

Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

Е. Н. Сятчихина, П. А. Набатников, С. А. Коровкин, А. В. Катлинский, Г. М. Игнатъев

ООО «ФОРТ» (Биофармацевтическая компания ФОРТ), Москва, Россия

Поступила 06.04.2016. Принята к публикации 22.04.2016.

Представлены результаты работы по выделению и изучению биологических свойств бактериофагов, активных по отношению к бактериям родов *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. Показаны результаты исследований по изучению: литической активности, определению спектра литического действия, анализу чувствительности к повреждающим факторам внешней среды: значению рН, температуре, лиофильному высушиванию. Приведены данные молекулярно-генетических исследований.

Ключевые слова: бактериофаги; производство бактериофагов; литическая активность.

Библиографическое описание: Сятчихина ЕН, Набатников ПА, Коровкин СА, Катлинский АВ, Игнатъев ГМ. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение* 2016; 16 (2): 90–95.

Интенсивно растущая антибиотикорезистентность микроорганизмов, способствующая увеличению числа гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений различной локализации, и требующая значительных финансовых затрат антибактериальная терапия диктует необходимость поиска новых эффективных способов и средств воздействия на штаммы с множественной лекарственной устойчивостью [1–3].

Несмотря на интенсивную работу фармацевтических компаний, за последние 30 лет не было найдено новых классов антибиотиков. В связи с этим, в настоящее время идет поиск других подходов к решению этой проблемы. Одним из результатов такого поиска является вновь возникший интерес к возможностям терапевтического использования бактериофагов – вирусов, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, принадлежащих к одному штамму или антигенно-гомологичным штаммам одного вида или рода [4–6].

Помимо терапевтического применения бактериофагов, эффективность которых подтверждена клиническими исследованиями и данными в практической медицине, фаги используются для обработки хирургических помещений, медицинского инструментария и оборудования; на предприятиях пищевой промышленности: полуфабрикатов и готовой продукции, а также непосредственно человеком в виде пищевых добавок, лечебных препаратов, гелей и мазей [7–10].

При местном использовании фаги имеют особое преимущество в том, что они продолжают размножаться до тех пор, пока присутствует инфекция, в противоположность им концентрация антибиотиков быстро снижается по мере удаления от поверхности [11]. В. R. Levin и J. J. Bull предлагают использование фаговой терапии только для снижения уровня микробной обсемененности в очаге ин-

фекции, тем самым помогая защитным силам организма справиться с инфекционным процессом [12, 13].

Возможность применения бактериофагов в пищевой промышленности, сельском хозяйстве и практическом здравоохранении связана с изучением их биологических свойств на соответствие ряду требований:

1) в состав препарата должны быть включены строго вирулентные бактериофаги с широким спектром литического действия, обуславливающие полный лизис бактериальных штаммов. В геноме бактериофагов не должно содержаться детерминант генов токсинов или факторов вирулентности;

2) препарат бактериофагов должен быть безопасным и не содержать компонентов бактериальных клеток и эндотоксинов;

3) препарат должен содержать фаги в высоком титре и сохранять литическую активность в течение заявленного срока годности;

4) препарат должен содержать несколько видов бактериальных вирусов, отличающихся особенностью взаимодействия с бактериальной клеткой. Использование такого подхода значительно снижает возможность возникновения фогорезистентных форм в популяции патогенных микроорганизмов [14–17].

Таким образом, лечебный препарат должен представлять собой комбинацию различных бактериальных вирусов, отобранных по вышеуказанным критериям. Соответствие бактериофагов установленным требованиям позволяет рассматривать их в качестве кандидатов для включения в терапевтические препараты [18].

Цель исследования — формирование производственной коллекции бактериофагов бактерий видов *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, энтеропатогенные *Escherichia coli*; изучение основных биологических свойств.

Материалы и методы

Выделение бактериальных культур проводили из клинических образцов бактериологических диагностических лабораторий, стационаров лечебных учреждений Москвы и Московской области, стоки животноводческих хозяйств Калужской области в течение 2012–2014 гг. Коллекцию бактериальных штаммов *Klebsiella pneumoniae* формировали из штаммов, выделенных из клинического материала, от больных с тяжелыми формами заболевания, плохо поддающимися антибиотикотерапии, полученного из различных лечебных учреждений: НИИ нейрохирургии им. Н. Н. Бурденко, инфекционная клиническая больница № 1 и № 3, консультационно-диагностический центр института МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского (Москва), Центральные районных больниц (Московская область, Санкт-Петербург, Надым).

При отборе производственных бактериальных штаммов учитывали соответствие их культуральным и морфологическим свойствам каждого вида. Биохимическое сходство видовым признакам проводили с помощью биохимической тест-системы API 20E, («BIOMERIEUX», Франция).

Лизогенное состояние бактериальных штаммов определяли методом индукции профага, посредством добавления в культуру митомицина С и облучения коротковолновой ультрафиолетовой лампой. Спонтанно лизировавшиеся бактериальные штаммы выбраковывали.

Оценку чувствительности штаммов к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом (по Keurby-Bauer). В антибиотикограмму были включены доксициклин, левомицетин, цiproфлоксацин, пefлоксацин, норфлоксацин, меропенем, имипенем, цефуроксим, гентамицин, тобрамицин, амикацин, ванкомицин, ампициллин, ампициллин/сульбактам.

Источником штаммов бактериофагов являлись сточные воды и клинический материал Московской и Челябинской областей. Клебсиеллезные бактериофаги выделяли из клинического материала (промывные воды интубационных и дренажных трубок, аппаратов искусственной вентиляции легких, перевязочные средства из отделения гнойной хирургии, мазки гнойного отделяемого из ран), проб сточных вод из канализационной системы и очистных сооружений, проб стоков животноводческих комплексов, проб воды из природных водоемов.

Исследуемый материал засеивали с бактериальными культурами штаммов-хозяев в питательный бульон Луриа-Бертани (LB): Nutrient Broth (NB) («HIMEDIA», Индия

или псевдомонадный бульон на основе пептона. После инкубации, обработки 1% хлороформом и удалением клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием, количество фаговых частиц в надосадочной жидкости определяли методом Грациа на индикаторных культурах. Штаммы, дающие негативные зоны в разведениях выше 1/100, считали чувствительными и рекомендовали к включению в производственную коллекцию.

Для проведения рестрикционного анализа ДНК из фаговых частиц выделяли посредством разрушения протеиназой К в растворе SDS. Экстракцию фаговой ДНК проводили смесью фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (24:24:1) с последующим переосаждением этиловым спиртом. Препараты выделенной ДНК контролировали электрофоретически в агарозном геле в трис-борат-EDTA буфере. После определения концентрации полученной ДНК на спектрофотометре Genesys 6 UV-Visible («Thermo Scientific») проводили гидролиз различными эндонуклеазами рестрикции, посредством метода электрофореза в 0,8–1,2%-ном агарозном геле в трис-боратном буфере. Визуализацию проводили после окрашивания агарозных гелей в растворе бромистого этидия. Для документирования полученных результатов использовали систему DOCPRINT («Vilber Lourmat»).

Изучение геномной ДНК бактериофагов и их штаммов-хозяев проводили методом ПЦР с праймерами на гены ряда бактериальных токсинов, в том числе гены шига-подобных токсинов I и II типов, термостабильного и термолабильного энтеротоксинов. Детекцию генов вирулентности проводили с помощью ПЦР в классическом режиме и в режиме «реального времени». Структура праймеров представлена в таблице 1.

ПЦР в режиме «реального времени» реализовывали в виде двух мультиплексных реакций. В первой реакции комбинировали праймеры и зонды на гены термолабильного и термостабильного токсинов (lt и st соответственно). Во второй реакции комбинировали праймеры и зонды на гены шига-подобных токсинов stx1 и stx2. Регистрацию результатов амплификации проводили по каналам FAM и ROX. Амплификатор CFX96 («BIO-RAD», США).

Для выявления генов синтеза цито- и энтеротоксинов в геноме производственных бактериальных штаммов также использовали метод ПЦР в режиме «реального времени».

ДНК бактериальных штаммов *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* и *K. pneumoniae* выделяли методом термического лизиса из агаро-

Таблица 1. Праймеры и зонды, использованные в ПЦР-РВ для детекции генов вирулентности

Праймеры, зонды	T _m , °C	Нуклеотидная последовательность	Ген-мишень
stx1F stx1R stx1Probe	60	5'-TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG-3' 5'-CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC-3' 5'-CTGGATGATCTCAGTGGGGCTTCTTATGTAA-3'	Ген шига-подобного токсина типа I
stx2 F stx2 R Stx2Probe	60	5'-TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG-3' 5'-CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC-3' 5'-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC-3'	Ген шига-подобного токсина типа II
lt F lt R lt-Probe	56	5'-ATTAAgAgCggCgAAAC-3' 5'-CTCGGTCAGATATGTGATTC-3' 5'-TgTgTCCTTCATCTTCAATggC-3'	Ген термолабильного энтеротоксина
st F st R st-Probe	56	5'-TTTCAATgCAAATATCATCgAg-3' 5'-CTTCTgTgTTTgCAATCTTg-3' 5'-TCATTgCCCACAATACAACgga-3'	Ген термостабильного энтеротоксина

вой культуры и исследовали в ПЦП-РВ со специфическими праймерами и зондами.

Лиофильное высушивание бактериофагов проводили в течение 24 ч на сублимационном оборудовании (EPSILON 2-60, «CHRIST», Германия), предварительно добавив в фаголизаты защитную среду: сахароза 20%, желатин 2%.

В качестве физического фактора изучали действие на фаги высокой температуры. В качестве химического фактора — действие pH.

Устойчивость фагов к температуре определяли по следующей методике: фаголизаты по 50 мкл в герметичных пробирках типа Эппендорф инкубировали 3 ч при комнатной температуре (25°C); в морозильной камере бытового холодильника (минус 20°C) и в твердотельном термостате (65°C). Титр фагов определяли по методу Грация на газонах чувствительных штаммов.

При определении устойчивости фагов к действию pH среды использовали: а) 0,1 М цитратный буфер, pH 3,6; б) 0,1 М карбонатный буфер, pH 9,6; в) фаговый SM буфер, pH 8,0 (контроль).

К 0,9 мл буфера добавляли 0,1 мл фаголизата. Инкубировали при комнатной температуре. Через 15 мин и через 1 ч отбирали пробы по 0,1 мл и вносили их в пробирки с 0,9 мл фагового SM буфера для нейтрализации pH. Быстро перемешивали и определяли титр бактериофагов титрованием по методу Грация на индикаторных культурах.

Результаты и обсуждение

Одним из первых этапов исследований, связанных с выделением и характеристикой вирусов бактерий, является создание репрезентативной коллекции бактериальных штаммов — хозяев бактериофагов.

В процессе исследований были созданы рабочие коллекции штаммов *Pseudomonas aeruginosa* (45 штаммов), *Proteus mirabilis* и *Proteus vulgaris* (39 штаммов), *Staphylococcus epidermidis* (24 штамма), *Staphylococcus aureus* (41 штамм), *Klebsiella pneumoniae* (47 штаммов) и *Escherichia coli* (33 штамма).

В результате проведенных экспериментов установлено, что исследованные изоляты характеризуются типичными морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

При оценке бактериальных штаммов на содержание профага было показано, что более 50% свежесделанных штаммов *Ps. aeruginosa* и *S. aureus* оказались лизогенными. В 20% штаммов *E. coli* в результате обработки митомцином С также индуцируется выход профага.

Анализ антибиотикограмм к тестируемым препаратам выявил наличие чувствительности штаммов *E. coli* M2 к широкому спектру антибиотиков. Из 13 испытанных антибактериальных препаратов штамм оказался устойчивым только к ванкомицину и слобочувствительным к левомицетину и аминацину.

Штаммы *P. mirabilis* M3 и *P. vulgaris* M10 устойчивы к доксициклину, левомицетину, ванкомицину и ампициллину. Штамм *Ps. aeruginosa* 3093 устойчив к доксициклину, левомицетину, ванкомицину, ампициллину, ампициллин/сульбактаму, цефуроксиму.

Штаммы *S. epidermidis* № 3 и *S. aureus* 2072 устойчивы только к ванкомицину. Штамм *S. aureus* 2075 устойчив к ванкомицину, тобрамицину, гентамицину. Штамм *S. saprophyticus* № 1 устойчив к левомицетину, пемфлосацину, ципрофлоксацину, норфлоксацину, ванкомицину.

Большинство выделенных культур имеют множественную лекарственную устойчивость именно к тем антибиотикам, которые рекомендованы при лечении заболеваний, вызванных клебсиеллами (бета-лактамы, карбопенемы и цефалоспорины последних поколений и др.). В геноме клебсиеллезных бактерий нескольких штаммов (например, штаммы 2182, 2184, В-71, В-697-2, В-1956, i-6208) выявлены гены бета-лактамаз разного типа, обуславливающих устойчивость к антибиотикам групп бета-лактамов, карбопенемов и цефалоспоринов, что крайне ограничивает перечень антибиотиков, пригодных для лечения больных с такой инфекцией. Наличие в коллекции таких штаммов позволяет целенаправленно искать бактериофаги, эффективные при заболеваниях, вызванных возбудителями с множественной лекарственной устойчивостью.

Кроме того, были выделены штаммы *K. pneumoniae* с «гипермукоидным» фенотипом, способные вызывать заболевания, характеризующиеся крайне тяжелым течением и низкой эффективностью обычных методов лечения (например, штамм i6208).

Все производственные и контрольные штаммы бактерий лиофильно высушены и депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск».

Бактерии из сформированной коллекции были использованы для выделения, наработки и оценки активности новых специфических бактериофагов.

Создание производственной коллекции вирулентных бактериофагов проводили на основании результатов, полученных при изучении литического спектра фагов, способности нарабатываться в жидкой среде, урожайности, литической активности в отношении гомологичных и гетерологичных бактериальных штаммов, а также данных молекулярно-генетического анализа.

Бактериофагу *Escherichia coli*

Для формирования фагового «коктейля» были выделены три *E. coli*-специфичных фага, получивших наименование ЕсП, Ес8 и Ес12. На газонах чувствительных культур бактериофаги образуют прозрачные зоны лизиса диаметром около 1 мм. При оценке спектра литического действия бактериофагов ЕсП, Ес8 и Ес12 с использованием 33 штаммов *E. coli* была выявлена чувствительность, составляющая 72,7, 69,7 и 60,6% соответственно.

Следует отметить, что бактериофаги Ес8 и Ес12 способны лизировать шигатоксин продуцирующие штаммы (STEC) серотипов O114 (eae+stx2+) и O128 (eae+stx1+stx2+), отнесенные во вторую группу патогенности.

Бактериофагу *Pseudomonas aeruginosa*

В состав производственных бактериофагов *P. aeruginosa* включены фаги РаК4, РаК8 и Ра26. Бактериофаги образуют прозрачные зоны лизиса диаметром 2–3 мм на бактериальных газонах 40, 31 и 51% исследованных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* соответственно.

Бактериофагу *Staphylococcus epidermidis*

Методом обогащения выделены бактериофаги Sep3 и Sep28, обладающие широким спектром литического действия. Эти фаги формируют негативные колонии на культурах 50,0 и 45,8% исследованных штаммов *S. epidermidis*.

Бактериофагу *Staphylococcus aureus*

При исследовании 37 клинических и природных образцов выделено три новых бактериофага SCH6, StA37 и StAK2, которые наряду с вышеописанными бактериофагами рассматриваются для включения в состав комплексных антибактериальных препаратов. Оценку спектра литического действия выделенных бактериофагов проводили на панели, включающей 41 штамм *S. aureus*.

На газоне чувствительной культуры бактериофаги StAK2, SCH6 и StA37 формируют прозрачные негативные колонии до 2 мм в диаметре без ореола.

Как следует из проведенных исследований, выделенные бактериофаги лизируют 70–75% штаммов *Staphylococcus aureus*.

Бактериофагу *Klebsiella pneumoniae*

Для выделения бактериофагов и характеристики их литического спектра использовали рабочую коллекцию из 47 штаммов *K. pneumoniae*.

При исследовании первичного материала были выделены 17 клебсиеллезных бактериофагов, среди которых отобрали три бактериофага KP5030, KPV831 и KPV21.

Согласно представленным данным, бактериофаги KP5030, KPV831 и KPV21 лизируют 46,8, 27,6 и 38,3% бактериальных штаммов соответственно.

В качестве материала для молекулярно-генетических исследований методом рестрикционного анализа использовали 11 препаратов ДНК вновь выделенных бактериофагов, специфичных к *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus mirabilis* (2), *Proteus vulgaris* (2), *Staphylococcus epidermidis* (1), *Staphylococcus aureus* (2), *Escherichia coli* (1), *Klebsiella pneumoniae* (2).

В результате проведенных экспериментов установлено, что в лизатах исследованных штаммов *Klebsiella pneumoniae* (2184, 5021, 5030 5043, B-697-2, B-71), *Staphylococcus aureus* (2072, 2073, 2042, 2074, 2075), *Staphylococcus epidermidis* (4, 5, 68, 76, B331), *Pseudomonas aeruginosa* (3076, 3092, 3095, 3096, 3093), *Proteus* (M5, M8, M10, M28, M30; M32, M33, M34, M35, M37) и *Escherichia coli* (M2, M14, M7, M19, M22) специфические участки генов токсинов stx1, stx 2, lt, st не выявляются. Олигонуклеотидные праймеры и зонды представлены в таблице 1.

Таким образом, было показано отсутствие генов, детерминирующих синтез шига-подобных токсинов Stx1 и Stx2 (термолабильного и термостабильного энтеротоксинов), также в геномах исследованных бактериофагов.

Для генетического картирования ДНК бактериофагов использовали эндонуклеазы рестрикции, расщепляющие нуклеотидные последовательности длиной 6–8 нуклеотидов с различным GC-составом.

В таблице 2 суммированы данные по рестрикционному анализу ДНК всех бактериофагов, отобранных в качестве производственных.

Изучение чувствительности перспективных фагов к повреждающим факторам внешней среды

В экспериментах по изучению влияния температуры на бактериофаги установлено, что к снижению титра всех исследуемых фагов приводит инкубация их при температуре 65°C (табл. 3). Наиболее термолабилен бактериофаг StAK2 *S. aureus* в условиях температуры, равной 65°C.

В экспериментах по изучению чувствительности бактериофагов к pH среды установлено, что титр исследуемых бактериофагов, за исключением фага Sep3, практически не меняется в случае инкубирования при значениях pH от 3 до 9 в течение 1 ч. Бактериофаг Sep3 инактивируется при инкубировании в буферном растворе при pH 3,0. Через 15 мин инкубации в этих условиях фаг полностью утрачивает литическую активность по отношению к тест-штамму.

Таблица 2. Рестрикционный анализ ДНК бактериофагов

Бактерии, чувствительные к бактериофагу	Бактериофаг	Рестриктазы, дающие специфические картины гидролиза	Отсутствие гидролиза
<i>P. aeruginosa</i>	Pa26	<i>EcoRI, KspAI, NdeI, EcoRV, HindIII</i>	<i>Lgul, BamHI</i>
	PaK4	<i>NdeI, Scal, AanI, EcoRI</i>	<i>Lgul</i>
	PaK8	<i>Scal, EcoRI</i>	<i>AanI</i>
<i>K. pneumoniae</i>	KPV21	<i>EcoRV, HindIII, Scal</i>	<i>Scal, Lgul</i>
	KPV831	<i>EcoRV, HindIII, Lgul, Scal</i>	<i>Scal</i>
	K5030	<i>AanI, EcoRI</i>	<i>Lgul, KpnI</i>
<i>E. coli</i>	EcП	<i>KspAI, HindIII</i>	<i>EcoRI, EcoRV, Lgul</i>
	Ec8	<i>AanI, SmaI</i>	<i>Scal, Lgul, Eco105I, Bst1107I, EcoRI, KspAI</i>
	Ec12	<i>AanI, SmaI</i>	<i>Scal, Lgul, Eco105I, Bst1107I, EcoRI, KspAI</i>
<i>S. aureus</i>	SCH6	<i>EcoRV, EcoRI, KspAI, NdeI</i>	<i>HindIII, Lgul</i>
	StA37	<i>HindIII, EcoRI, KspAI, NdeI</i>	<i>Lgul</i>
	StAK2	<i>Scal, AanI, EcoRI</i>	<i>KpnI</i>
<i>S. epidermidis</i>	Sep28	<i>Scal</i>	<i>EcoRV, Lgul</i>
	Sep3	<i>Scal, EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>
<i>Pr. vulgaris</i>	Pv2	<i>KspAI, Scal</i>	<i>EcoRV, HindIII, Lgul</i>
	Pv4	<i>KspAI, Scal</i>	<i>EcoRV, Lgul</i>
	Pv1	<i>Scal, AanI, EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>
<i>Pr. mirabilis</i>	Pm9	<i>HindIII, Scal, Lgul</i>	<i>EcoRV</i>
	Pm10	<i>Scal, Lgul</i>	<i>BamHI</i>
	Pm3	<i>Scal, AanI, EcoRI</i>	<i>Bst1107I</i>

Таблица 3. Влияние температуры на стабильность бактериофагов

№ п/п	Бактериофаг	Бактериальный тест-штамм	Титр фага, БОЕ/мл		
			25°C	-20°C	65°C
1	PaK8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 175	$5 \cdot 10^{10}$	$3 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^3$
2	Pm3	<i>Proteus mirabilis</i> M32	$6 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^4$
3	Pv 1	<i>Proteus vulgaris</i> M10	$5 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^4$
4	StAK2	<i>Staphylococcus aureus</i> 2072	$5 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	0
5	Sep3	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 3	$5 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^4$
6	KP5030	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 5030	$3 \cdot 10^{10}$	$2,6 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^7$

В результате проведенной работы по лиофилизации бактериофагов и определению титров бактериальных вирусов после лиофильного высушивания показано, что наиболее стабильными при лиофилизации оказались бактериофаги KP5030 (*Klebsiella pneumoniae* 5030), StaK2 (*Staphylococcus aureus* 2072) и Sep3 (*Staphylococcus epidermidis* 3), титры которых после лиофилизации практически не изменились. Бактериофаги PaK8 (*Pseudomonas aeruginosa* 175) при лиофилизации снижают литическую активность в 10–100 раз. В случаях Pm3 (*Proteus mirabilis* M32), Pv1 (*Proteus vulgaris* M10) наблюдается снижение титра фагов после лиофилизации на четыре порядка.

В качестве заключения...

Становится очевидным, что настало время для более внимательного рассмотрения потенциала фаготерапии как через поддержку новых исследований, так и через тщательное изучение уже доступных данных. Как заключают Barrow и Soothill «Фаготерапия может быть очень эффективна, и в определенных условиях имеет уникальные преимущества перед антибиотиками» [6].

На основании полученных данных установлено, что для достижения поставленной цели по формированию производственной коллекции бактериофагов и штаммов-хозяев необходимо придерживаться определенных критериев: каждый микроорганизм, перспективный для включения в коллекцию, должен быть тщательно изучен по показателям: биологические свойства и молекулярно-генетический анализ структуры генетического материала.

Проведенные исследования позволили установить, что выделенные бактериофаги обладают литической активностью к индикаторным культурам, которая изменяется при воздействии таких факторов, как температура, лиофильное высушивание, воздействие водородного показателя.

В заключение следует отметить, что важным моментом является сохранение соответствия препаратов бактериофагов этиологической структуре возбудителей инфекционных заболеваний, достигаемой за счет постоянной адаптации бактериофагов к циркулирующим, а также резистентным штаммам. Для этого необходимо обновление входящих в препарат рас бактериофагов, лизирующих вновь возникающие фагоустойчивые клоны возбудителей. Значительным условием, обеспечивающим эффект фаготерапии, является изолирование бактериального штамма, определение чувствительности выделенного штамма к препарату, либо индивидуальный подбор фага для лечения [19–23].

Научные исследования проводились при финансовой поддержке ООО «ФОРТ» на базе ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболонск.

Выражаем глубокую благодарность за выполнение работы коллективу лаборатории молекулярной биологии: канд. биол. наук В. В. Вережкину, канд. биол. наук В. М. Красильниковой, В. А. Баннову, В. П. Мякиной, В. П. Левчуку, заведующему лабораторией канд. биол. наук Н. В. Воложанцеву и заведующему отделом д-ру вет. наук, проф. Э. А. Светочу.

Литература

1. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins—application approaches. *Curr Med Chem*. 2015; **22**(14): 1757–73.
2. Косинец АН, Фролова АВ, Булавкин ВП, Окулич ВК. Антибиотикорезистентность. Новые возможности антибактериального воздействия. *Вестник ВГМУ* 2014; (2): 70–7.
3. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*. 2015; **89**(15): 7449–56.
4. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература; 1961.
5. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 1996; **147**: 881–98.
6. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 1997; **5**: 268–71.
7. Алешкин АВ, Воложанцев НВ, Светоч ЭА. и др. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов. *Астраханский медицинский журнал* 2012; **7**(3): 31–9.
8. Хайруллин И. Н. Роль микрофлоры хирургического отделения в развитии послеоперационных осложнений хирургических ран и их коррекция с помощью бактериофагов: автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань; 2004.
9. Круглова ЛС. Поливалентные бактериофаги: перспективы применения в дерматологии. *Клиническая дерматология и венерология* 2015; (1): 72–6.
10. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris J. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(3): 649–59.
11. Кюттер Э. Фаговая терапия: бактериофаги как антибиотики. СПб.; 2001.
12. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2004; **2**(2): 166–73.
13. Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol*. 2006; **296**(1): 5–14.
14. Зурабов АЮ, Каркищенко НН, Попов ДВ, Жиленьков ЕЛ, Попова ВМ. Создание отечественной коллекции бактериофагов и принципы разработки лечебно-профилактических фаговых препаратов. *Биомедицина* 2012; (1): 134–8.
15. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*. 2007; **29**: 995–1003.
16. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyayama K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; **64**: 270–4.
17. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Harald Brüssow H. In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; **48**: 2558–69.
18. Дарбеева ОС, Майская ЛМ, Обухов ЮИ. Доклинические исследования бактериофагов. В кн.: Миронов АН, ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (иммунобиологические лекарственные препараты). Часть II. М.: Гриф и К; 2012. С. 237–40.
19. Thiel K. Old dogma, new tricks — 21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol*. 2004; **22**(1): 31–6.
20. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011; **14**(5): 524–31.
21. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997; **5**(7): 268–71.
22. Тикунова НВ, Власов ВВ. Бактериофаги — враги наших врагов. *Наука из первых рук* 2013; **2**(50): 58–69.
23. Бондаренко ВМ. Новые горизонты бактериофагии. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* 2013; (4): 1.

Об авторах

ООО «ФОРТ» (Биофармацевтическая компания ФОРТ). Российская Федерация, 127254, Москва, ул. Добролюбова, 3, стр. 1.

Сятчихина Евгения Николаевна. Микробиолог отдела разработки МИБП.

Набатников Павел Алексеевич. Начальник отдела разработки МИБП.

Коровкин Сергей Анатольевич. Заместитель генерального директора, д-р мед наук, профессор.

Катлинский Антон Викентьевич. Генеральный директор, д-р биол. наук.

Игнатьев Георгий Михайлович. Заместитель генерального директора по науке, д-р мед. наук, профессор.

Адрес для переписки: Сятчихина Евгения Николаевна; 993994@mail.ru

Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*

E. N. Siatchikhina, P. A. Nabatnikov, S. A. Korovkin, A. V. Katlinsky, G. M. Ignatyev

«FORT» LLC (Biopharmaceutical company FORT), Moscow, Russia

The present article submits the results of work on the isolation and study of biological properties of bacteriophages, active against *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. It also shows the results of the study such as: lytic activity, the definition of the spectrum of lytic action, sensitivity to damaging environmental factors: pH, temperature, freeze drying. The data of molecular genetic studies are provided.

Key words: bacteriophages; bacteriophage production; lytic activity.

For citation: Siatchikhina EN, Nabatnikov PA, Korovkin SA, Katlinsky AV, Ignatyev GM. Selection criteria for bacterial strains and bacteriophages for the formation of industrial collection of specifically lysing bacteria: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment* 2016; 16 (2): 90–95.

References

1. Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins-application approaches. *Curr Med Chem*. 2015; **22**(14): 1757–73.
2. Kosinets AN, Frolova AV, Bulavkin VP, Okulich VK. Antibiotic resistance. New features of the antibacterial effects. *Vestnik VGMU* 2014; (2): 70–7 (in Russian).
3. Pires DP, Vilas Boas D, Sillankorva S, Azeredo J. Phage Therapy: a Step Forward in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *J Virol*. 2015; **89**(15): 7449–56.
4. Adams M. Bacteriophages. Moscow: Inostrannaya literatura; 1961 (in Russian).
5. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist* 1996; 147: 881–98.
6. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage Therapy and Prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of the potential. *Trends Microbiol* 1997; 5: 268–71.
7. Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, et al. Bacteriophages and means probiotics and decontamination of food products. *Ast-rahanskiy meditsinskiy zhurnal* 2012; **7**(3): 31–9 (in Russian).
8. Khairullin IN. The role of the microflora in the surgical department in the development of postoperative complications of surgical wounds and their correction by means of bacteriophages. *Cand. Med. Sci (thesis)*. Kazan; 2004 (in Russian).
9. Kruglova LS. Polyvalent bacteriophages: prospects for application in dermatology. *Klinicheskaya dermatologiya i venerologiya* 2015; (1): 72–6 (in Russian).
10. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Glenn Morris J. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; **45**(3): 649–59.
11. Kutter E. Phage therapy: bacteriophages as antibiotics. *St. Petersburg; 2001 (in Russian)*.
12. Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nat Rev Microbiol*. 2004; **2**(2): 166–73.
13. Skurnika M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction. *Int J Med Microbiol*. 2006; **296**(1): 5–14.
14. Zurabov AYU, Karkischenko NN, Popov DV, Zhilenkov EL, Popov VM. Creating a national collection of bacteriophages and principles for the development of therapeutic and prophylactic phage preparations. *Biomeditsina* 2012; (1): 134–8 (in Russian).
15. Skurnik M, Pajunen M, Kiljunen S. Biotechnological challenges of phage therapy. *Biotechnol Lett*. 2007; 29: 995–1003.
16. Tanji Y, Shimada T, Yoichi M, Miyanaga K, Hori K, Unno H. Toward rational control of *Escherichia coli* O157:H7 by a phage cocktail. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 64: 270–4.
17. Chibani-Chennoufi S, Sidoti J, Bruttin A, Kutter E, Sarker S, Harald Brüssow H. In Vitro and In Vivo Bacteriolytic Activities of *Escherichia coli* Phages: Implications for Phage Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2004; 48: 2558–69.
18. Darbeeva OS, Mayskaya LM, Obuhov Yul. Preclinical studies of bacteriophages. In: Mironov AN, ed. *Guidelines for preclinical studies of drugs (immunobiological drugs)*. Part II. Moscow: Grif i K; 2012. P. 237–40 (in Russian).
19. Thiel K. Old dogma, new tricks — 21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol*. 2004; **22**(1): 31–6.
20. Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy. *Curr Opin Microbiol*. 2011; **14**(5): 524–31.
21. Barrow PA, Soothill JS. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol*. 1997; **5**(7): 268–71.
22. Tikunova NV, Vlasov VV. Bacteriophages — the enemies of our enemies. *Nauka iz pervyh ruk* 2013; **2**(50): 58–69 (in Russian).
23. Bondarenko V. New horizons of bacteriophage. *Bulleten Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN* 2013; (4): 1 (in Russian).

Authors

Biopharmaceutical company «FORT», Dobrolyubova street, 3-1, Moscow, 127254, Russian Federation.

Syatchikhina EN. Microbiologist of Department of medical immunobiological medicines development.

Nabatnikov PA. Head of Department of medical immunobiological medicines development.

Korovkin SA. Deputy Director General. Doctor of Medical Sciences, professor.

Katlinsky AV. Director General. Doctor of Biological Sciences.

Ignatiev GM. Deputy General Director for science. Doctor of Medical Sciences, professor.