:10.3390/v9060141.

- 147.** Mäntynen, S., Laanto, E., Oksanen, H.M., Poranen, M.M., Díaz-Muñoz, S.L. Black box of phage-bacterium interactions: exploring alternative phage infection strategies. *Open biology*. 2021. V. 11(9) P. 210188. doi:10.1098/rsob.210188.
- 148.** Maqsood, R., Rodgers, R., Rodriguez, C., Handley, S.A., Ndao, I.M., Tarr, P.I., Warner, B.B., Lim, E.S., Holtz, L.R. Discordant transmission of bacteria and viruses from mothers to babies at birth // *Microbiome*. 2019. V. 7(1). P. 156. doi:10.1186/s40168-019-0766-7.
- 149.** Maranger, R. Bird, D.F. High concentrations of viruses in the sediments of Lake Gilbert, Quebec // *Microbial Ecology*. 1996. V. 31. P. 141-151.
- 150.** Maranger, R. Bird, D.F. Viral abundance in aquatic systems: a comparison between marine and fresh waters // *Marine Ecology Progress Series*. 1995. V. 121. P. 217-226.
- 151.** Marsh, P. Wellington, E. Phage-host interactions in soil // *FEMS Microbiology Ecology*. 1994. V. 15. P. 99-108.
- 152.** Martin, R.M., Bachman, M.A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018. V. 8. P. 4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004.
- 153.** Mattila, S., Ruotsalainen, P., Jalasvuori, M. On-demand isolation of bacteriophages against drug-resistant bacteria for personalized phage therapy // *Frontiers in Microbiology*. 2015. V. 6. P. 1271. doi:10.3389/fmicb.2015.01271.
- 154.** McArthur, A.G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M.A., Baylay, A. J., Bhullar, K., Canova, M. J., De Pascale, G., Ejim, L., Kalan, L., King, A.M., Koteva, K., Morar, M., Mulvey, M.R., O'Brien, J.S., Pawlowski, A.C., Piddock, L.J., Spanogiannopoulos, P., Sutherland, A.D., Tang, I., Taylor, P.L., Thaker, M., Wang, W., Yan, M., Yu, T., Wright, G.D. The comprehensive antibiotic resistance database // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013. V. 57(7). P. 3348-3357.
- 155.** McCallin, S., Alam Sarker, S., Barretto, C., Sultana, S., Berger, B., Huq, S., Krause, L., Bibiloni, R., Schmitt, B., Reuteler, G., Brüssow, H. Safety analysis of a Russian phage cocktail: from metagenomic analysis to oral application in healthy

- human subjects // *Virology*. 2013. V. 443(2). P. 187-196. doi:10.1016/j.virol.2013.05.022.
- 156.** Merino, S., Tomás, J.M. Bacterial Capsules and Evasion of Immune Responses // In: eLS. John Wiley & Sons Ltd. 2015.
- 157.** Międzybrodzki, R., Borysowski, J., Kłak, M., Jończyk-Matysiak, E., Obmińska-Mrukowicz, B., Suszko-Pawłowska, A., Bubak, B., Weber-Dąbrowska, B., Górski, A. *In vivo* studies on the influence of bacteriophage preparations on the autoimmune inflammatory process // *BioMed Research International*. 2017. V. 2017. doi:10.1155/2017/3612015.
- 158.** Miedzybrodzki, R., Borysowski, J., Weber-Dąbrowska, B., Fortuna, W., Letkiewicz, S., Szufnarowski, K., Pawelczyk, Z., Rogoz P., Klak, M., Wojtasik, E., Gorski, A. Clinical aspects of phage therapy // *Advances in Virus Research*. 2012. V. 83. P. 73-121. doi:10.1016/B978-0-12-394438-2.00003-7.
- 159.** Miedzybrodzki, R., Fortuna, W., Weber-Dabrowska, B., Górski, A. A retrospective analysis of changes in inflammatory markers in patients treated with bacterial viruses // *Clinical and experimental medicine*. 2009. V 9(4). P. 303-312. doi: 10.1007/s10238-009-0044-2.
- 160.** Mirzaei, K. M., Nilsson, A. S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy // *PLoS One*. 2015. V. 10(3). P. e0118557. doi:10.1371/journal.pone.0118557.
- 161.** Mirzaei, R., Goodarzi, P., Asadi, M., Soltani, A., Aljanabi, H.A.A., Jeda, A.S., Dashtbin, S., Jalalifar, S., Mohammadzadeh, R., Teimoori, A., Tari, K., Salari, M., Ghiasvand, S., Kazemi, S., Yousefimashouf, R., Keyvani, H., Karampoor, S. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2 // *IUBMB life*. 2020. V. 72(10). P. 2097-2111. doi:10.1002/iub.2356.
- 162.** Moellering, R.C. NDM-1 – a cause for worldwide concern // *The New England Journal of Medicine*. 2010. V. 363. P. 2377-2379. doi:10.1056/NEJMp1011715

- 163.** Molineux, I.J., Panja, D. Popping the cork: Mechanisms of phage genome ejection // *Nature Reviews Microbiology*. 2013. V. 11. P. 194-204.
- 164.** Mshana, S.E., Hain, T., Domann, E., Lyamuya, E.F., Chakraborty, T., Imirzalioglu, C. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania // *BMC infectious diseases*. 2013. V. 13. P. 466. doi:10.1186/1471-2334-13-466.
- 165.** Mu, A., McDonald, D., Jarmusch, A.K., Martino, C., Brennan, C., Bryant, M., Humphrey, G.C., Toronczak, J., Schwartz, T., Nguyen, D., Ackermann, G., D'Onofrio, A., Strathdee, S.A., Schooley, R.T., Dorrestein, P.C., Knight, R., Aslam, S. Assessment of the microbiome during bacteriophage therapy in combination with systemic antibiotics to treat a case of staphylococcal device infection // *Microbiome*. 2021. V. 9(1). P. 92. doi:10.1186/s40168-021-01026-9.
- 166.** Myelnikov, D. An Alternative Cure: The Adoption and Survival of Bacteriophage Therapy in the USSR, 1922-1955 // *Journal of the history of medicine and allied sciences*. 2018. V. 73(4). P. 385-411. doi:10.1093/jhmas/jry024.
- 167.** Myers, C.L., Ireland, R.G., Garrett, T.A., Brown, E.D. Characterization of wall teichoic acid degradation by the bacteriophage ϕ 29 appendage protein gp12 using synthetic substrate analogs // *The Journal of biological chemistry*. 2015. V. 290(31). P. 19133-19145.
- 168.** Nadell, C.D., Drescher, K., Foster, K.R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms // *Nature reviews Microbiology*. 2016. V. 14(9). P. 589-600. doi:10.1038/nrmicro.2016.84.
- 169.** Nakao, M., Nishi, T., Tsuchiya, K. In vitro and in vivo morphological response of *Klebsiella pneumoniae* to cefotiam and cefazolin // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1981. V. 19(5). P. 901-910. doi:10.1128/AAC.19.5.901.
- 170.** Nguyen, S., Baker, K., Padman, B.S., Patwa, R., Dunstan, R.A., Weston, T.A., Schlosser, K., Bailey, B., Lithgow, T., Lazarou, M., Luque, A., Rohwer, F., Blumberg, R.S., Barr, J.J. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers // *mBio*. 2017. V. 8(6). doi:10.1128/mBio.01874-17.

- 171.** NIH. NIAID's Antibacterial Resistance Program: Current Status and Future Directions // 2014. <https://www.niaid.nih.gov/sites/default/files/arstrategicplan2014.pdf>.
- 172.** Norman, J.M., Handley, S.A., Baldrige, M.T., Droit, L., Liu, C.Y., Keller, B. C., Kambal, A., Monaco, C.L., Zhao, G., Fleshner, P., Stappenbeck, T.S., McGovern, D.P., Keshavarzian, A., Mutlu, E.A., Sauk, J., Gevers, D., Xavier, R.J., Wang, D., Parkes, M., Virgin, H.W. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease // *Cell*. 2015. V. 160(3). P. 447-460. doi:10.1016/j.cell.2015.01.002.
- 173.** O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Coey, A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7 // *Applied and Environmental Microbiology*. 2004. V. 70. P. 3417-3424. doi:10.1128/AEM.70.6.3417-3424.2004.
- 174.** Obradović, M., Malešević, M., Di Luca, M., Kekić, D., Gajić, I., McAuliffe, O., Neve, H., Stanisavljević, N., Vukotić, G., Kojić, M. Isolation, characterization, genome analysis and host resistance development of two novel *Lambda* phages active against pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* // *Viruses*. 2023. V. 15(3). P. 628. doi:10.3390/v15030628.
- 175.** Oechslin, F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy // *Viruses*. 2018. V. 10. P.351. doi:10.3390/v10070351.
- 176.** Oliveira, H., Costa, A.R., Konstantinides, N., Ferreira, A., Akturk, E., Sillankorva, S., Nemeč, A., Shneider, M., Dötsch, A., Azeredo, J. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains // *Environmental Microbiology*. 2017. V. 19. P. 5060-5077.
- 177.** Ortmann, A.C., Suttle, C.A. Determination of virus abundance by epifluorescence microscopy // *Bacteriophages: Methods and Protocols*. 2009. V. 1. P. 87-95.

- 178.** Paczosa, M.K., Meccas, J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2016. V. 80. P. 629-661. doi:10.1128/MMBR.00078-15.
- 179.** Pan, Y.J., Lin, T.L., Chen, C.C., Tsai, Y.T., Cheng, Y.H., Chen, Y.Y., Hsieh, P.F., Lin, Y.T., Wang, J.T. *Klebsiella* phage Φ K64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types // *Journal of virology*. 2017. V. 91(6). e02457-16. doi:10.1128/JVI.02457-16.
- 180.** Parikka, K., Le Romancer, M., Wauters, N., Jacquet, S. Deciphering the virus-to-prokaryote ratio VPR: Insights into virus-host relationships in a variety of ecosystems // *Biological Reviews*. 2016. V. 92. P. 1081-1100.
- 181.** Parra, B., Robeson, J. Selection of polyvalent bacteriophages infecting *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis // *Electronic Journal of Biotechnology*. 2016. V. 21. P. 72-76. doi:10.1016/j.ejbt.2016.01.00.
- 182.** Patel, D.R., Bhartiya, S.K., Kumar, R., Shukla, V.K., Nath, G. Use of customized bacteriophages in the treatment of chronic nonhealing wounds: a prospective study // *The international journal of lower extremity wounds*. 2021. V. 20(1). P. 37-46. doi:10.1177/1534734619881076.
- 183.** Patro, L.P.P., Rathinavelan, T. Targeting the sugary armor of *Klebsiella* species // *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2019. V. 9. P. 367. doi:10.3389/fcimb.2019.00367.
- 184.** Paul, J.H. Microbial gene transfer: an ecological perspective // *Journal of molecular microbiology and biotechnology*. 1999. V. 1(1). P. 45-50.
- 185.** Peduzzi, P., Agis, M., Luef, B. Evaluation of confocal laser scanning microscopy for enumeration of virus-like particles in aquatic systems // *Environmental Monitoring and Assessment*. 2013. V. 185. P. 5411-5448.
- 186.** Pfannkuch, E. Kausche, G.A. Isolierung und ubermikroskopische Abbildung eines Bakteriophagen // *Natur wissenschaften*. 1940. V. 28. P. 46.

- 187.** Pires, D., Melo, L., Vilas Boas, D., Sillankorva, S., Azeredo, J. Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections // *Current Opinion in Microbiology*. 2017. V. 39. P. 48-56.
- 188.** Pires, D., Oliveira, H., Melo, L., Sillankorva, S., Azeredo, J. Bacteriophage-encoded depolymerases: Their diversity and biotechnological applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016. V. 100. P. 2141-2151.
- 189.** Pirnay, J.P., Blasdel, B.G., Bretaudeau, L., Buckling, A., Chanishvili, N., Clark, J.R., Corte-Real, S., Debarbieux, L., Dublanchet, A., De Vos, D., Gabard, J., Garcia, M., Goderdzishvili, M., Górski, A., Hardcastle, J., Huys, I., Kutter, E., Lavigne, R., Merabishvili, M., Olchawa, E., Parikka, K.J., Patey, O., Pouilot, F., Resch, G., Rohde, C., Scheres, J., Skurnik, M., Vaneechoutte, M., Van Parys, L., Verbeken, G., Zizi, M., Van den Eede, G. Quality and safety requirements for sustainable phage therapy products // *Pharmaceutical research*. 2015. V. 32(7). P. 2173-2179.
- 190.** Pirnay, J.P., De Vos, D., Verbeken, G. Clinical applications of bacteriophages in Europe // *Microbiology Australia*. 2019. V. 40. P. 8-15. doi:10.1071/MA19010
- 191.** Pirnay, J.P., Verbeken, G., Ceysens, P. J., Huys, I., De Vos, D., Ameloot, C., Fauconnier, A. The Magistral Phage // *Viruses*. 2018. V. 10(2). P. 64. doi:10.3390/v10020064.
- 192.** Podschun, R., Ullmann, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors // *Clinical microbiology reviews*. 1998. V. 11(4). P. 589-603.
- 193.** Poranen, M.M., Daugelavicius, R., Bamford, D.H. Common principles in viral entry // *Annual Review of Microbiology*. 2002. V. 56. P. 521-538.
- 194.** Pyra, A., Brzozowska, E., Pawlik, K., Gamian, A., Dauter, M., Dauter, Z. Tail tubular protein A: a dual-function tail protein of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage KP32 // *Scientific reports*. 2017. V. 7(1). P. 2223. doi:10.1038/s41598-017-02451-3.
- 195.** Qureshi, S. *Klebsiella* infections // *Medscape: Drugs and Diseases*. 2016. <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview#a4>.

- 196.** Raspaud, E., Forth, T., São-José, C., Tavares, P., de Frutos, M. A kinetic analysis of DNA ejection from tailed phages revealing the prerequisite activation energy // *Biophysical journal*. 2007. V. 93(11). P. 3999-4005.
- 197.** Reizner, W., Hunter, J.G., O'Malley, N.T., Southgate, R.D., Schwarz, E.M., Kates, S.L. A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis // *European cells & materials*. 2014. V. 27. P. 196-212.
- 198.** Reyes, A., Semenkovich, N.P., Whiteson, K., Rohwer, F., Gordon, J.I. Going viral: next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut // *Nature Reviews Microbiology*. 2012. V. 10. P. 607-617. doi:10.1038/nrmicro 2853.
- 199.** Reyes, A., Wu, M., McNulty, N.P., Rohwer, F.L., Gordon, J.I. Gnotobiotic mouse model of phage-bacterial host dynamics in the human gut // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013. V. 110(50). P. 20236-20241. doi:10.1073/pnas.1319470110.
- 200.** Rhoads, D.D., Wolcott, R.D., Kuskowski, M.A., Wolcott, B.M., Ward, L.S., Sulakvelidze, A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial // *Journal of wound care*. 2009. V. 18(6). P. 237-243. doi:10.12968/jowc.2009.18.6.42801.
- 201.** Ribeiro, S.M., Cardoso, M.H., Cândido, E.deS., Franco, O.L. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms // *Future microbiology*. 2016. V. 11(4). P. 527-538. doi:10.2217/fmb.16.7.
- 202.** Rohde, C., Wittmann, J., Kutter, E. Bacteriophages: A Therapy Concept against Multi-Drug-Resistant Bacteria // *Surgical Infections*. 2018. V. 19 (8). doi:10.1089/sur.2018.184.
- 203.** Rossmann, F.S., Racek, T., Wobser, D., Puchalka, J., Rabener, E.M., Reiger, M., Hendrickx, A.P., Diederich, A.K., Jung, K., Klein, C., Huebner, J. Phage-mediated dispersal of biofilm and distribution of bacterial virulence genes is induced by quorum sensing // *PLoS Pathogens*. 2015. V. 11(2). doi:10.1371/journal.ppat.1004653.
- 204.** Rostkowska, O.M., Międzybrodzki, R., Miszewska-Szyszkowska, D., Górski, A., Durlík, M. Treatment of recurrent urinary tract infections in a 60-year-old kidney

transplant recipient. The use of phage therapy // *Transplant infectious disease: an official journal of the Transplantation Society*. 2021. V. 23(1). P. e13391. doi:10.1111/tid.13391.

205. Roux, S., Krupovic, M., Daly, R.A., Borges, A.L., Nayfach, S., Schulz, F., Sharrar, A., Matheus Carnevali, P.B., Cheng, J.F., Ivanova, N.N., Bondy-Denomy, J., Wrighton, K.C., Woyke, T., Visel, A., Kyrpides, N.C., Eloe-Fadrosh, E.A. Cryptic inoviruses revealed as pervasive in bacteria and archaea across Earth's biomes // *Nature microbiology*. 2019. V. 4(11). P. 1895-1906. doi:10.1038/s41564-019-0510-x.

206. Rubalskii, E., Ruemke, S., Salmoukas, C., Boyle, E.C., Warnecke, G., Tudorache, I., Shrestha, M., Schmitto, J.D., Martens, A., Rojas, S.V., Ziesing, S., Bochkareva, S., Kuehn, C., Haverich, A. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery // *Antibiotics*. 2020. V. 9(5). P. 232. doi:10.3390/antibiotics9050232.

207. Ruiz, N., Kahne, D., Silhavy, T.J. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis // *Nature Reviews Microbiology*. 2006. V. 4. P. 57-66.

208. Samson, J.E., Magadán, A.H., Sabri, M., Moineau, S. Revenge of the phages: defeating bacterial defences // *Nature reviews Microbiology*. 2013. V. 11(10). P. 675-687. doi:10.1038/nrmicro3096.

209. São-José, C., Nascimento, J., Parreira, R., Santos, M. Release of progeny phages from infected cells // *Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology*. 2007. P. 307-333.

210. Sarker, S. A., Sultana, S., Reuteler, G., Moine, D., Descombes, P., Charton, F., Bourdin, G., McCallin, S., Ngom-Bru, C., Neville, T., Akter, M., Huq, S., Qadri, F., Talukdar, K., Kassam, M., Delley, M., Loiseau, C., Deng, Y., El Aidy, S., Berger, B., Brüssow, H. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from Bangladesh // *EBioMedicine*. 2016. V. 4. P. 124-137. doi:10.1016/j.ebiom.2015.12.023.

- 211.** Scholl, D., Adhya, S., Merril, C. *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7 // Applied and environmental microbiology. 2005. V. 71(8). P 4872-4874.
- 212.** Shkoporov, A.N., Clooney, A.G., Sutton, T.D.S., Ryan, F.J., Daly, K.M., Nolan, J.A., McDonnell, S.A., Khokhlova, E.V., Draper, L.A., Forde, A., Guerin, E., Velayudhan, V., Ross, R.P., Hill, C. The human gut virome is highly diverse, stable, and individual specific // Cell host & microbe. 2019. V. 26(4). P. 527-541. doi:10.1016/j.chom.2019.09.009.
- 213.** Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S. The bacterial cell envelope // Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2010. V. 2(5).
- 214.** Silpe, J.E., Bassler, B.L. A host-produced quorum-sensing autoinducer controls a phage lysis-lysogeny decision // Cell. 2019. V. 176(1-2). P. 268-280.e13. doi:10.1016/j.cell.2018.10.059.
- 215.** Silveira, C.B., Rohwer, F.L. Piggyback-the-Winner in host-associated microbial communities // NPJ biofilms and microbiomes. 2016. V. 2. P. 16010. doi:10.1038/npjbiofilms.2016.10.
- 216.** Soleimani Sasani, M., Eftekhari, F. Potential of a bacteriophage isolated from wastewater in treatment of lobar pneumonia infection induced by klebsiella pneumoniae in mice // Current microbiology. 2020. V. 77(10). P. 2650-2655. doi:10.1007/s00284-020-02041-z.
- 217.** Soler Bistué, A.J. C., Birshan, D., Tomaras, A.P., Dandekar, M., Tran, T., Newmark, J., Bui, D., Gupta, N., Hernandez, K., Sarno, R., Zorreguieta, A., Actis, L.A., Tolmasky, M.E. *Klebsiella pneumoniae* Multiresistance Plasmid pMET1: Similarity with the *Yersinia pestis* Plasmid pCRY and Integrative Conjugative Elements // PLoS One. 2008. V. 3(3). P. e1800. doi:10.1371/journal.pone.0001800
- 218.** Stern, A., Sorek, R. The phage-host arms race: shaping the evolution of microbes // BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. 2011. V. 33(1). P. 43-51.

- 219.** Steward, F.G., Smith, D.C., Azam, F. Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Sea // *Marine Ecology Progress Series*. 1996. V. 131. P. 287-300.
- 220.** Stewart, P.S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996. V. 40(11). P. 2517-2522. doi:10.1128/AAC.40.11.2517.
- 221.** Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities // *Annual review of microbiology*. 2002. V 56. P. 187-209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- 222.** Struve, C. Bojer, M., Krogfelt, K.A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence // *Infection and Immunity*. 2008. V. 76. P. 4055-4065. doi:10.1128/IAI.00494-08.
- 223.** Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, K.A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity // *Infection and Immunity*. 2009. V. 77. P. 5016-5024. doi:10.1128/IAI.00585-09.
- 224.** Summers, W.C. In the beginning... // *Bacteriophage*. 2011. V. 1(1). P. 50-51. doi:10.4161/bact.1.1.14070.
- 225.** Summers, W.C. The strange history of phage therapy // *Bacteriophage*. 2012. V. 2(2). P. 130-133. doi:10.4161/bact.20757.
- 226.** Suttle, C.A. Marine viruses - major players in the global ecosystem // *Nature reviews Microbiology*. 2007. V. 5(10). 801-812. doi:10.1038/nrmicro1750.
- 227.** Tabassum, R., Shafique, M., Khawaja, K.A., Alvi, I.A., Rehman, Y., Sheik, C. S., Abbaz, Z., Rehman, S.U. Complete genome analysis of a *Siphoviridae* phage TSK1 showing biofilm removal potential against *Klebsiella pneumoniae* // *Scientific reports*. 2018. V. 8(1). P. 17904. doi:10.1038/s41598-018-36229-y.

- 228.** Tan, D., Zhang, Y., Cheng, M., Le, S., Gu, J., Bao, J., Qin, J., Guo, X., Zhu, T. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates and their interactions with lytic phages // *Viruses*. 2019. V. 11(11). P. 1080. doi:0.3390/v11111080.
- 229.** Tanji, Y., Mizoguchi, K., Yoichi, M., Morita, M., Hori, K., Unno, H. Fate of coliphage in a wastewater treatment process // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2002. V. 94. P. 172-174. doi:10.1016/S1389-1723(02)80139-6
- 230.** Taur, Y., Xavier, J.B., Lipuma, L., Ubeda, C., Goldberg, J., Gobourne, A., Lee, Y.J., Dubin, K.A., Soccì, N.D., Viale, A., Perales, M.A., Jenq, R.R., van den Brink, M. R., Pamer, E.G. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation // *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012. V. 55(7). P. 905-914. doi:10.1093/cid/cis580.
- 231.** Thingstad, T. F., Lignell, R. Theoretical models for the control of bacterial growth rate, abundance, diversity and carbon demand // *Aquatic Microbial Ecology*. 1997. V. 13. P. 19-27.
- 232.** Torrella, F., Morita, R.Y. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications // *Applied and Environmental Microbiology*. 1979. V 37. P. 774-778.
- 233.** Touchon, M., Bernheim, A., Rocha, E.P. Genetic and life-history traits associated with the distribution of prophages in bacteria // *The ISME journal*. 2016. V. 10(11). P. 2744-2754.
- 234.** Turner, D., Shkoporov, A.N., Lood, C., Millard, A.D., Dutilh, B.E., Alfenas-Zerbini, P., van Zyl, L.J., Aziz, R.K., Oksanen, H.M., Poranen, M.M., Kropinski, A.M., Barylski, J., Brister, J.R., Chanisvili, N., Edwards, R.A., Enault, F., Gillis, A., Knezevic, P., Krupovic, M., Kurtböke, I., Kushkina, A., Lavigne, R., Lehman, S., Lobočka, M., Moraru, C., Moreno Switt, A., Morozova, V., Nakavuma, J., Reyes Muñoz, A., Rūmnieks, J., Sarkar, B.L., Sullivan, M.B, Uchiyama, J., Wittmann, J., Yigang, T., Adriaenssens, E.M. Abolishment of morphology-based taxa and change to

binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee // Archives of virology. 2023. V. 168(2). P. 74. doi:10.1007/s00705-022-05694-2.

235. Twort, F.W. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses // Lancet. 1915. V. 186. P. 1241-1243..doi:10.1016/S0140-6736(01)20383-3.

236. Valério, N., Oliveira, C., Jesus, V., Branco, T., Pereira, C., Moreirinha, C., Almeida, A. Effects of single and combined use of bacteriophages and antibiotics to inactivate *Escherichia coli* // Virus Research. 2017. V. 240. P. 8-17.

237. Verbeken, G., Huys, I., Pirnay, J.P., Jennes, S., Chanishvili, N., Scheres, J., Górski, A., De Vos, D., Ceulemans, C. Taking bacteriophage therapy seriously: a moral argument // BioMed Research International. 2014. V. 2014. P. 621316. doi:10.1155/2014/621316

238. Verma, V., Harjai, K., Chhibber, S. Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agent // Current Microbiology. 2009. V. 59. P. 274-281. doi: 10.1007/s00284-009-9430-y.

239. Vinga, I., São-José, C., Tavares, P., Santos, M.A. Bacteriophage entry in the host cell // Modern Bacteriophage Biology and Biotechnology. 2006. P. 165-203.

240. Vu, B., Chen, M., Crawford, R.J., Ivanova, E.P. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation // Molecules. 2009. V. 14(7). P. 2535-2554. doi:10.3390/molecules14072535.

241. Wahida, A., Ritter, K., Horz, H.P. The Janus-face of bacteriophages across human body habitats // PLoS Pathogens. 2016. V. 12(6). doi:10.1371/journal.ppat.1005634.

242. Wang, H., Ling, Y., Shan, T., Yang, S., Xu, H., Deng, X., Delwart, E., Zhang, W. Gut virome of mammals and birds reveals high genetic diversity of the family Microviridae // Virus evolution. 2019. V. 5(1). P. vez013. doi:10.1093/ve/vez013.

243. Weigele, P., Raleigh, E.A. Biosynthesis and Function of Modified Bases in Bacteria and Their Viruses // Chemical Reviews. 2016. V. 116 (20). P. 12655-12687. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00114.

- 244.** Weinbauer, M. Ecology of prokaryotic viruses // *MS Microbiology Reviews*. 2014. V. 28. P. 127-181.
- 245.** WHO. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance // World Health Organization. 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf
- 246.** Williams, S. Bacteriophages in soils // *Encyclopedia of Virology*. 1994. P. 121-126.
- 247.** Williams, S., Mortimer, A., Manchester, L. Ecology of soil bacteriophages // *Phage Ecology*. 1987. P. 136-156.
- 248.** Williamson, K.E, Radosevich, M, Wommack, K.E. Abundance and Diversity of Viruses in Six Delaware Soils // *Applied and Environmental Microbiology*. 2005. V. 71(6). P. 3119-3125. doi:10.1128/AEM.71.6.3119-3125.2005.
- 249.** Williamson, K.E., Fuhrmann, J.J., Wommack, K.E., Radosevich, M. Viruses in soil ecosystems: an unknown quantity within an unexplored territory // *Annual review of virology*. 2017. V. 4(1). P. 201-219. doi:10.1146/annurev-virology-101416-041639.
- 250.** Wittebole, X., De Roock, S., Opal, S.M. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens // *Virulence*. 2013. V. 5(1). P. 226-35.
- 251.** Wommack, K.E., Colwell, R.R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2000. V.64. P. 69-114.
- 252.** Woodford, N., Tierno, P.M., Young, K., Tysall, L., Palepou, M.F.I., Ward, E., Painter, R.E., Suber, D.F., Shungu, D., Silver, L.L., Inghima, K., Kornblum, J., Livermore, D.M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York medical center // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004. V. 48(12). P. 4793-4799. doi:10.1128/AAC.48.12.4793-4799.
- 253.** Wu, D., Wu, C., Zhang, S., Zhong, Y. Risk factors of ventilator-associated pneumonia in critically ill patients // *Frontiers in pharmacology*. 2019. V. 10. P. 482. doi:10.3389/fphar.2019.00482.

- 254.** Xiang, Y., Leiman, P.G., Li, L., Grimes, S., Anderson, D.L., Rossmann, M.G. Crystallographic insights into the autocatalytic assembly mechanism of a bacteriophage tail spike // *Molecular cell*. 2009. V. 34(3). P. 375-386.
- 255.** Xu, J., Xiang, Y. Membrane penetration by bacterial viruses // *Journal of virology*. 2017. V. 91(13). doi:10.1128/JVI.00162-17.
- 256.** Yan, J., Mao, J., Xie, J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications // *BioDrugs*. 2014. V. 28 P. 265-274.
- 257.** Yeoh, Y.K., Zuo, T., Lui, G.C., Zhang, F., Liu, Q., Li, A.Y., Chung, A.C., Cheung, C.P., Tso, E.Y., Fung, K.S., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D.S., Chow, K.M., Ng, S.S.S., Li, T.C., Ng, R.W., Yip, T.C., Wong, G.L., Ng, S.C. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19 // *Gut*. 2021. V. 70(4). P. 698-706. doi:10.1136/gutjnl-2020-323020.
- 258.** Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., Qiu, J. Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance // *BioMed research international*. 2015. V. 2015. P. 679109. doi:10.1155/2015/679109.
- 259.** Yutin, N., Benler, S., Shmakov, S.A., Wolf, Y.I., Tolstoy, I., Rayko, M., Antipov, D., Pevzner, P.A., Koonin, E.V. Analysis of metagenome-assembled viral genomes from the human gut reveals diverse putative CrAss-like phages with unique genomic features // *Nature communications*. 2021. V. 12(1). P. 1044. doi:10.1038/s41467-021-21350-w.
- 260.** Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup F.M., Larsen, M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes // *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012. V. 67(11). P. 2640-2644. doi:10.1093/jac/dks261.
- 261.** Zhang, Y., Yao, Z., Zhan, S., Yang, Z., Wei, D., Zhang, J., Li, J., Kyaw, M. H. Disease burden of intensive care unit-acquired pneumonia in China: a systematic review and meta-analysis // *International journal of infectious diseases*. 2014. V. 29. P. 84-90. doi:10.1016/j.ijid.2014.05.030.

- 262.** Zhu, X., Ge, Y., Wu, T., Zhao, K., Chen, Y., Wu, B., Zhu, F., Zhu, B., Cui, L. Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases // *Virus research*. 2020. V. 285. P. 198005. doi:10.1016/j.virusres.2020.198005.
- 263.** Zhvania, P., Hoyle, N.S., Nadareishvili, L., Nizharadze, D., Kutateladze, M. Phage therapy in a 16-year-old boy with Netherton syndrome // *Frontiers in medicine*. 2017. V. 4. P. 94. doi:10.3389/fmed.2017.00094.
- 264.** Zuo, T., Zhang, F., Lui, G.C.Y., Yeoh, Y.K., Li, A.Y.L., Zhan, H., Wan, Y., Chung, A.C.K., Cheung, C.P., Chen, N., Lai, C.K.C., Chen, Z., Tso, E.Y.K., Fung, K. S.C., Chan, V., Ling, L., Joynt, G., Hui, D.S.C., Chan, F.K.L., Chan, P.K.S., Ng, S.C. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization // *Gastroenterology*. 2020. V. 159(3). P. 944-955.e8. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048.
- 265.** Zurabov, F.M., Chernevskaya, E.A., Beloborodova, N.V., Zurabov, A.Y., Petrova, M.V., Yadgarov, M.Y., Popova, V.M., Fatuev, O.E., Zakharchenko, V.E., Gurkova, M.M., Sorokina, E.A., Glazunov, E.A., Kochetova, T.A., Uskevich, V.V., Kuzovlev, A.N., Grechko, A.V. Bacteriophage cocktails in the post-COVID rehabilitation // *Viruses*. 2022. V. 14(12). P. 2614. doi:10.3390/v14122614.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Приложение 1. Классификация штаммов *Klebsiella pneumoniae* с помощью масс-спектрометра MALDI-TOF Microflex и биохимических тестов (MIKROLATEST) с последующим анализом на спектрофотометре Multiskan Ascent. Представлен лучший результат идентификации с помощью программы MALDI Biotyper.

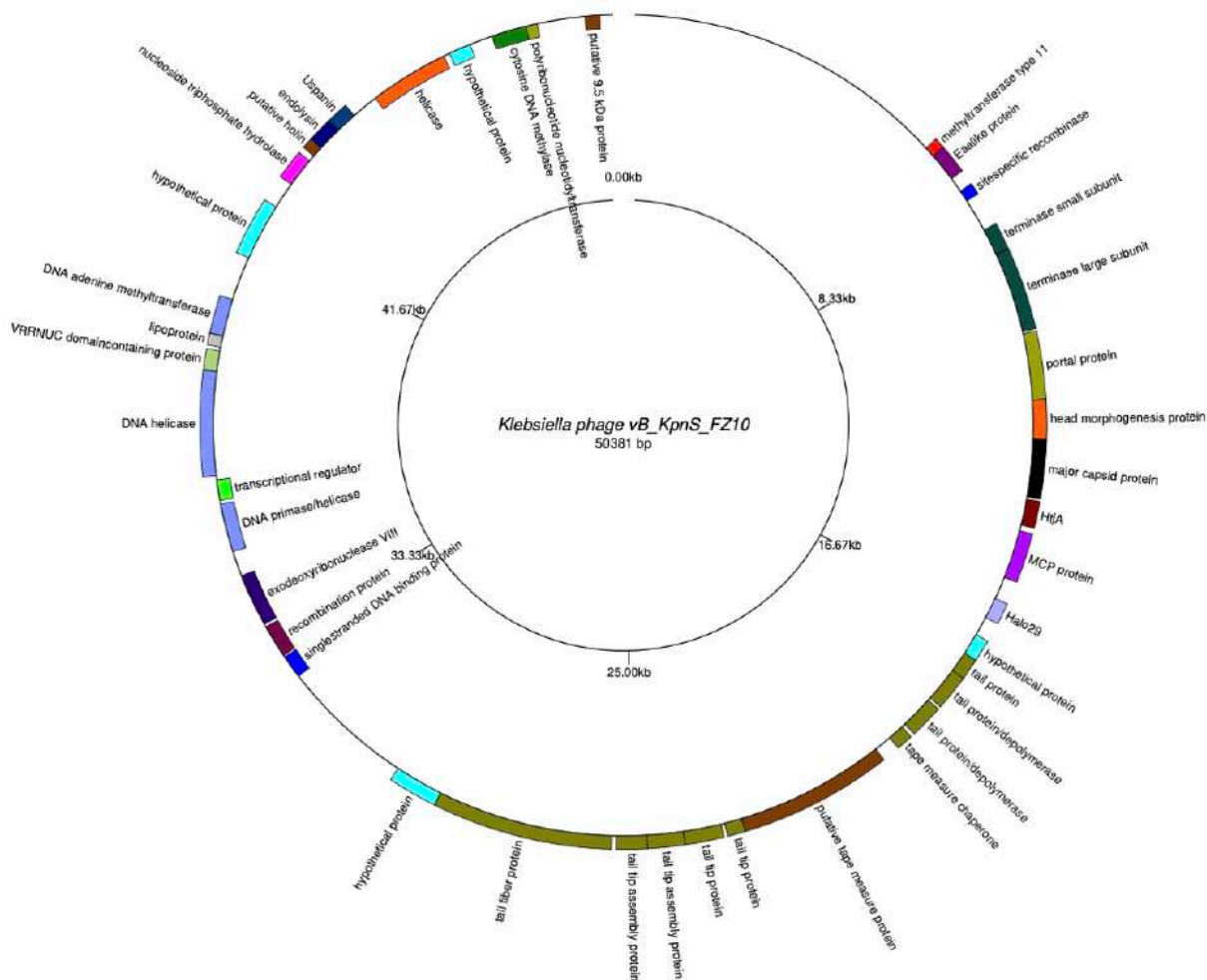
Штамм <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KI A1265	KI 43816	KI 315	KI 3-53	KI 610	KI 7880	KI 327	KI 12-1	KI 27-89	KI 293	KI 263	KI 3273	KI T-14	KI 325
Результат идентификации MALDI Biotyper	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03 B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03 B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> DSM 301041 HAM	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i> 9295_1 CHB	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RV_BA_03_B LBK
Источник выделения	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал	Клинический материал
URE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ORN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LYS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SCI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
ONP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DUL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ART	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SUC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ESL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
бХУ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VPT	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OXI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

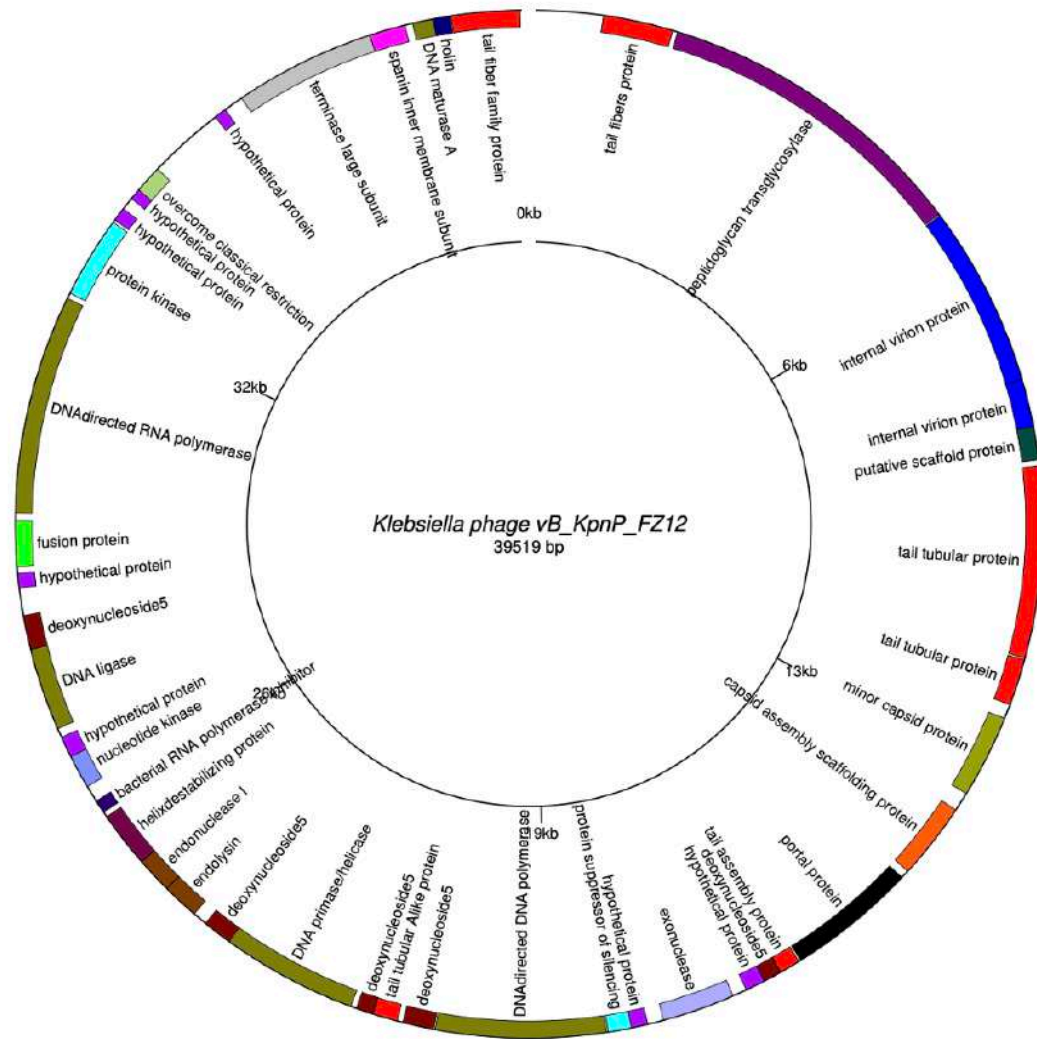
Приложение 2

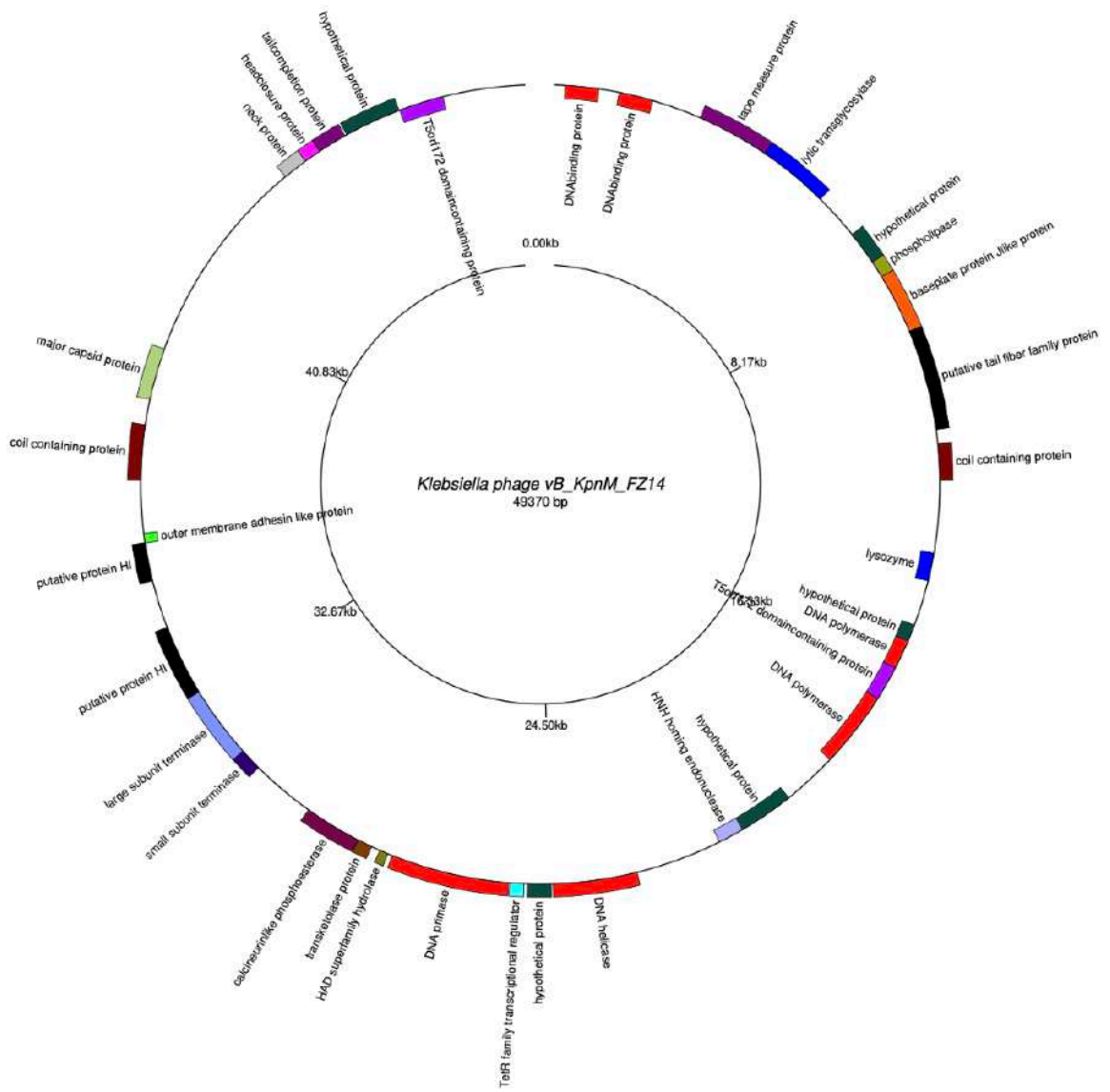
Приложение 2. Результаты анализа чувствительности к антибиотикам штамма *K. pneumoniae* Kl 315 диско-диффузионным методом. Интерпретации сделаны в соответствии с таблицами пограничных значений диаметров зон подавления роста EUCAST. Интерпретации, отмеченные *, даны в соответствии со стандартами CLSI из-за отсутствия таковых в стандартах EUCAST.

№	Антибиотик	Код	Результат, мм	Интерпретация	№	Антибиотик	Код	Результат, мм	Интерпретация
1	AMPICILLIN 10 µg	AMP10	0	R	14	CIPROFLOXACIN 5 µg	CIP5	21	R
2	TETRACYCLINE 30 µg	TE30	22	S	15	RIFAMPICIN 5 µg	RIF5	0	R
3	GENTAMICIN 30 µg	GEN30	19	S	16	NITROFURANTOIN 300 µg	NIT300	13	R*
4	OFLOXACIN 5 µg	OF5	23	S	17	FUSIDIC ACID 10 µg	FC10	0	R
5	ERYTHROMYCIN 15 µg	E15	0	R	18	LINCOMYCIN 15 µg	L15	0	R
6	CHLORAMPHENICOL 30 µg	C30	20	S	19	Tobramycin 10 µg	TOB10	15	R
7	MEROPENEM 10 µg	MRP10	23	S	20	Metronidazole 5 µg	MT5	0	R
8	AZITHROMYCIN 15 µg	AZM15	13	S	21	Moxifloxacin 5 µg	MO5	19	R
9	CEFEPIME 30 µg	CPM30	22	R	24	Amikacin 30 µg	AK30	14	R
10	CEFAZOLIN 30 µg	CZ30	18	R	25	Amoxyclav 30 µg	AMC30	20	S
11	CEFTRIAZONE 30 µg	CTR30	22	R	26	Amoxicillin 30 µg	AMX30	10	R
12	TRIMETHOPRIM 5 µg	TR5	19	S	27	Doxycycline+Hydr 30 µg	DO30	19	S*
13	LEVOFLOXACIN 5 µg	LE5	22	R	28	ERTAPENEM 10 µg	ETP10	24	R

Приложение 3. Подробные карты геномов бактериофагов *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnS_FZ41*, *vB_KpnP_FZ12* и *vB_KpnM_FZ14*, полученные с помощью программы GenoteVx на основе полногеномных последовательностей фагов *Klebsiella pneumoniae* *vB_KpnS_FZ10*, *vB_KpnP_FZ12*, *vB_KpnM_FZ14* и *vB_KpnS_FZ41*, депонированных в GenBank под номерами MK521904, MK521905, MK521906 и MK521907, соответственно.







Приложение 4

Приложение 4. Клинические и лабораторные показатели в контрольной группе. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (ИКР).

Параметры	Контрольная группа Медиана (ИКР)		р-значение	р-значение критерий Манна-Уитни	
	До n = 8	После n = 8	Критерий Уилкоксона До vs После	Фаготерапия vs контрольная группа До	Фаготерапия vs контрольная группа После
Сатурация, процент	98 (97–98)	97 (97–99)	0,999	0,001*	0,019*
Частота дыхательных движений (ЧДД), вдохов в минуту	17 (16–18)	16 (16–17)	0,102	<0,001*	0,297
Частота сердечных сокращений (ЧСС), ударов в минуту	76 (72–85)	77 (70–85)	0,999	0,820	0,050
Билирубин, мкмоль/л	99 (7,0–17,2)	10,9 (7,5–14,4)	0,674	0,162	0,254
Общий белок, г/л	73 (67,6–75,6)	72,3 (70,7–73,5)	0,327	0,074	0,374
Креатинин, мкмоль/л	84 (81–92)	88 (80–94)	0,484	0,853	0,789

Глюкоза, мкмоль/л	5,0 (4,8–5,3)	5,1 (4,7–5,9)	0,208	0,017*	0,138
Холестерин, мкмоль/л	5,36 (4,33–6,00)	4,86 (3,95–5,45)	0,069	0,606	0,204
Лактатдегидрогеназа, ед/л	165 (154–190)	169 (156–197)	0,327	0,124	0,098
Аланинаминотрансфераза, ед/л	15,2 (13,1–22,7)	16,4 (12,6–24,6)	0,484	0,113	0,150
Аспаратаминотрансфераза, ед/л	20,0 (18,9–22,8)	21,6 (19,1–33,5)	0,123	0,334	0,821
С-реактивный белок, мг/л	0,1 (0,1–0,8)	0,75 (0,63–0,88)	0,021*	0,190	0,009*
Общая бактериальная масса	$4 \cdot 10^{13}$ ($2 \cdot 10^{13}$ – $1,6 \cdot 10^{14}$)	$1,5 \cdot 10^{13}$ ($8 \cdot 10^{12}$ – $2 \cdot 10^{13}$)	0,035*	0,611	0,237
<i>Lactobacillus spp.</i>	$6 \cdot 10^6$ ($1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^8$)	$7,5 \cdot 10^6$ ($1 \cdot 10^6$ – $6 \cdot 10^7$)	0,575	0,707	0,237
<i>Bifidobacterium spp.</i>	$4,5 \cdot 10^{10}$ ($9 \cdot 10^9$ – $2 \cdot 10^{11}$)	$1,5 \cdot 10^{18}$ ($1,5 \cdot 10^9$ – $7 \cdot 10^{10}$)	0,058	0,411	0,674
<i>Escherichia coli</i>	$3,5 \cdot 10^8$ ($6 \cdot 10^7$ – $1 \cdot 10^9$)	$4,5 \cdot 10^7$ ($2,5 \cdot 10^6$ – $2 \cdot 10^8$)	0,012*	0,674	0,295
<i>Bacteroides spp.</i>	$4 \cdot 10^{13}$ ($2 \cdot 10^{13}$ – $1 \cdot 10^{14}$)	$1,5 \cdot 10^{13}$ ($8 \cdot 10^{12}$ – $2 \cdot 10^{13}$)	0,035*	0,611	0,237

<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	5*10 ¹¹ (4*10 ¹¹ – 4*10 ¹²)	1,5*10 ¹¹ (5*10 ¹⁰ – 3*10 ¹¹)	0,017*	0,006*	0,947
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-
<i>Candida spp.</i>	7*10 ⁵ (7*10 ⁵ – 7*10 ⁵)	-	-	0,999	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	4*10 ⁶ (3*10 ⁵ – 4*10 ⁶)	5*10 ⁶ (1*10 ⁶ – 5*10 ⁶)	0,655	0,262	0,183
<i>Enterococcus spp.</i>	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	3,4*10 ⁹ (8*10 ⁷ – 1,1*10 ¹⁰)	2*10 ⁹ (1*10 ⁸ – 4*10 ⁹)	0,173	0,590	0,664
<i>Akkermansia muciniphila</i>	-	1,5*10 ⁸ (1*10 ⁸ – 2*10 ⁸)	-	-	0,533
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	-	-	-	-
<i>Proteus spp.</i>	2*10 ⁹ (2*10 ⁹ – 2*10 ⁹)	-	-	0,500	-
<i>Enterobacter spp.</i>	1*10 ⁸ (5*10 ⁶ – 2*10 ¹⁰)	4*10 ⁷ (8*10 ⁶ – 1*10 ⁹)	0,600	0,078	0,288
<i>Citrobacter spp.</i>	-	-	-	-	-

<i>Fusobacterium nucleatum</i>	7,5*10 ⁶ (5*10 ⁶ – 7,5*10 ⁶)	3*10 ⁵ (3*10 ⁵ – 3*10 ⁵)	-	0,133	0,580
<i>Parvimonas micra</i>	-	-	-	-	-
Соотношение <i>Bacteroides fragilis</i> group/ <i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	100 (37– 779)	163 (100–200)	1,000	0,172	0,999
Гемоглобин, г/л	137 (116;150)	130 (117;154)	0,889	0,452	0,169
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,4 (5,1– 5,8)	5,5 (4,8–5,9)	0,735	0,463	0,514
Скорость оседания эритроцитов (СОЭ), мм/ч	14,0 (8,0– 25,0)	12,5 (6,0–20,3)	0,362	0,563	0,950

Приложение 5

Приложение 5. Оценка объема легких с помощью компьютерной томографии у лиц, получавших терапию бактериофагами.

ID	Ретроспективные данные Повреждение легких по данным КТ (%)	После фаготерапии						
		Повреждение легких (%)	Объем легких (см ³)	Повреждение легких (см ³)	Повреждение левого легкого (см ³)	Повреждение левого легкого (%)	Повреждение правого легкого (см ³)	Повреждение правого легкого (%)
1	20	9	5148	461	196	8	265	11
2	25	11	3759	400	226	13	174	9
3	5	1	4276	60	32	2	29	1
4	10	1	4668	40	16	1	24	1
5	40	2	6246	101	53	2	54	2
6	10	2	6283	142	63	2	79	3
7	20	1	4609	47	19	1	27	1
8	80	30	2700	783	418	33	366	26
9	40	1	6153	59	25	1	34	1
10	25	6	3229	179	62	4	117	7
11	44	2	6130	138	63	2	76	2
12	60	14	3531	494	209	13	285	15
13	25	8	4702	390	265	13	125	5
14	75	42	3624	1475	703	43	772	41
15	25	4	3607	126	59	4	67	4
16	20	1	4512	34	20	1	14	1
17	15	1	8016	117	65	1	52	1
18	10	3	6979	232	80	2	153	5
19	15	5	6535	303	121	4	183	6
20	68	26%	3220	800	436	22	364	31