

## **Organizers**

- Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance
- Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology
- State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology
- P.A.Stolypin Ulyanovsk State Agricultural Academy
- Noncommercial partnership for assistance to development of research and practical use of bacteriophages National Society for Bacteriophage Research

## **Organizing Committee**

### **Chairman**

*A.Yu.Popova* Head of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing

### **Co Chairman**

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

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

### **Members of Organizing Committee**

V.G.Akimkin	T.Yu.Zavistyaeva	E.A.Svetoch
A.V.Aleshkin	V.V.Zverev	E.P.Sel'kova
S.S.Afanas'ev	L.P.Zueva	D.Ye. Suetenkov
V.P.Bondarev	O.V. Kovalishena	V.A.Tutel'yan
N.I.Briko	S.Yu.Kombarova	I.V.Feldblyum
E.B.Brusina	V.N.Krylov	V.V.Shkarin
D.A.Vasil'ev	A.A.Mel'nikova	N.A.Yushchuk

### **Scientific Committee of the Conference**

Stephen T. Abedon	Krystyna Dąbrowska	Konstantin Miroshnikov
Andrey Aleshkin	Betty Kutter	Alexander Rakin
Dmitriy Vasil'ev	Rob Lavigne	Alexander Sulakvelidze
Nikolay Volozhantsev	Petr Leiman	
Martha Clokie	Andrey Letarov	

### **Congress operator**

Medical Marketing Agency

October 13–15, 2016, Moscow, Russia  
Hotel Radisson Slavyanskaya, 2, Europe Square, Moscow

## **Соорганизаторы конференции**

- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор)
- Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского)
- Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ПМБ)
- Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина» (ФГБОУ ВПО Ульяновская ГСХА им. П.А.Столыпина)
- Некоммерческое партнерство содействия развитию научных исследований и практического применения бактериофагов «Национальное общество исследователей бактериофагов»

## **Организационный комитет конференции**

### **Председатель**

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

### **Заместители председателя**

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

*Дятлов И.А.* Директор ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор

### **Члены оргкомитета**

Акимкин В.Г.	Завистяева Т.Ю.	Светоч Э.А.
Алешкин А.В.	Зверев В.В.	Селькова Е.П.
Афанасьев С.С.	Зуева Л.П.	Суетенков Д.Е.
Бондарев В.П.	Ковалишена О.В.	Тутельян В.А.
Брико Н.И.	Комбарова С.Ю.	Фельдблюм И.В.
Брусина Е.Б.	Крылов В.Н.	Шкарин В.В.
Васильев Д.А.	Мельникова А.А.	Ющук Н.Д.

### **Научный комитет конференции**

Stephen T. Abedon	Krystyna Dabrowska	Андрей Летаров
Андрей Алешкин	Betty Kutter	Константин Мирошников
Дмитрий Васильев	Rob Lavigne	Alexander Rakin
Николай Воложанцев	Petr Leiman	Alexander Sulakvelidze
Martha Clokie		

### **Технический организатор**

Медицинское маркетинговое агентство

# **Book of abstracts**

**Third International  
Scientific Conference**

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

*To the 100<sup>th</sup> Anniversary of the Discovery of Bacteriophages*

Moscow  
Medical Marketing Agency  
2016

# **Материалы**

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

## **БАКТЕРИОФАГИ:**

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

*K 100-летию открытия бактериофагов*

Москва

Медицинское маркетинговое агентство  
2016

УДК 578.347(082)

ББК 28.3я4

Б19

**Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности:** материалы 3-й научно-практической конференции с международным участием: к 100-летию открытия бактериофагов, Москва, 13–15 октября / Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [и др.]. – Москва : Медицинское маркетинговое агентство, 2016. – 100 с. – На англ. и рус. яз.

ISBN 978-5-9905908-2-3

Члены Научного комитета конференции приняли единогласное решение о публикации тезисов докладов на английском языке.

Перевод русскоязычных тезисов от авторов, не предоставивших собственный англоязычный вариант, осуществлен переводчиком И.В.Масловой под редакцией Научного комитета, с обязательным включением в материалы конференции авторской версии текста на русском языке.

Members of the Scientific Committee of the Conference decided unanimously to publish the abstracts in English. I.V.Maslova completed a translation of the texts whose authors didn't provide their own English variant under the editorship of the Scientific Committee with compulsory including into the Conference materials the author's text version in Russian.

УДК 578.347(082)

ББК 28.3я4

## Genome analysis of ETA-converting *staphylococcus aureus* phiB-7772 and phiB-7774 bacteriophages

Abaev I.V., Skryabin J.P., Dyatlov I.A.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

It is known that the lysogenic conversion is one of the main ways of *Staphylococcus aureus* adaptation to the environment. The temperate *S. aureus* bacteriophages from Siphoviridae family are classified according to the sequence of the integrase gene (Salnt-type). Each Salnt-type has restrictions on the dissemination among clonal lines (SS) of *S. aureus*. It is shown that the virulence genes encoded by phages of Siphoviridae family strictly correlate with Salnt-types. So, exfoliative toxin gene A (eta), a leading factor of pathogenicity in skin diseases, is encoded by ETA-converting bacteriophages of Salnt1-type by ETA-like prophages. ETA-like prophages could be found in the genomes of several SS, for example, SS15, SS109 and the SS121, converting them into the etiological agent of infections such as bullous impetigo and staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS). For SS8 line, dominant in Russia and in Western Europe, the phenomenon of ETA-conversion and association with SSSS were not previously shown.

When investigating the epidemic outbreaks of SSSS in 2013–2014 in Central Russia, we had found the replacement of traditional SS15-eta (B-7774) by CC8-eta (B-7772) strain. The full-genome sequences of B-7772 (LJBK00000000) and B-7774 (LJBL00000000) strains were determined, and within its ORFs prophage sequences encoding eta gene were revealed. The aim of this study was a comparative genomic analysis of prophage phiB-7772 and phiB-7774 sequences and of known sequences of ETA-like prophages and other phages of Salnt1-type.

ORF and regulatory regions of prophages phiB-7772 and phiB-7774 were determined by Prodigal, GeneMarks and BPROM programs. A comparative analysis of the major functional areas of phiB-7772 and phiB-7774 was conducted. The features of the structure of regions responsible for the lysogenic and replication are discussed. The high degree of homology of phiB-7772 and phiB-7774 regions encoding proteins of the capsid and tail structures, with phiETA3 phage sequence was shown. The specific variations in the region of bacteriophages of Salnt1-type encoding proteins of the host cell lysis and toxins were revealed. The dependence of sequence of integration sites of prophages of Salnt1-type from SS was noted.

Adapting of SS8 strain to a new ecological niche is related to the inclusion of ETA-like prophage in the genome. The specific features of genome of phiB-7772 phage identified an unique opportunity to lysogenic conversion of B-7772 (CC8-eta) strain.

## Bacteriophages: history of investigation and application

Akimkin V.G.

Scientific Research Institute of Disinfectiology,  
Moscow, Russia;

I.M.Sechenov First Moscow State Medical University,  
Moscow, Russia;

Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

At the beginning of the 20<sup>th</sup>-century a canadian scientist Félix d'Hérelle working at this time at the Pasteur Institute (Paris) laid the foundations of the modern theory of bacteriophages. The important historical scientific landmark is the establishment of Tiflis bacteriological Institute (1923), where the theory and practice of application of bacteriophages was developed, implemented and extended in the Soviet Union, later in Russia and all over the world.

Today the experience of scientific and practical applications of bacteriophages in Russia lasts about 100 years. In 1930-40s years the methods and techniques of bacteriophage use for dysentery and typhoid prophylaxis were developed. During the same period the bacteriophages against major causative agents of purulent-inflammatory infections were designed: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *coli*, *Proteus* and *Pseudomonas* phages; this allowed to apply them in surgical practice for the treatment of purulent processes and postoperative complications.

In the early 1990s due to the growing importance of the problem of resistance of microorganisms to antibiotics the bacteriophage application area expanded and they become widely used in treating a variety of inflammatory diseases and complications in surgical practice, gynecology and obstetrics, urology, ophthalmology, dentistry and other medical fields.

In the 20<sup>th</sup> and 21<sup>th</sup> centuries, the use of bacteriophages in epidemic foci of infections associated with health care (Emergency Infections) was highly effective and been documented by many Russian scientists – representatives of various local epidemiological schools (Kemerovo, St. Petersburg, Moscow, Nizhny Novgorod, Ufa, Khabarovsk, etc.).

Currently, bacteriophages in Russia are actively used for the treatment and prevention of widespread nosological forms of infections, including *Streptococcus*, *Staphylococcus*, dysentery, *Salmonella* and a wide range of the other nosocomial infections. Anyway the active use of bacteriophages takes place due to their unique properties: high efficiency against the target microorganisms that is comparable to the efficacy of the antibiotics, efficacy against the antibiotic-resistant strains causing Emergency Infections, the compatibility with any medicines, and the fact that they don't harm the normal human microflora. Bacteriophages are non-toxic and feature low rates of adverse reactions.

In the last decade, the first publication of the experience of bacteriophage application in the US and Europe started to appear. Given the clinicians' strong interest and popularity in treatment-and-prophylactic bacteriophage applications, the expansion of the range of different forms of their application, which is determined by the practical needs of contemporary medicine we can predict the significant growth of scientific research in this area and increasing the amount of bacteriophage medicines not only in Russia but also abroad in the coming years.

## Complex use of bacteriophages for prevention and treatment of healthcare-associated infections

Akimkin V.G.

Scientific Research Disinfectology Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russia;  
I.M.Sеченov's First Moscow State Medical University, Moscow, Russia;  
Central Scientific Research Epidemiology Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russia

Prevention of healthcare-associated infections is one of the global problems in modern period of healthcare system development. It is greatly complicated by the wide spread of microorganisms with high resistance to most groups of antibiotics and disinfectants.

Over the past 50 years in Russia, considerable progress in theoretical evidence and practical application of bacteriophages to treat and prevent healthcare-associated infections has accumulated. The efficient use of bacteriophages in epidemic outbreaks of healthcare-associated infections has been documented in numerous representative studies of different epidemiological centers in Russia: Kemerovo, St. Petersburg, Moscow, Nizhny Novgorod, Ufa and others. In modern period bacteriophages are used for the treatment and prevention of various inflammatory diseases and complications in surgery, gynecology and obstetrics, ophthalmology, dentistry, combiustiology and other areas of medicine.

One of the important areas of application is the use of bacteriophages for the decontamination of inanimate objects and surfaces in healthcare settings. Disinfection by using bacteriophages is the most suitable in epidemiologically relevant specialized departments such as intensive care units, burn units, etc. In healthcare settings, objects usually are disinfected by liquid chemicals or wet pasteurization. However, the use of chemical disinfectants is often limited by the presence of patients, filling of these units by many complex medical devices and monitoring systems for vital functions of the patient. Each of the factors that affect the efficacy of disinfection can nullify or limit the efficacy of the process. In the case of the spread of hospital clones (strains) resistant to chemical disinfectants and other antimicrobial agents, usage of bacteriophages may be an additional option. This may significantly increase the effectiveness of prevention and control of healthcare-associated infections. A mandatory condition for efficiency of bacteriophage disinfection is the susceptibility of bacteriophage and its lytic activity. Drugs containing phages adapted to circulating bacterial strains will be more efficient compare to their non-adapted counterparts.

Numerous randomized controlled trials revealed different efficacy regarding the usage of bacteriophages in the environment. The greatest effect was obtained using *Pseudomonas* bacteriophage: complete elimination of the pathogen was achieved within 24 hours after a single application, and there was no new cases of healthcare-associated *Pseudomonas* infections. This is also the case for *Salmonella* bacteriophage effect (15-fold incidence reduction).

## Assessment of the epidemiological effectiveness of bacteriophages in prevention of streptococcal and other bacterial respiratory infections in organized groups

Akimkin V.G.<sup>1</sup>, Alimov A.V.<sup>2</sup>, Polyakov V.S.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Scientific Research Institute of Disinfectology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Scientific Research Institute of Viral Infections, Ekaterinburg, Russia;

<sup>3</sup>1026 Centre of State Sanitary and Epidemiological Surveillance, Ekaterinburg, Russia

**Relevance.** Acute diseases of respiratory tract of streptococcal etiology are currently one of the most pressing problems in military medicine due to the high level of such diseases among servicemen. Bacteriophages are considered as modern alternative to antibiotics, especially in cases when the application of antibiotics is hampered.

**The purpose of the work** was to evaluate the epidemiological efficacy of the use of bacteriophages (streptococcal, staphylococcal, or the polyvalent pyobacteriophage) for prevention of bacterial acute respiratory infections in units during the period of their formation.

**Materials and methods of study.** The evaluation of the epidemiological effectiveness of bacteriophages was conducted in two directions: microbiological and epidemiological. Microbiological studies tracked the dynamics of changes of the microbial diversity in servicemen of main and control groups before and after an application of preventive agents. Epidemiological effectiveness of bacteriophage application monitored manifestations of epidemic tonsillitis disease process (and other respiratory diseases of bacterial etiology) in experimental and control groups before and after application of preventive agents. The study involved 510 healthy servicemen.

**Results and discussion.** Streptococci were dominated – 76.9%, including *Str. pneumoniae* – 47.7%, *Str. pyogenes* – 29.2% among isolated cultures (before phage application). *S. aureus* was isolated in 23.1% cases. Streptococcal bacteriophage was most effective, after the preventive treatment the number of isolated streptococci decreased by 2.4 times, and the incidence of tonsillitis and acute respiratory diseases declined 1.8 and 3.0 times, respectively.

Thus, the use of bacteriophage to prevent respiratory diseases causes sanitizing effect in organised military units. As a result of the local application on nasal microflora the circulation of agents of cold-related diseases of coccal aetiology in the military unit is impaired. As a consequence, this inhibits the formation of epidemiological strain that determines the group morbidity. The use of bacteriophage is a modern trend for prevention of infectious diseases of streptococcal etiology in organised military units.

## Experience of use of immune lactoglobulin and bacteriophage mixture for treatment of experimental salmonellosis

Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V., Yagovkin E.A.

Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology,  
Rostov-on-Don, Russia

The aim of this study was to investigate the antibacterial efficacy of the joint use of immune lactoglobulin and *Salmonella* bacteriophage in the treatment of experimental salmonellosis in mice.

The experimental *Salmonella* infection was reproduced by a single intragastric administration of 2 LD50 daily agar culture of *S. typhimurium*. The animals were divided into four groups according to the pattern of the treatment. The preparations were daily administered to mice orally after the infection for 7 days. In the study of the joint therapeutic effect of the lactoglobulin and bacteriophage the special attention was paid to the terms of elimination of the pathogen from animal organs. Analysis of the data showed that in all four groups a positive dynamics of excretion of the pathogen of mice was revealed. In groups of animals that were treated with both drugs, the elimination of *Salmonella* out of organs occurred 1.5 times faster than in the control groups of mice. At the same time in the experimental groups on the third day of treatment with preparations the statistically significant decrease in the number of *S. typhimurium* in the contents of the large intestine of animal was revealed. The study found that immune lactoglobulin used simultaneously with *Salmonella* phage for 7 days reduced the severity and duration of the disease course and blocked the further development of the infectious process, promoted the efficient and rapid cleansing of animal organism of the pathogen, increased the survival of mice. The obtained data suggest the applicability of joint use of immune lactoglobulin preparations and bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections caused by antibiotic-resistant strains of *Salmonella*.

## Analysis of genome of bacteriophage propionibacterium acnes A1-14

Alekseeva A.E., Alkhovsky S.V., Brusnigina N.F.

I.N.Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute  
of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia

The purpose of the work is the characterisation of the genome of the new temperate *Propionibacterium* phage PA1-14 bacteriophage that was found in the analysis of the results of full-genome sequencing of *Propionibacterium acnes* A1-14 strain.

Full-genome sequencing was conducted on MiSeq instrument, Nextera XT kit was used for the preparation of DNA libraries. With the help of CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, USA) software the alignment and assembly of nucleotide sequences de novo was conducted. The genome was annotated using RAST server.

As a result of the alignment and association the nucleotide sequence with the length of 29407 bp and coverage level

25000 was obtained. The number of GC pairs amounted to 53.85%. When annotating, 45 protein coding sequences were found, 31 of which encode hypothetical proteins with unknown function.

Bacteriophage *Propionibacterium* phage PA1-14 belongs to Siphoviridae family, and it was found that the genome contains genes that determine the synthesis and assembly proteins of phage capsid and tail, DNA replication, and genes responsible for host cell lysis. While plating *Propionibacterium acnes* A1-14 strain by Gracia agar overlay method, the negative plaque formation was not observed, indicating a temperate phage nature. The genome of *Propionibacterium* phage PA1-14 does not contain genes of integrase and its repressor that are required for insertion of the bacteriophage DNA into a host cell genome, which is consistent with literature data. Apparently, bacteriophage DNA persists in cells of a host bacterial culture as extrachromosomal units.

According to the literature, this property is characteristic for all known to-date bacteriophages of *Propionibacterium acnes*, which have apparently lost the genetic module responsible for the integration into the host genome.

## Innovative application of bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation

Aleshkin A.V.<sup>1</sup>, Svetoch E.A.<sup>2</sup>, Volozantsev N.V.<sup>2</sup>,  
Kiseleva I.A.<sup>1</sup>, Rubalsky E.O.<sup>1</sup>, Ershova O.N.<sup>3</sup>,  
Novikova L.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.N.Gabrichhevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

<sup>3</sup>N.N.Burdenko Research Institute for Neurosurgery, Moscow, Russia

For the first time in the Russian Federation, based on the original virulent bacteriophage strains active against food-borne infectious agents, hospital acquired diseases and a number of others, new categories of products have been created, technologies for their production, procedures for evaluation of dangers of bacteriophages, including microbiological, biochemical and molecular genetic tests have been established, and laboratory animal tests and limited clinical trials have been conducted. Prophylactic application of the newly designed phage-based products in healthcare, production of food, cosmetics and other branches of the Russian economy will allow to reduce the risks of emergence of sporadic cases as well as massive outbreaks of socially significant infectious diseases of bacterial origin.

## Role of topology and replicative structures of DNA of *E. coli* cells in lysogeny and virulent cycle of ssDNA of phiX174 and λ<sub>7</sub> bacteriophages

Aleshkin G.I., Smelkova O.I., Markov A.P., Rusina O.Yu., Voronina O.L., Dobrynina O.Yu., Bolshakova T.N.

N.F.Gamalei Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Virulent ssDNA bacteriophages phiX174 and λ<sub>7</sub> are capable to start lysogeny of bacteria from *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* genera. The combination of lysis of *E. coli* populations by these phages with the increased frequency of their lysogeny in the spontaneous mutants of the regulatory FTS-system (P<sub>ts</sub>) and topoisomerase II (NalR) enriches the population with lysogens of these mutants, capable of changing the rate of growth, pathogenicity and antibiotic resistance of bacteria. According to integration-replicative model, the lysogenicity phiX174, λ<sub>7</sub> of *E. coli* is happening due to integration of phage ssDNA in area of termination of chromosome/plasmid replication, that is, in the terminal structure of replicon. Inheritance of phage genome located at this site, or its segregation and beginning of the virulent phage cycle depends on the activity of bacterial XerCD helicases, topoisomerases II and other proteins altering DNA topology.

**Objective.** To find out the effect of mutations in the genes of these proteins on the lysogeny and virulent cycle of phiX174, λ<sub>7</sub> on *E. coli*. To characterize the details of these processes in cells with different replicon DNA structure.

**Materials and methods.** A collection of strains with mutations in genes of DNA of gyrase, topoisomerase IV, DNA of helicases was obtained. The strains with a combination of chromosomal and plasmid replicons were designed. We compared the frequency of induction of lysogens and titration of phages on the mutants and the original *E. coli* cells, and on the strains that differ in replicon cell structure.

**Results.** It was found that mutations in the gene DNA of gyrase, topoisomerase IV lead to 2–10 fold reduction in titre phiX174, λ<sub>7</sub>. Accordingly, mutant lysogenic strain number increases. The combining of mutations in the genes of DNA gyrase, topoisomerase IV with mutations in the gene of reparation and recombination of DNA recA, leads to inhibition of virulent phage cycle. The mutations in the genes of helicases DnaA, UvrD, providing various types of DNA replication, reduce the efficiency of phage titration. The combination in a cell of replicon of chromosomes with a conjugation replicon HfrH, of plasmids F +, pKM101 reduces phage titers in 2–6 times.

**Conclusions.** Changing the topology of DNA replicons *E. coli* plays a crucial role in the effectiveness of lysogeny or virulent cycle of phages phiX174, λ<sub>7</sub>.

## Antibody response to bacteriophages in evaluation of efficiency of enteral phage therapy

Aleshkin V.A.<sup>1</sup>, Novikova L.I.<sup>1</sup>, Bochkareva S.S.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>1</sup>, Ershova O.N.<sup>2</sup>, Kiseleva I.A.<sup>1</sup>, Zulkarneev E.R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.N.Gabrichhevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>N.N.Burdenko Research Institute for Neurosurgery, Moscow, Russia

Currently, all the more important becomes the problem of the prevalence of antibioticresistant strains of bacteria. Possible replacing antibiotics with bacteriophages preparations may probably resolve this ploblem. Despite the fact that phagotherapy is experiencing a rebirth, there is no established algorithm for such therapy, the results obtained on the patients controversial, and the clinical picture does not always correspond to microbiological data. Evaluating the effectiveness of clinical application of phages in terms of evidence-based medicine, it is necessary to consider the possible response of immune system on bacteriophage, the more that data on this problem in the literature were not readily available.

In this regard, the aim of the work was to study the humoral immune response to bacteriophages in operated patients during enteral phagotherapy in postoperative period, burdened by affiliated hospital-acquired infection resistant to antibiotics.

To accomplish this purpose enzyme immunoassay systems were designed allowing to establish the presence of relevant IgG-antibodies in blood serum or in any biological fluid of the patient. As commercial reagents and the reagents prepared in the laboratory were used. Thus, in particular, monospecific rabbit antisera to the bacteriophages were obtained, the specificity of which has been proven by Ouchterlony method and by neutralization of phage lysate.

The wells of microtiter plates were coated with antigen (bacteriophage). The serum to be tested was diluted and incubated in the well. In this step phage-specific antibodies are bound to immobilized antigen. The bound IgG antibodies were revealed using conjugate Protein A-Peroxidase (Sigma). The choice of the conjugate was determined by the ability of staphylococcal protein A to interact with IgG of different animal species. Designed ELISA systems were tested in the analysis of IgG-antibodies to the corresponding bacteriophages in sera derived from not-immunized and immunized rabbits and also in sera of healthy volunteers who were or were not taking bacteriophage per os. Later the analysis of the humoral immune response to bacteriophages in patients have been conducted, which confirmed the necessity of corresponding IgG-antibodies detection to determine the strain composition of the drugs while conducting a second course of phage therapy.

## Development of a visco-plastic formulations of bacteriophages

Anurova M.N.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Bakhrushina E.O.<sup>1</sup>,  
Kiseleva I.A.<sup>2</sup>, Bochkareva S.S.<sup>2</sup>, Zulkarneev E.R.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>I.M.Sechenov First Moscow State Medical University,  
Moscow, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for  
Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

The relevance of the development of bacteriophage formulations is due to the need to improve the compliance of treatment and effectiveness of pharmacotherapy in the application of this group of drugs outside the hospital.

**The aim of this work** is to develop new viscous-plastic formulations of the combined bacteriophage substance.

**Materials and methods.** The object of research is a drug substance, which is a cocktail of bacteriophages. We examined the possibility of using the following formulations as a basis for suppositories: Witepsol of the brands H, W-35 (Cremer Oleo); as an emulsifier – Polysorbate-80 (BASF), emulsifier T-2 (Laskraft). We prepared the experimental suppository samples according to the standard process flow-sheet. The technological characteristics of suppositories were studied in analytical equipment ERWEKA: the tester of SSP melting point, the tester of disintegration ST 32, the tester of determining the time for complete deformation RM 30.

**Results.** The critical parameter of suppositories technology is a method of introduction of the drug substance in the suppository mass: the composite bacteriophages substance was input as a solution and as a suspension type. The absence of the influence of the route of introduction of the active substance on the indices of quality of drug was shown. The samples based on Witepsol H 35 and W-35 using the emulsifier T-2 had a disintegration time of 30 minutes, the time of the total deformation was in the range of 15 to 25 minutes, melting point –  $38^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ , which does not meet the requirements of the state Pharmacopoeia. Further, the samples of suppositories on the base of Witepsol H had a narrow solidification temperature range, which creates a certain technological difficulties in scaling of the suppository composition with bacteriophages which are thermolabile substances. The samples based on Witepsol W-35 using as the emulsifier polysorbate 80 showed the satisfactory processability.

**Conclusion.** The suppositories with a cocktail of bacteriophages that meet the requirements of a modern regulatory documentation were designed.

## Bacteriophages for prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

Aslanov B.I., Konev S.D., Ilyina M.N., Grishko T.A.

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

Special attention should be paid to the possibility of using of bacteriophages to combat biofilms. To date, a number of works on the assessment of the effectiveness of phages

against biofilm formation have accumulated (Lu T.K., Collins J.J., 2007; Liao K.S., et al, 2012; Weiling Fu, et al, 2010, etc.). The greatest importance is the possibility of using phages for the prevention of biofilm formation on devices for invasive medical procedures, such as vascular and urinary catheters.

The aim of the study was to evaluate the effectiveness of lytic bacteriophages to prevent biofilm formation by *P. aeruginosa*.

We used *P. aeruginosa* Ps5 strain with a high intensity of the biofilm formation, isolated from clinical specimens in one of the urological hospital in St. Petersburg. The efficiency of bacteriophage B6 isolated from clinical samples in the clinic of the purulent osteology of one of the St. Petersburg hospitals was studied. The intensity of film formation was evaluated by measuring the optical density (OD) in a microplate reader at a wavelength 540 nm.

To study the bacteriophage ability to prevent the biofilm formation the culture of *P. aeruginosa* strain that was inserted into 7 wells of the microtiter plate with nutrient broth was used. Into the first well the bacteriophage was added simultaneously with *P. aeruginosa* culture. Into the second well the bacteriophage was inserted once simultaneously with the culture, and then in 3, 6, 9 and 11 hours. The phage was added to the remaining wells only once: into the third one – in 3 hours, into the fourth one – in 6 hours, into the fifth one – in 9 hours, into the sixth one – in 11 hours after the start of the experiment. The seventh (control) well contained only *P. aeruginosa* culture. OD595 was measured every three hours.

The results showed that the OD in the well with a single addition of phage remained virtually unchanged throughout the experiment: 0.11 at the beginning and 0.12 after 11 hours. A similar effect was observed in the well with the addition of phage every three hours. In the remaining wells, the OD that has grown up at the time of the addition of phage remained unchanged by the end of the experiment (within 0.2). In the control, the growth of OD was 4-fold in 11 hours (from 0.1 to 0.4).

The experiment allowed stating that both single and multiple additions of phage effectively prevent the biofilm formation. The late contact of a new phage with *P. aeruginosa* strain inhibits the growth of the biofilm.

## Complex evaluation of pathogenicity of clinical staphylococcal strains that are different in antibiotic resistance and sensitivity to bacteriophages

Bairakova A.L., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S.,  
Lakhtin M.V., Aleshkin V.A.

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

An assessment of pathogenicity of 180 clinical isolates of staphylococci (except for *S. aureus*) was conducted. 20 groups have been identified, depending on the antibiotic resistance (AR) and bacteriophages (RBF), the presence of hemolysis in culture on blood medium (HS), capacity for biofilm formation (BFF). The strains with moderately expressed AR (resistant to 1–2 antibiotics), the absence of HS showed RBF (Intestinal (I) complex (C) and polyvalent (P), staphylococcal (S)). High

rates in the BFF at 80% and more indicated the infectious potential of the isolate. 7 strains of group 12 with high AR (to 5 or more) were susceptible to all BF (I, P, C, and P).

High BFF ratio was prerequisite to the development of an infectious process. When comparing BFF in groups that were resistant to clarithromycin and roxithromycin, with a lack of HS, it was revealed that in one of the groups BFF ratio is higher.

In 75% of cases, there was a higher sensitivity to cefazolin, cefotaxime, ampicillin. The combination of antibiotic resistance and high values of BFF characterized infectious aggression of pathogen. For 7/12 isolates that were sensitive to all BF with the presence of HS, AR to 8 or more antibiotics, the low value of the BFF coefficient suggested the possible mutations in the genome. The results indicate the importance of all 4 factors for prognostics and diagnostic assessment of the risk of pathogenicity of staphylococcal strains.

## Use of bacteriophages in veterinary

**Barth N.G., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.**

*Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia*

Bacteria of *Providencia* genus are widely common in nature, they are isolated from water, soil, faeces and urine of animals and humans. The effectiveness of therapeutic interventions largely depends on the time of diagnosis of the disease, so the improvement of methods of laboratory diagnosis of diseases caused by the microorganisms mentioned above is an urgent problem.

The source for the isolation of bacteriophages was wastewater. As the indicator cultures, 26 pathogenic strains of *Providencia* genus were used. Selection of phage strains was conducted by passaging the strain on the indicator cultures followed by cloning of homogeneous negative colonies, typical for each isolate. The activity of isolated phage was determined by Gratia and Appelman methods.

As a result of our studies, 16 thermostable isolates of bacteriophages that form the transparent colonies of various diameters of 1.0 to 5.0 mm or sterile spots in the form of lysis zone in diameter of 5.0 to 9.0 mm were isolated. The lytic activity of isolated phages ranges from  $10^{-6}$  to  $10^{-9}$  by Appelman method, and from  $2.1 \times 10^8$  to  $1.2 \times 10^{11}$  phage particles in 1 ml of the medium by Gratia method. The study of the specificity of the two bacteriophages (F-67 УГСХА, F-87 УГСХА) having a high activity and a broad range of lytic action was carried out against the members of the other genera of the Enterobacteriaceae family. We have isolated and selected 16 thermostable phage isolates that are active against of bacteria of *Providencia rettgeri* species.

Two specific strains of phages with the most pronounced biological properties that make them suitable for the manufacture of diagnostic biological products were selected. The preparation of indicator bacteriophages F-87 and F-67 УГСХА are a yellowish colour clear liquid (the colour of their seeded medium), without impurities, sludge and has a titer not less than  $10^8$ .

These figures of the phage biological properties meet the requirements for the production phage strains, so we used them to construct a diagnostic biological product.

## Specificity of action of bacteriophages infecting *Providencia* genus

**Barth N.G.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>, Pavlova I.B.<sup>2</sup>, Judina T.G.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Phage specificity is characterised by the presence or absence of bacteriophage lytic activity against heterologous bacteria.

The study of the specificity of bacteriophages of *Providencia* genus were conducted on a nutrient agar medium by the method of applying drops of phage on a lawn culture under study (Ganyushkin, 1988; Zolotukhin, 2007). The study of the specificity of bacteriophages F-67 УГСХА, F-67 УГСХА was carried out in relation to the representatives of the following species: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, as well as *Streptococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp.

Onto the surface of meat-peptone agar in the Petri dishes 3–4 drops of 18-hours broth culture of test organisms were pipetted. Then it was distributed evenly over the surface of the medium with a sterile spatula. Plates were placed into a thermostat to dry for 15–20 minutes. After that two sectors were marked out with the help of marker on the plates: onto the first sector of the inoculated agar the drops of the testing bacteriophage were pipetted touching lightly; onto the centre of the second sector, the sterile meat-peptone broth was applied as a control. Plates were tilted to drain drops and then incubated at 37°C. The results were evaluated after 18–24 hours.

It was found that the selected phage was inactive against the representatives of the other bacterial genera and species.

Bacteriophages are active against 25 field *Providencia rettgeri* strains: A 101, N 20, M 45, C 17, H 5, H 11, H 15, H 10, H 3, H 4, R 1, H 12, D 73 and H 2, N 87, N 8, N 6, R 1, H 14, D 102, H 13, H 9, H 7, H 67, H 17.

## Thermophilic bacteriophage aeribacillus pallidus ap45: biological properties, analysis of genome, interaction with the host microorganism

**Bokovaya O.V., Kozlova J.N., Morozova V.V., Babkin I.V., Yunusova A.J., Tikunova N.V.**

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

The study of the thermophilic bacteriophages is interesting for determination of the relationship of microorganisms growing in extreme high-temperature conditions, and for obtaining data on the thermostable structure of enzymes and proteins. In this case, unlike the bacterial communities, bacteriophages from many extreme habitats are still understudied.

Termophilic bacteriophage AP45 and its thermophilic host microorganism KEMTK 656 were isolated from soil samples of the Valley of Geysers in Kamchatka.

Bacterial host microorganism has been identified as thermophilic microorganism *Aeribacillus pallidus* by phlyotyping its 16S rRNA gene sequence.

According to the morphology of phage particles, AP45 bacteriophage was assigned to Siphoviridae family.

Phage has the following biological properties: on the lawn of a sensitive culture, it produces plaques of 0.5–1 mm and a wide zone of lysis due to the production of soluble lysis protein. Phage is thermally stable at 55–65°C, retains the viability under heating for 2 hours at 95°C and is sensitive to chloroform.

The size of the genome according to full-genome sequencing was 51606 bp. Analysis of the resulting sequence revealed 74 estimated open reading frames. The genome contains open reading frames (ORF) encoding proteins of recombination and regulation of DNA metabolism, the proteins of the bacterial cell lysis, structural proteins, and 41 ORF encoding proteins with unknown functions. Bacteriophage genome does not contain DNA and RNA polymerases, which are present in the genomes of most tailed phages. The highest similarity (36%) in bacteriophage genome sequences were found with the thermophilic phage D6E [GU568037] in the cluster of structural proteins. Most ORF of non-structural phage AR45 resembles ORF thermophilic microorganisms belonging to the family of *Bacillaceae*.

The ability to lysogenic development path was suggested for this phage due to the presence of several proteins of recombination machinery and confirmed by the induction of prophage from the resistant cells of culture 656.

Thus, for the first time, the bacteriophage was characterised which is specific for the thermophilic bacteria *Aeribacillus pallidus*, isolated from the thermophilic community of Kamchatka. Bacteriophage AP45 is capable of both lytic and lysogenic development paths. For sequences encoded by nonstructural phage ORF no similar sequences of bacteriophage in existing databases were found.

## Pseudolysogeny of T7 phage and its application

**Bolshakova T.N., Dobrinina O.N., Karataev G.I., Sivov I.G.**

*Bio Technologies LLC, Moscow, Russia*

In certain experimental conditions bacteriophage T7 can cause pseudolysogenic status of a number of Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Bordetella parapertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotovorum*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella spp*, *Brucella abortus*).

The pseudolysogenic condition occurs with a frequency of  $1.5 \times 10^{-6}$  in the progeny of phage recipient, previously propagated on E.coli strains, the pKK3 plasmid-carrier. The genome of T7 phage particles that are capable to cause pseudolysogeny contains a strong-polar mutation that results from the IS481-mediated integration of pKK3 plasmid to phage DNA.

The strong-polar mutation is located between copies of tetranucleotide CATG for A3 promoter that leads to a dramatic reduction in the frequency of the transcription of phage genome.

While reproducing of T7 phage on the pseudolysogenic clones progeny, Hft-lysates were obtained in which the ratio of phage and particles, capable of causing the pseudolysogeny, was 1:1.

When we T7-transduced *Pseudomonas putida* with *ble* gene (bacterial cytochrome P450) using Hft-lysates under the conditions of suppression of bacterial RNA-polymerase, the overproduction of cytochrome was reached (50% of total protein; OD450 / OD280 = 2761; 90% retracement pure substance with Mm ≈ 15kD, against the estimated – 14kD).

---

## Using of molecular genetic technologies for indication of phages in the blood of patients with healthcare-associated infections (HAIs)

**Borisova O.J., Rubalsky E.O., Aleshkin A.V., Gadua N.T., Ershova O.N., Kurdyumova N.V., Savin I.A., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S.**

*G.N.Gabrilchevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;*  
*N.N.Burdenko Scientific Research Neurosurgery Institute, Moscow, Russia*

The scientific studies of the pharmacokinetics of bacteriophage preparations that were carried out in the XX century were conducted using classical microbiological and immunological methods. However, these methods are often not sensitive enough to confirm the presence of bacteriophages in the blood, partly due to the factors of natural resistance of the organism that can mask the presence of phage. Currently, with the development of molecular genetic techniques, in particular, the nucleic acid amplification methods, the new opportunities for research of bacteriophages and their cocktails appeared. To improve the effectiveness of control of the system impact of bacteriophages we have suggested a new approach to the study of the pharmacokinetics by a highly sensitive detection of phage DNA in the blood by double-nested PCR method. Our method comprises the isolating of total DNA from a whole blood sample in the volume of 300 mkl, the setting of three rounds of PCR with specific primer pairs and the detection of the amplification products of each round of PCR by horizontal electrophoresis. For the first time, we have applied this method to the study of bacteriophage identification in the blood of patients with HAIs as a part of their phage therapy. The study involved 26 patients with infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*, who were on prolonged mechanical ventilation in the intensive care unit of N.N.Burdenko Scientific Research Neurosurgery Institute. The patients received intragastrically (from the stomach pump) the therapeutic-prophylactic product (TPP) containing a strain of *P. aeruginosa* RA5 bacteriophage at a titer of at least  $10^8$  PFU/ml, 20 ml once a day for 3–5 days. In 24 hours after the last dose of TPP, the venous blood of patients was sampled in EDTA-containing vacuum tubes. To control the persistence of the

phage in the blood two healthy volunteers who took TPP orally for 3 days for the same scheme were also included into the study, and their blood samples were taken in one day after the last day of therapy. DNA extraction was conducted using a set of K-Sorb (OOO "SPF Syntol" Ltd, Russia). Further 3 double-nested PCR with specific primers flanking the fragments of phage DNA with the size 447, 343 and 322 bp were put round successively. Reaction mixtures were prepared using the reagents made by company Fermentas (Lithuania). As a negative control, a sample of the venous blood of volunteers and patients, taken before receiving of phage antibacterial drugs were used. As a positive control, the phage DNA of RA5 P. aeruginosa were used. As a result, three specific amplicons were detected after round 2 (corresponding to the quantity of 1000–10,000 copies) and round 3 (corresponding to the quantity <200 copies) of PCR on samples from patients and volunteers. While studying the period of the persistence of the phage in the blood of healthy volunteers was found that the phage DNA can be detected in blood one day after the last admission of TPP. Thus, we were the first who have shown the possibility of using molecular genetic techniques of nucleic acid amplification methods to identify the bacteriophages in the blood of patients with HAIs to conduct the timely and adequate phage therapy. The use of these technologies opens a new era in the study of bacteriophages and increases the efficiency of phage therapy.

## The effectiveness of T5-like phages to control *Salmonella enterica*

**Yannick Born, Lars Fieseler**

Zurich University of Applied Sciences, Wädenswil,  
Switzerland

*Salmonella enterica* can cause severe diarrhea in humans after consumption of contaminated food. Because bacteriophages are powerful agents for the control of pathogenic bacteria, we isolated and characterized TK611, a T5-like member of the *Siphoviridae* family with a genome of 121 kb in size. The genome ends exhibited 9.4 kb direct terminal repeats. Dot plot analyses revealed highly conserved genomes in the T5-like *Salmonella* phages with variable coding sequences of the putative L-shaped tail fiber protein gene, possibly indicating host range differences. TK611 exhibited a relatively broad host range and infected both, *S. enterica* and *E. coli*. In *S. Typhimurium* the infection was *btuB*-specific and *tonB*-dependent. *In vitro* treatment of a growing *S. Typhimurium* culture resulted in a reduction of viable cell counts followed by a delayed onset of exponential growth. Hence *S. Typhimurium* was not completely eliminated. However, after treatment the surviving bacteria were still susceptible to TK611 infection. When TK611 was applied in combinations with other bacteriophages different degrees of growth control were observed *in vitro*, depending on the additional phage applied. Co-application of TK611 and FO1-E2 revealed best control efficacy. This observation was in agreement with pull down assays using TK611 or FO1-E2 on  $\Delta btuB$ - and  $\Delta tonB$  mutant strains. In food the efficacy of phage application varied de-

pending on the food used. In summary the data indicated that *Salmonella* can be efficiently controlled by the application of well-designed phage cocktails. The expression and regulation of *btuB* during phage infection and the requirements of an effective phage cocktail will be discussed.

---

## Study of lytic cycle of staphylococcal bacteriophage SA20 by flow cytometry method

**Bronnikov K.A.<sup>1</sup>, Morozova V.V.<sup>2</sup>, Kozlova J.N.<sup>2</sup>, Matveev A.L.<sup>2</sup>, Tikunova N.V.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Classical methods of analysis of interaction of the lytic phages and the host cells are microbiological methods that allow assessing the bacteriophage lytic potential and a range of bacterial strains on which it is able to reproduce. At the same time, these methods do not provide the opportunity to explore the finer aspects of the interaction of cells and bacteriophage such as changing the bacterial cell wall while reacting with the bacteriophage, the presence or absence of formation of bacterial agglomerates during bacterial infections etc. The classic method for studying such features is electron microscopy but this method is time-consuming and labor-intensive so it is desirable to develop the alternative methods of analysis of the phage-host interactions. In this work we used flow cytometry for studying the interaction of lytic bacteriophages with bacterial cells during the development of the phage infection.

We used the lytic staphylococcal bacteriophage SA20 and *Staphylococcus aureus* KEMTK 33 strain from the collection ICBFM SB RAS. The measurements were made using a flow cytometer Novocyte Flow Cytometer (Acea Bioscience, USA). As a result a correlation between the data on the development of lytic phage infection obtained by the methods of classical microbiology and data obtained via cytometer was observed. We observed the difference (significantly changing with time) in the intensity of the fluorescent DAPI staining between the control culture bacteria and the culture infected with bacteriophage. We interpret this as a consequence of the alterations of cell wall under the action of lytic enzymes the phage particles. The phage DNA may also contribute to additional fluorescence intensity. The relative reduction in the size of registered bacterial particles during the first 30 minutes after the addition of phage was also detected. This result indicates the dispersal of the large cells agglomerates under the influence of bacteriophage.

Thus our study revealed significant differences between the growth of the control culture and the culture infected with bacteriophage. Flow cytometry method may be used to detect the lytic activity of the bacteriophage and the cell population condition analysis during the development of phage infection.

## T4 infection of stationary phase *E. coli*: the hibernation mode

Daniel Bryan, Elizabeth Kutter

The Evergreen State College, Olympia, WA

While *E. coli* bacteriophage T4 is one of the best-studied organisms on the planet, most of this research has been conducted under optimal exponential-phase growth conditions, with little attention paid to how T4 interacts with its host in the wild. Its usual habitat is the mammalian gut, where phage are most likely to encounter bacteria which are not actively growing, often in stationary phase. With the current resurgence of interest in incorporating phage therapy into the standard medical practices of western Europe and the United States, including the complex results of the recently completed Nestle phase II clinical trial in Bangladesh, a strong understanding of the basic science of how such phage normally behave in environmental conditions is more important than ever. Here we demonstrate that bacteriophage T4 can successfully bind to and infect stationary phase *E. coli* with and without a functional rpoS, and explore the ability of infected cells to respond to nutrients 5 and 24 hr after infection, but a new and unexpected mode of response was observed, which we call "hibernation mode". It involves a persistent but reversible dormant state where development is started, but is shut off before the production of phage particles. When fresh glucose and casamino acids are provided to infected cells in "hibernation" mode, the standard lytic infection process rapidly resumes, and concentrations of up to  $10^{11}$  progeny phage are produced – an average of about 40 phage per initially-present cell. Our evidence indicates that the halt of phage development in "hibernation" mode occurs after the middle-mode stage of phage development; host DNA breakdown and the incorporation of the released nucleotides into phage DNA indicate that the enzymes of the nucleotide synthesizing complex, under middle-mode control, are made and assembled into a functional state. This previously undescribed "hibernation" mode might help explain the poor performance of T4 replicating with or without *E. coli* in the guts of otherwise-sterile mice (a ratio of only 300 for T4, as compared to  $10^6$  for T7) in a 2008 Nestle trial and the difference in replication seen between the predominantly T4-like phage cocktail used in the Nestle trial compared to a commercial Russian cocktail also tested, containing phages against *Proteus* and *E. coli* some of which were T7-like.

## A phage-based assay for detection of pathogens

Carvalho C., Costa S., Melo L.,  
Santos S., Freitas F., Azeredo J.

CEB-Centre of Biological Engineering, University of Minho,  
Braga, Portugal

The incidence of infectious diseases is a major concern worldwide. Their prevention or reduction is dependent on the ability to rapidly identify contributing pathogens.

Some phage proteins present potential as probing elements for the detection of pathogens. Examples include the cell wall binding domains (CBDs) of phage endolysins that recognize and bind to the bacterial cell wall and the proteins located at the phage tail fibers (TFP) that mediate attachment of the phage to its receptor on the bacterial surface.

In this work a TFP of a *Campylobacter* phage and a CBD of a *Staphylococcus* phage endolysin were combined with microscopy and flow cytometry techniques for the detection of *Campylobacter* and *Staphylococcus*.

For this purpose, a Green Fluorescent Protein (GFP) was fused to the N-terminal of the TFP and CBD, expressed by heterologous recombination and purified. Thereafter these fluorescent proteins were hybridized with Gram-positive and Gram negative strains and observed by microscopy. They were also combined with flow cytometry assays and, by eliminating background fluorescence and improving signal to noise, it was possible to measure bacterial loads. Both methods showed the specificity and sensitivity of the TFP and CBD proteins for *Campylobacter* spp and *Staphylococcus* spp, respectively.

Overall this work shows that the phage-based assay described herein has potential application in quality control in food industry, environmental, and clinical contexts for detection of *Campylobacter* and *Staphylococcus* strains. Further work includes the development of a multiplex tool with the ability to detect several pathogens simultaneously.

## Experimental phage therapy to treat a persistent *Pseudomonas aeruginosa* infection associated with an aortic Dacron graft

Benjamin Chan PhD<sup>1</sup>, Paul E. Turner PhD<sup>1,3</sup>,  
Samuel Kim<sup>2</sup>, Hamid R. Mojibian MD<sup>4</sup>,  
John Elefteriades MD<sup>3</sup>, Deepak Narayan MD<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology,  
Yale University;

<sup>2</sup>Program in Microbiology, Yale School of Medicine;

<sup>3</sup>Department of Surgery, Section of Plastic Surgery,  
Yale School of Medicine;

<sup>4</sup>Department of Radiology, Yale School of Medicine

*Pseudomonas aeruginosa* infections are notoriously difficult to manage due to their intrinsic antibiotic resistance and ability to form biofilms. Due to frequent failure of conventional antibiotics, alternative strategies to treat biofilm-associated bacteria are urgently needed. One such strategy, 'phage therapy,' is the application of lytic bacteriophages (phages) for the eradication of bacteria. We recently identified phage OMKO1 that utilizes the outer membrane protein M of the mexAB- and mexXY- multidrug efflux systems of *P. aeruginosa*, forcing bacteria to trade acquisition of phage resistance for increased antibiotic sensitivity. We tested phage OMKO1 for its' ability to remove biofilms from sections of Dacron *in vitro* prior to application *in vivo*. Biofilms were grown on sections of Dacron using cultures of *P. aeruginosa* isolated from our case patient. The sections of Dacron were then exposed to LB medium

containing purified OMKO1, ceftazidime or ciprofloxacin at 2 x MIC, antibiotic at 2 x MIC + OMKO1, or blank control. Dacron sections were then removed and cell density measured with an automated spectrophotometer. Addition of phage OMKO1 to either ciprofloxacin or ceftazidime eliminated biofilms grown on Dacron sections ( $p = 0.001$ , ciprofloxacin and  $p = 0.007$ , ceftazidime) and was, itself significantly different than no treatment ( $p = 0.001$ ). However, neither ciprofloxacin nor ceftazidime at 2 x MIC was sufficient to eliminate 72 hour biofilms ( $p = 0.074$ , ciprofloxacin;  $p = 0.063$ , ceftazidime). Following *in vitro* studies, we prepared phage OMKO1 for therapeutic application in an 81-year old male with a chronic *P. aeruginosa* infection of his aortic arch Dacron graft with fistulization to the chest wall. We treated this infection with topical application of OMKO1 and ceftazidime through his chest wall fistula. The Food and Drug Administration and Yale University Human Investigation Committee gave their approval for the use of OMKO1 as an investigational new drug. The patient went on receive emergency surgery for partial removal of his Dacron graft for bleeding from an aorto-cutaneous fistula. Cultures of the Dacron graft did not yield *P. aeruginosa* and the patient has remained off antibiotics post-surgery without evidence of recurrent infection.

---

## Dual active site in the endolytic transglycosilase gp144 of bacteriophage phiKZ

**Chertkov O.V., Armeev G.A., Legotsky S.A., Shaytan A.K., Klyachko N.L., Miroshnikov K.A.**

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia;*  
*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Lytic transglycosilases is an abundant type of peptidoglycan-lysing enzymes. They degrade heteropolymers of bacterial cell walls as a part of cell metabolism or bacteriophage infection. Current knowledge suggests the presence of the only Glu or Asp amino acid residue in the enzyme active site.

Endolysin gp144 of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage phiKZ belongs to the group of Gram-negative transglycosilases with modular composition and C-terminal location of the catalytic domain. The predicted role of catalytic residue is played by Glu115. However, the mutation of this residue does not result in complete inactivation of the enzyme, the residual activity of the mutant protein is ~50% compared to wild-type.

We suggested that the polypeptide chain of phiKZ gp144 contains two active sites: major E115/Y197 and reserve E178/Y147. The chain of peptidoglycan molecule can bind the groove on the enzyme globule in two directional ways. The direction of the substrate chain defines which of two active sites would perform the degradation reaction. Site-directed mutagenesis also have revealed the participation of Tyr197 residue in the catalytic mechanism. We obtained single- and double mutant derivatives of phiKZ gp144: E115A, E178A, E115A/E178A, E115A/Y197F. Single point mutations demonstrated activity about 50% compared to wild-type enzyme.

Double mutant E115A/E178A is inactive, since glutamate residues in both active sites are replaced. Mutant E115A/Y197F has no activity despite one of active sites remains unchanged. Double mutation of closely located amino acids caused the significant alteration of binding surface and surface charge of the groove, thus preventing the substrate binding. The presence of the second active site, as well as changes in charge and structure of mutants was demonstrated by computer modelling and conformational molecular dynamics.

The data obtained prove the hypothesis about the dual active site in phiKZ gp144 globule, and enlighten the catalytic mechanism of the protein. An additional active site is probably the result of evolutional duplication, since the sequence homology and structure prediction of two active sites is very high.

*The study is supported by RFBR grant # 15-04-07995.*

---

## Developing bacteriophages to make *Clostridium difficile* less difficult to treat and diagnose

**Martha R.J. Clokie, Janet Nale,  
Kate R. Hargreaves, Jinyu Shan**

*Department of Infection, Immunity and Inflammation,  
Maurice Shock Building, University of Leicester, UK*

*Clostridium difficile* is the most common causal agent of bacterial induced infectious diarrhoea in the industrialised world. It causes a significant health and financial burden and is difficult to treat and to diagnose. Bacteriophages could play a valuable role both for treating patients and in identifying this pathogen. We have isolated a large set of *C. difficile* bacteriophages with the view to developing them for next generation therapeutics and diagnostic tools. Such exploitation of phages clearly benefits from a thorough understanding of their biology and much of the research in my laboratory has focused on unravelling how phages interact with *C. difficile* in the natural environment and on determining what dictates successful phage infection in this system.

The presentation will fall into three sections, the first will cover our ecological studies of *C. difficile* phages in different environments and show how phages from natural environments differ from those found in a clinical context. I will show how an understanding of these phages in the natural environment has informed strategies for phage isolation and facilitated the selection of a broad host range set of phages for this pathogen. The second part will present data on phage genomics, transcriptomics, proteomics and tail fiber characterisation and show how insights from this work have informed the development of phage products. In the third section I will give details on how we have developed biofilm, epithelial cell line models and waxmoth (*Galleria mellonella*) models to probe the *C. difficile*-host interactions. Together, the data show that we can target most clinically relevant and prevalent strains of *C. difficile* and that they have a significant effect on the pathogen when used as a prophylactic. They could be used to either to replace or extend the efficacy of the current most commonly used treatments.

## Exploitation of phage-host interactions for rapid bacterial identification and antibiotic resistance determination

Chris Cox

Advanced Biodetection Technology Laboratory Colorado  
School of Mines Department of Chemistry & Geochemistry  
GRL Rm 341 Golden, CO 80401

There has been a recent resurgence in research aimed at the use of phage therapy to treat antibiotic resistant infections, and important advancements are being made in the effort to bring this promising alternative into mainstream medicine. Equally important to these efforts is the need for more rapid methods for identifying the offending bacterial target and determining its antibiotic resistance profile in order to better inform phage selection and improve antibiotic stewardship. With a view towards complimenting therapeutic application of phages, we have exploited phage amplification and species specificity for simultaneous bacterial ID and antibiotic resistance profiling. This was accomplished by coupling natural phage infectivity and its necessity for a viable host to contemporary MALDI-TOF MS diagnostic instruments, which in recent years have become widely utilized in clinical laboratories worldwide. Current ID methods for *Burkholderia pseudomallei*, an increasingly antibiotic resistant human pathogen with demonstrated potential as a highly lethal biowarfare agent, rely on antiquated techniques requiring 24–48 hours that make accurate diagnosis difficult and time consuming. This significantly increases the odds of mortality because of delayed onset of treatment. To address this, phage-based MALDI was investigated for rapid ID and simultaneous ceftazidime resistance determination. Susceptible and resistant strains were infected with broadly targeting phage φX216 and production of the 37.6 kDa capsid protein observed by MALDI over the course of 3-hour infections. ID was reproducibly achieved within 2 hours. Time to detection correlated well with in silico modeling. The Ceftazidime susceptible strain, while detectable in the absence of the drug, owing to the reliance of phages on a viable host, was not detectable when ceftazidime was added at the onset of infection. In contrast, the resistant strain was detected in the same timeframe both with and without antibiotic. The result was significantly increased diagnostic sensitivity and drastically reduced testing time.

## Immunological reactions to bacteriophage applied *in vivo*

Krystyna Dąbrowska

Institute of Immunology and Experimental Therapy,  
Wrocław, Poland

Applications of bacteriophages to animals or humans, including antibacterial therapy, vaccines and other types of nanocarriers, share a common feature: phages make a direct contact with the mammalian organism and thus challenge the mammalian immune system. Although the first studies on the interactions between bacteriophages and the immune system

were conducted yet by Felix d'Hrelle shortly after the discovery of bacteriophages we still do not have a complete picture of all elements and factors that are engaged. The most general classification of immune factors that may affect phage comprise innate versus adaptive immune system.

Innate immunity represents non-specific reactions to foreign objects and its activation leads to inflammation. This type of response engages a wide collection of leukocyte types. These are mainly the phagocytes, capable of recognizing and eliminating pathogens. Acellular and therefore humoral elements of innate immunity are represented mainly by the serum complement system. Both phagocytes and complement system are capable of neutralizing phages, although phages themselves do not induce inflammation.

Adaptive immunity response is executed by specific elements of the immune system. The adaptive immune system further asserts immunological memory that may substantially impact phage bioavailability *in vivo*. These specific immune responses involve lymphocytes; major types of lymphocytes are B cells and T cells. B cells are involved in the humoral immune response, i.e. in specific antibodies production. Antibodies interact with bacteriophages and shape phage pharmacokinetics and thus phage antibacterial potency *in vivo*. Phage ability to induce specific antibodies depend on phage dose, route of administration and on individual properties of the phage.

Innate immunity and adaptive immunity elements are tightly linked into one, consistent system: they cooperate, stimulate and/or control each other, depending on individual situation and needs. Good recognition of phage interactions with mammalian immunity opens the way for both successful phage use as nanocarriers or antibacterials, and for understanding of complex balance in coexisting microbial communities.

National Science Center in Poland grant  
no. UMO-2012/05/E/NZ6/03314).

## Bacteriophage control of *Escherichia coli* serogroup O55 in milk

Denisenko E.A., Verevkin V.V., Krasilnikova V.M.,  
Volozhantzev N.V., Svetoch E.A.

State Research Centre For Applied Microbiology &  
Biotechnology, Obolensk, Russia

*Escherichia coli* serogroup O55 is a frequent causative agent of diarrhoea, hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome – diseases potentially fatal for infants and children under 5 years old. Food milk is one of the most important sources of shiga-toxin producing *E. coli* (STEC) including *E. coli* O55.

Preparation including two virulent bacteriophages isolated from sewage, EcO55-1 and EcO55-74, was used for biocontrol of STEC strain ED451 O55. Bacteriophages were able to propagate and lyse STEC strains of serogroups O157, O103, O126, and others. The mixture of phages inhibited the growth of *E. coli* O55 ED451 for several days in the nutrient broth at 37°C. DNA of both phages is hydrolysed by endonuclease

Vspl, while Sall cleaves EcO55-74 DNA only. Complete genome sequencing of both phages is in progress. *E. coli* O55 ED451 cells and the mixture of phages with the multiplicity of infecting (MOI) 0.1, 1 and 10 PFU/CFU were added to commercial milk. The samples were incubated under different conditions: at 37°C and at room temperature for 5 and 24 hours, and in the refrigerator up to 4 days. After cultivation at 37 °C the cells of *E. coli* O55 ED451 were not detected in milk samples at all MOI indications, while the concentration of pathogen reached  $1 \times 10^8$  CFU/ml after 24 hours in control milk samples (without phages). Cultivation of contaminated samples of milk at room temperature yielded complete suppression of *E. coli* O55 ED451 in samples with MOI = 10. Concentration of pathogens dropped two orders of magnitude in samples with MOI 0.1 and 1 compared to control. The 10-fold reduction *E. coli* O55 ED451 was noted on the 4-th day in refrigerated milk samples with MOI=10 phage concentration, while the concentration of pathogens increased 5-fold during the same period in control samples. The obtained results indicate the prospects of research on application of lytic bacteriophages EcO55-1 and EcO55-74 for the control of STEC strains in milk.

## Comparison of the lytic effect of staphylococcal polyvalent bacteriophages

Doskar J., Varga M., Kolackova I., Karpiskova R., Maslanova I.

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

Since 2005, there is a worldwide spread of livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in livestock breeding. In the Czech Republic, as in other EU countries, mainly pig (35%) and dairy (8%) farms are subject to this spread.

A comparison of the lytic effect was made for Twort-like bacteriophages isolated from therapeutic preparations Stafal (Bohemia Pharmaceuticals), PyoPhage (Eliava Biopreparations), and for phage 812 along with its broad host-range mutants. Altogether, 199 *S. aureus* strains were tested, 92 of which were MRSA isolated from farms and foodstuff in the Czech Republic. Fifty-seven percent of strains were sensitive to all phages, whereas 39% to some of them. Insensitivity to all phages was shown by 4% of strains, classified in clonal lineages ST1/t127, ST45/t015, and ST361/t011. The lysis efficiency differed among phages, but generally exceeded 70% of *S. aureus* strains. The host-range mutants were able to lyse strains resistant to phages from the above preparations, reflecting differences in these phages. The study shows that broad host-range mutants of phage 812 have high lytic potential towards livestock associated staphylococci.

Supported by the Ministry of Agriculture (QJ1510216) and Ministry of Health of the Czech Republic (16 29916A).

## Creation of new drugs for prevention and treatment of infectious diseases on the basis of bacteriophages and their lytic enzymes

Dyatlov I.A.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

One of the ways to solve the problem of antibiotic resistance of the pathogens of infection diseases of bacterial origin is the use of bacteriophages and their lytic enzymes – endolysins and depolymerases as a means of diagnosis and prevention.

The basic research objectives in this field are: the forming the collection of lytic bacteriophages that are active against pathogens, the detection of the diagnostic bacteriophage, their characterisation according to the spectrum of lytic activity, the nature of the interaction with the cell, the evaluation of morphology, safety, pharmacokinetics, efficacy in experiments on laboratory animals, the study of the genomes of lytic bacteriophages, the phylogenetic analysis, the identification, cloning and expression of genes of phage lytic enzymes, the study of the phage interaction with the bacterial cell on the level of the primary receptors, the development of bacteriophage preparations for use in medicine, veterinary medicine and food industries.

In therapeutic use of phages, we have a number of problems associated with immune responses, a rapid release of toxins by lysis and difficulties in determining the effective dose. The possible immunogenicity of phages and their lysines can be reduced using a “deimmunization” of protein technology consisting of the modifying of T-cell epitopes. The design of recombinant endolysins deficient bacteriophages that kill the cells but do not lyse them allows to avoid the rapid release of toxins by lysis, and also this aim can be reached by simultaneous using choline, perforating the cell wall. An important area of research in this area is the construction of recombinant phages selectively lysing only the resistant strains.

The basis for the use of phages in the field of creating of recombinant protective molecules in the design of chemical vaccines and new vaccine strains is the use of specific recombinant bacteriophages, which prophage state can change the properties of a microorganism directionally. Recombinant phages can carry additional genes, the products of which can change the structure of LPS of bacteria or produce the genetically engineered toxoids that are “anchored” in the bacterial membrane.

## ***Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* bacteriophages indicators of bacteria in external environment**

Efreytorova E.O.<sup>1</sup>, Pulcherovskaya L.P.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>, Pavlova I.B.<sup>2</sup>, Yudina T.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;  
<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The value of using bacteriophages as the sanitary-indicative microorganisms of faecal contamination is as follows:

- a) bacteriophages are isolated from wastewater at the same frequency like many enteropathogenic viruses;
- b) they are similar to enteroviruses in resistance to chemicals;
- c) methods of detection of bacteriophages are very simple.

The aim of our research was the use of *Serratia* bacteriophages as an indicator of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* bacteria in the environmental objects such as water and sand from the beach of the Sviyaga river.

For the study, the samples of water and sand were selected, and studies for the detection of phages of bacteria of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* species were conducted. The studies were carried out according to classical methods.

The testing samples were inoculated onto the broth with the indicator strains of homologous *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* species, and then the phage titer assay was done on the solid nutrient medium by Gratia method. After incubation, the number of negative colonies, which corresponds to the number of phage particles in the inoculated material was counted, and then converted to a titer. These studies can be conducted in any bacteriological laboratory for 18–24 hours using simple nutrient media and simple equipment. During the studies, three phages were isolated and selected: 2 for the *Serratia marcescens* (SM-5, SM-7) species from the water and sand, and 1 for *Serratia liquefaciens* (SL-4) species from the sand.

Of those samples of sand and water the microorganisms belonging to *Serratia* genus were isolated by the cultural method. As a result of these studies 2 bacterial strains were isolated: 1 – *Serratia marcescens* and 1 – *Serratia liquefaciens*.

The studies confirm the value of bacteriophages as entities sanitary-indicative of *Serratia marcescens* and *Serratia liquefaciens* bacteria.

## **Phage indication of *Serratia* genus bacteria**

Efreytorova E.O.<sup>1</sup>, Pulcherovskaya L.P.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin C.H.<sup>1</sup>, Pavlova I.B.<sup>2</sup>, Yudina T.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;  
<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

We conducted the studies for the identification of the bacteria of *Serratia* genus isolated from the river sand (the sand from beaches), from the sand of the children's sandboxes, from the soil inhabited by wild bees, from washings from tanks

for temporary storage of milk on the farms, rotting houseplants and mucous plaque from sewers of apartments and other subjects in its field – generally, 19 strains of *Serratia* genus of bacteria has been studied.

For our studies, we used *Serratia* bacteriophages with lytic activity not lower than  $2 \times 10^7$  by Gratia, previously isolated by us from environmental objects such as sand children's sandboxes, the water of open bodies of water, sewage, etc.

Using the strict specificity of used bacteriophages to bacteria of *Serratia* genus, we used the method of "dripping drop" for rapid identification of these microorganisms.

The result of the research was considered to be positive if at the place of application of at least one of the strains of phages on the lawn of the solid growth of the culture a clear zone of lysis with the secondary growth of phage resistant microorganisms or without it was formed, as well as the formation of phage negative colonies. The result was considered to be negative in the absence of lysis on the lawn of growth of studied cultures of microorganisms and the absence of lysis in control. In the case of the positive result, the culture was referred to the *Serratia* genus.

As a result of the studies all studied strains were attributed to *Serratia marcescens* species.

## **Phage indication of *Bacillus anthracis* by reaction of phage titer increase**

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>, Belova K.V.<sup>1</sup>, Klimushkin E.I.<sup>1</sup>, Lydina M.A.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Shmorgun B.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrilchevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

In practice, the methods of detecting of pathogens are difficult to perform. This is due to the relatively low concentration of bacteria detected in the sample. The second factor complicating the detection of infectious agents is the presence of extraneous microflora including closely related, having a significant level of antigenic relatedness. For example, the antigenic differences between species of *B. anthracis* and other representatives of this genus (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*) are minimal.

The improvement of existing proven methods and the development of new methods of indication of *B. anthracis* in the soil samples are the actual research topic.

Taking into account all difficulties of pathogen indication in sanitary control facilities noted above, the method (reaction of increase of phage titer) has been proposed.

By the experimental way, we proved the efficiency of the reaction of increase of phage titre for indication of the anthrax pathogen in the soil samples belonging to different types, which have respectively different hydrogen indices. We have determined that the soil sample from Orenburg region refers to the black soil – pH 6.3; soil sample from Astrakhan region is a light brown soil with pH of 7.4; soil sample from Ulyanovsk

region is a grey forest soil with pH 5.2. It was found that the anthrax bacteriophage is capable to the cycle of intracellular development in the frame of parameters previously defined by authors while pH is changing in a fairly wide range – pH 3.4–8.2. Empirically, we have proved the possibility of conducting the reaction of increase of phage titer to indicate 103 microbial cells/g of the anthrax pathogen in soil samples belonging to different types, without the isolation of a pure culture of the pathogen. The time interval needed to conduct the reaction of increase of phage titer is 24 hours = 30 minutes (setting up of the experiment) + 5 hours (time of cultivation) + 30 min (phage titer assay by Gratia method) + 18 hours (time of cultivation).

## **Isolation and selection of *Bacillus coagulans* bacteriophages**

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>,  
Belova K.V.<sup>1</sup>, Shokina K.V.<sup>1</sup>, Lydina M.A.<sup>1</sup>,  
Maslyukova K.V.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Shmorgun B.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

According to the literature, the flat-sour spoilage is produced by the heat resistant *Bacillus coagulans* bacteria, sometimes in association with the mesophilic and thermophilic microorganisms *B. cereus* and *B. subtilis*. However, the thermal effects and low pH value during cooking results in a significant reduction in bacterial contamination of conservation tomato filling. At the output (acceptance) control, the problem of indication and identification of *B. coagulans* arise. For this purpose, we can use the specific bacteriophage that allows to identify the food contaminants quite reliably and conduct their differentiation on biotypes and phagovars within the species.

In our studies, we isolated 7 *B. coagulans* bacteriophages from the environmental objects. The induction method showed the negative results of the experiment – the prophage of *B. coagulans* bacteria 566, *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468 has not been found.

The bacteriophages selection was conducted by tenfold passage of isolated negative colonies on meat-peptone agar with re-plating onto the meat-peptone broth. The optimum ratio was 1: 1, i.e. 0.2 ml of phage for 0.2 ml of indicator culture. The passage time was 7 hours of incubation at 35 ± 2°C. To clean the phages from bacterial debris, three methods were used: treatment with chloroform (trichloromethane), a heating and filtration through the membrane filters.

It has been established that the bacteriophages isolated and selected by authors are resistant to temperatures in the range 57–90°C for 30 minutes, so this method cannot be used for phage purification. *B. coagulans* phages showed different sensitivity to the impact of chloroform: B.c. – 1 УГСХА and B.c. – 2 УГСХА were not resistant to the impact, the other phages were resistant for 15 minutes. But using this method of purification is not quite appropriate as it is time-consuming and resource-intensive. Empirically it was found that the use of the

filters of Millipore company with a diameter of 0.1 µm GV if the most preferable way to remove all debris. The results indicate that the studied bacteriophages are strictly specific within *B. coagulans* species and, potentially, may be a part of a biological product for its identification and indication.

---

## **Selection of parameters for reaction of increase of phage titre for the bacteriophage infecting *Bacillus anthracis***

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>,  
Belova K.V.<sup>1</sup>, Klimushkin E.I.<sup>1</sup>, Kaldyrkayev A.I.<sup>1</sup>,  
Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Shmorgun B.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

The special literature describes several methods for *Bacillus anthracis* indication based on the application of specific bacteriophages. To identify the anthrax pathogen, the following methods of phage indication are used: the reaction of increase of phage titer (IPT), phage adsorption reaction, phage-tetrazole method and fluorescent-serological method.

All of the above methods, except IPT, impose certain material costs (chemical reagents, accessories), so for the purpose of phage indication of anthrax pathogen in the environment, we plan to develop the parameters for arrangement of this reaction (a quantitative indicator of reaction that has diagnostic value, and optimal time that is ensuring full interaction between the phage and bacteria).

Empirically, we have found out that the pre-rearing of the material during exposure time (5, 16, 24 h) and cultivation in a thermostat at a temperature of (36 ± 1) at °C during some time (5,10, 15, 24 h) allow to detect *B. anthracis* bacteria by the IPT at a concentration of 10<sup>3</sup> m.c./ml. The same concentration of bacteria is identifiable while arranging IPT without the pre-rearing of the material at the time of cultivation exposure (the phage + indicator culture) equal to 5 hours. Thus, the time interval spent on arranging IRT is: 30 minutes (experience tab) + 5 hours (the time of cultivation) + 30 min (titer assay by Gratia method) + 18 h (the time of cultivation) = 24 hours. Rearing of the test material does not increase the sensitivity of the reaction, so it is not recommended.

Experimentally derived data allow asserting that the number of plaque forming units increase for 5 times with the given parameters that have the diagnostic value in the indication of anthrax pathogen by the reaction of increase of phage titer.

## Biological properties of anthrax bacteriophage

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>,  
Belova K.V.<sup>1</sup>, Klimushkin E.I.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>,  
Shmorgun B.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichhevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

The research for the study of the basic indicators of the biological properties of the anthrax bacteriophage, isolated by the team of authors in 2015, allowed to determine that the studied bacteriophage while cultivating on different *B. anthracis* strains has a lytic activity, which is not changed during storage in a domestic refrigerator (2–4°C) without the addition of a preservative for 9 months.

It was found that the isolated and selected phage is strictly specific within the *B. anthracis* species (the experience shows that the spectrum of lytic effect of the studied anthrax bacteriophage on four strains – vaccine strains of *B. anthracis*-СТИ and *B. anthracis* 55-ВНИИВБиМ, avirulent strains of *B. anthracis* – Шуя-15 and *B. anthracis* 34 F2 are 100%) and does not lyse *B. subtilis* cultures – 6 strains, *B. mycoides* – 12 strains, *B. megaterium* – 5 strains, *B. cereus* and *B. thuringiensis* – 52 strains, *B. pumilus* – 8 strains, *B. coagulans* – 3 strain. The above-mentioned characteristics of anthrax bacteriophage show that it can be used for the construction of a biological product for the phage indication and phage identification of *B. anthracis* bacteria.

Based on these data it was found that as a promising phage production strain, the strain *B. anthracis* Шуя-15 is recommended, as plating on meat-peptone agar on which the negative colonies with a clear edge and the transparent center formed is extremely important for visual counting of the colonies in the case of setting of the reaction of increase of phage titre. The cultivation of the studied bacteriophage on the above-mentioned strain gives lytic activity –  $1.0 \times 10^8 \pm 0.1 \times 10^8$  PFU in 1 ml of phage lysate. While conducting the similar studies this value on the strain of *B. anthracis* 34 F2 is  $3.0 \times 10^8 \pm 0.1 \times 10^8$  PFU in 1 ml of phage lysate. However, the visual characteristic of phage negative colonies obtained on the indicator culture may complicate the estimation of results in the reaction of increase of phage titer. Therefore, the use of *B. anthracis* 34 F2 strain as a promising and productive one is possible if the comparison of indicators is done in case of setting the reaction of increase of phage titer on both strains.

## The scheme of identification of *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* in objects of sanitary inspection

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>, Makeev V.A.<sup>1</sup>, Kaldyrkayev A.I.<sup>1</sup>, Maslyukova K.V., Aleshkin A.V.<sup>2</sup>, Shmorgun B.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichhevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia

Using biochemical test system proposed for typing in GOST 1044.8-88 and in differentiation schemes of bacteria of *Bacillus* genus (Smirnov, 1982), we were faced with a number of drawbacks: a problem of variability of the biochemical characteristics of bacteria *B. cereus* and *B. mycoides*, and, accordingly, with a high probability of false result.

An analysis of published data, as well as their own research, we have created a scheme with the identification tests that allow identifying bacteria to species with the greatest accuracy. Initially, the original scheme was tested on artificially contaminated objects of sanitary surveillance to identify the optimal time and temperature parameters. We have developed a scheme of isolation and identification of bacteria *B. cereus* and *B. mycoides* that involves several steps. The test material is divided into two groups depending on in what form (spore or vegetative) are bacteria of the *Bacillus* genus:

- The first group – soil, food with obvious signs of spoilage, foods with low moisture content (generally containing spore form of *Bacillus spp.*);
- The second group – fresh food products, pathological material, wound exudate, excrements (generally containing the vegetative form of *Bacillus* genus bacteria).

Then the research was carried out on sanitary inspection facilities. Analysing the data obtained it should be noted that most of the strains of bacteria *B. cereus* and *B. mycoides* were isolated from soil samples with poorly flowing processes of mineralisation of organic substances, that require an organic nitrogen. This reflects the correlating relationship between the physiology of microorganisms and properties of their environment.

Using scheme of isolation and identification of *B. cereus* and *B. mycoides* bacteria proposed by us, that includes 30 biochemical tests and the phage identification methods, characteristic for cultural properties, we examined 536 samples of objects of sanitary supervision obtained in the Volga and Southern Federal Districts of the Russian Federation over the five-year period.

## The phage indication of *Bacillus anthracis* in raw meat

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>,  
 Belova K.V.<sup>1</sup>, Shokina K.V.<sup>1</sup>, Lydina M.A.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>,  
 Shmorgun B.I.<sup>3</sup>, Pavlova I.B.<sup>4</sup>, Judina T.G.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The research on the selection of parameters for arrangement of the reaction of increase of phage titer (IPT) with anthrax bacteriophage, isolated by the team of authors in 2015 from the meat raw, were conducted. We used minced meat (the ratio was 1 : 1, pork and beef). Phage titer for the reaction was  $10^2$  and  $10^3$  PFU/ml. Sample preparation: the ratio of minced meat and sterile meat broth was 1 : 10, the number of the indicator culture for the artificial contamination of minced meat – 5 ml).

It was determined experimentally that the prior rearing of the material with artificially inserted indicator culture (bacterial concentration is  $10^5$ – $10^3$  CFU/ml) in the time exposure (5, 16, 24 h) and cultivation in a thermostat at a temperature of ( $36 \pm 1$ ) °C for (5, 10, 15, 24 h) allow to detect the indicator bacteria *B. anthracis* during the reaction of increase of phage titer (IPT) in concentration  $10^5$ – $10^3$  CFU/ml. The similar concentration of indicator culture was detected while setting IPT without the stage of “rearing of the material”, at the time of exposure of the cultivation (the phage + indicator culture) equal to 5 hours. Rearing of the test material (raw meat) does not increase the sensitivity of the reaction, so it is not recommended. It is established that the time required for phage indication of *B. anthracis* by IPH is 24 hours (30 min (experiment setup) + 5 hours (time of cultivation) + 30 min (titer assay by Gratia method) + 18 hours (cultivation)).

Experimental data suggest that while using the mentioned options an increase in the number of plaque forming units occurs for 5 times or more, with the initial concentration of bacteria  $10^5$ – $10^3$  CFU/ml in raw meat that has a diagnostic value in the indication of anthrax pathogen by the reaction of increase of phage titer.

## Methods of identification of *Bacillus coagulans* including the phage identification

Feoktistova N.A.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>,  
 Belova K.V.<sup>1</sup>, Shokina K.V.<sup>1</sup>, Lydina M.A.<sup>1</sup>, Aleshkin A.V.<sup>2</sup>,  
 Shmorgun B.I.<sup>3</sup>, Pavlova I.B.<sup>4</sup>, Judina T.G.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>G.N.Gabrichesky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>The All-Russian State Center for Quality and Standardization of Veterinary Drugs and Feed, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

17 samples of food products with distinctive features of flatsour spoilage were examined to reveal the presence of *Bacillus coagulans* bacteria.

For typing of the isolated cultures, we used the key by R.A.Slepecky, H.T.Hemphill that was developed for primary differentiation of bacteria of *Bacillus* and *Paenibacillus* genera. The algorithm of application of the key: in the case of the positive result of the determination of any of the biochemical properties the next stage that is recommended by authors is indicated by Arabic numeral in the horizontal and reflected in literal symbol vertically. The final stage of differentiation according to the key is the name of the species of microorganism.

In parallel, we conducted studies on the differentiation of isolated bacteria according to the scheme of isolation and differentiation of bacillus from the first morphological group by the classical method that is the basis of identification tests for bacteria of *Bacillus genus* in “Berger's Manual of Systematic Bacteriology”.

As a result of our research five bacterial strains has been isolated, and they have been assigned to *Bacillus coagulans* species. In order to optimise the process of identification of bacilli isolated from the food, we used the specific bacteriophages active against *Bacillus coagulans* previously isolated and selected by us according to the well-established technique of phage identification by the method of “dripping drop”. The studies used 7 bacteriophages *Bacillus coagulans*, isolated from environmental objects in 2016. It is found that the isolated culture assigned to the species *Bacillus coagulans* on the base of their biochemical properties study were lysed by specific bacteriophages.

The obtained results show the effectiveness of the use of specific bacteriophage preparations for typing of bacteria *Bacillus coagulans* as a reduction of research time and reducing labour costs on the background of saving of expensive culture media and reagents does not reduce the quality of the research that has been demonstrated by us in this experiment.

## Resolving diabetic foot infections: compassionate use of staph phage SB-1

Randy Fish, Elizabeth Kutter, Gordon Wheat,  
Mzia Kutateladze, Sarah Kuhl

Drug resistant infections currently kill about 700,000 people worldwide; current trends predict resultant deaths spiraling to 10 million annually by 2050. Despite growing interest in the possibilities of bacteriophage as components of a solution and their long history of successful use in some parts of the world, little progress has been made toward clinical trials to encourage phage therapy adoption. Both coliform infant diarrhea and burn wounds infected with *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* and/or *Staphylococcus aureus* provide promising eventual targets for phage-based therapies, but are complex and varied enough to be very challenging in terms of developing and rapidly implementing successful double-blind clinical trials, as required in the West. *Staphylococcus*-infected diabetic foot ulcers which have proven recalcitrant to antibiotics are promising for developing protocols permitting quick implementation. Phage treatment also offers a number of special advantages in tackling such chronic ulcer infections. Not only can phage treat antibiotic-resistant infections, but also cases where vascular compromise limits antibiotic effectiveness even when bacteria are sensitive to the antibiotics prescribed.

We here present three representative patients from a compassionate-use series of nine where phage treatment resolved the infections in every case of compromised soft tissue and bone where appropriate antibiotic treatment had failed, thus obviating the need for amputation. Toes were studied as they provide similar wounds equally distant from the central circulation, making them a particularly good subpopulation for randomized study. Our compassionate use of phage in diabetic foot infections demonstrates the effectiveness of phage when regular antibiotic treatment has failed and helped develop evidence based protocols for future randomized trials like that just posted by Pherecydes on ClinicalTrials.gov. Adding metagenomics analyses before and after treatment will help further test the widespread belief among wound physicians that *Staphylococcus aureus* is the critical "head of the snake" in such infections.

## Experimental bacteriophages for diagnostics of cholera

Gaevskaia N.E., Kochetkova A.O.

Rostov-on-Don Antiplague Institute, Rostov-on-Don, Russia

In the system of the laboratory diagnosis of cholera the phage tests play an important role but in the recent years a steady decrease (down to 77.4%) of the sensitivity of *V. cholerae* isolates to the diagnostic phages used was observed. Therefore the search for new races of cholera phages is actual. The demand for them is due to the need of the diagnostic tools able confirm the specific properties of cholera causative agent in effective, simple and reliable way.

The aim of our work was to find new diagnostic cholera phages that would be active against phage-resistant strains of *Vibrio cholerae*. The newly obtained phage isolates differ from the the phages used before by a number of biological traits, first of all by the ability to overcome the resistance of the host cells.

In this work we used 267 strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor (52 strains of ctx + tcp +, 9 strains ctx-tcp +, 206 strains of ctx-tcp -), among them 253 isolates obtained in 2001–2015 were resistant to the phage "Eltor". we also used 24 isolates of the *V. cholerae* Classical. We included into our study the typical cultures of *Vibrio cholerae* El Tor as well as modified versions (RO, RS). The study of the phage properties was conducted by standard methods. The nutrient media used for the experiments were the Martin's broth pH 7.6–7.8, and the solid medium with 0.7%, 1.5% of agar prepared with the same broth.

As a result of the work four cholera bacteriophages were selected. Analysis of their lytic activity showed that all the *V. cholerae* strains used were lysed in varying degrees by one or more of the bacteriophages (O1, Cl, El 1, El 2).

Electron microscopy examination of the new cholera bacteriophages indicated that phages O1, El 1 and Cl belong to Podoviridae family; El 2 phage belongs to Myoviridae. According to the serological properties the cholera phage O1 refers to the serological type 2 of cholera phages, phage Cl – to the type 3, El 1 and El 2 – to the type 7.

The specificity of the phages to the host was confirmed on a large set of microorganisms of *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae* families, that were not lysed by the tested phages. Our phages were active only against *Vibrio cholerae* O1 strains.

Thus, analysis of the obtained results showed that the experimental diagnostic cholera phages can be used to identify of the strains of *V. cholerae* serogroup O1.

## Mycobacteriophage Ms6 LysB: role on the mycobacteria lysis process

Gigante A., Hampton C., Dillard R., Moniz-Pereira J., Wright E., Pimentel M.

Research Institute for Medicines (iMed.ULisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

Bacterial lysis is the final event of a phage lytic cycle. To accomplish this step bacteriophages have to overcome the bacterial cell barriers, synthesizing at least two essential proteins: the holins, which compromise the cytoplasmic membrane and endolysins, enzymes designed to disrupt the peptidoglycan (PG) layer. In addition to these essential lysis proteins, phages infecting Gram-negative hosts encode a third functional class of lysis proteins, the spanins that target the bacterial outer membrane. Mycobacteria, although classified as Gram-positive bacteria, present an outer membrane with a high content in lipids and phages that infect mycobacterial hosts have to face this complex cell envelope.

The lytic cassette of Ms6, a mycobacteriophage that infects the non-pathogen *Mycobacterium smegmatis*, is composed of

5 genes, where *lysB* (*gp3*), encodes an enzyme shown to have lipolytic activity. We have previously demonstrated that LysB targets the outer-membrane of mycobacteria, cleaving the ester bond between mycolic acids and the arabinogalactan in the mycolil-arabinogalactan-peptidoglycan complex and thus disrupting the last barrier to phage release. In order to study the role of LysB in lysis we constructed an Ms6 derivative mutant (Ms6 $\Delta$ *lysB*), deleted of gene *lysB*, and we have seen that, in LysB absence, lysis still occur, but the new synthesized phage particles are deficiently released to the environment, remaining trapped in incomplete lysed cells. Taking advantage of Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) we clearly show that lysis of *M. smegmatis* cells infected with the mutant Ms6 $\Delta$ *lysB* is incomplete when compared with Ms6 wild type or Ms6 $\Delta$ *lysB*. At 150 min post-adsorption the cell envelope is incompletely lysed and phage particles are retained inside the cell, while cells infected with Ms6 wt are completely lysed.

In this work we show that LysB has an important role on host lysis. Our results confirm that, although non-essential, LysB is necessary for an efficient lysis of *M. smegmatis*, acting, similarly to the spanins, in the third step of the lysis process.

### Phage vB\_BcyT\_E283: a novel tectivirus infecting *Bacillus cytotoxicus*

Gillis A., Michaux C. and Mahillon J.

Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

*Bacillus cytotoxicus* is a recently recognized species belonging to the *Bacillus cereus* group of bacteria. *B. cytotoxicus* seems to be restricted to a few strains represented by the strain NVH391-98 (Guinebretière et al. 2013), which was isolated during a severe diarrheal food poisoning outbreak in France in 1998, resulting in three fatalities. Since then, other similar isolates have been associated with food poisoning outbreaks. *B. cytotoxicus* displays a particular thermotolerant ecotype, being able to grow between 20°C and 50°C and harbors the operon responsible for the synthesis of the potential diarrheic CytK1 toxin. Recently, a survey found that the incidence of *B. cytotoxicus* seems to be very high in a variety of potato-derived products (Contzen et al. 2014). Here, we describe a novel temperate phage infecting *B. cytotoxicus* E28:3 isolated from instant mashed potatoes. The phage, named vB\_BcyT\_E283, is the first tectivirus discovered infecting this bacterial species. Tectiviridae is a rare phage family comprising non-enveloped tail-less phages, where the ~15 kb linear dsDNA is located within a lipid-containing membrane covered by a rigid icosahedral protein capsid. Since tectiviruses found in the *B. cereus* group are temperate phages able to replicate autonomously as linear plasmids inside the host cell, plasmid profiles of the host strain *B. cytotoxicus* E28:3 were performed and analyzed, indicating the presence of an extra-chromosomal element with an approximate size of 15 kb. Phage suspensions were obtained from *B. cytotoxicus* E28:3 cultures after induction with mitomycin C and assayed against *B. thuringiensis* HER1410, a known susceptible host for tectiviruses. Single turbid plaques were randomly selected and single-plaque purified using strain HER1410. Phage DNA preparations coming from lysogens on

strain HER1410 confirmed the genome size of vB\_BcyT\_E283 and PCR screenings on lysogens, along with phage partial genome sequencing, revealed that the extra-chromosomal element in strain E28:3 is indeed a tectivirus. In an effort to assess the host range of vB\_BcyT\_E283, 100 strains of the *B. cereus* group devoid of tectiviral-like elements were tested. The results showed that this phage has a narrow host range, only infecting particular strains. Overall, these findings expand the view of tectiviral prophages in members of the *B. cereus* group.

---

### Sensitivity of *Bacillus anthracis* strains with different types of capsule formation to bacteriophages

Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I.

Stavropol Anti-Plague Institute, Stavropol, Russia

The specific anthrax bacteriophages are currently used to detect *B. anthracis*. The peculiarity of the anthrax microbe is the ability to exist in three morpho-functional forms: vegetative non-capsular form, vegetative form with capsule and a spore form. The influence of different anthrax bacteriophages on the capsular cultures of *B. anthracis* strains grown on the specialised media under conditions of high carbon dioxide content (for the strains that are typical in capsule formation) and in the air atmosphere for strains that do form the capsule under such conditions, is of considerable interest.

The goal of this work was to study phage sensitivity of *B. anthracis* strains with different types of the capsule formation depending on the test conditions.

We used 3 groups of strains: 1 – *B. anthracis* 81/1, 1284 – typical forming the capsule in vivo and on serum- bicarbonate agar in a high carbon dioxide atmosphere; 2 – *B. anthracis* 12/16 S and P 140 – capable of capsule formation on nutrient media in an air atmosphere, 3 – *B. anthracis* STI-1 228/8 – no capsule formation (no pXO2 plasmid). We used bacteriophages Fah – VNIIVV&M, R / D-Ph-6, Gamma A-26, IA-9, Saratov, K VIEV and 186.

For the experiments the nutrient media and culture conditions that are optimal for capsule formation in strains of the groups 1 and 2 were selected. The significant impact on the clarity of the test results had the fact that we used the cultures that were previously grown in the conditions facilitating the capsule formation. The application of the phage onto the culture that has not yet developed the capsule may lead to the before the formation of the capsule occurs. Under these conditions, strains of the groups 1 and 2 clearly showed the resistance to all bacteriophages that have been used. Group 3 strains grown in the non-capsule form in all cases were sensitive to all the bacteriophages.

Thus the state of the bacterial cell surface structures at the initial stage of interaction between the bacteriophage and the cell is one of the critical factors of *B. anthracis* sensitivity to lytic bacteriophages. While using specific anthrax bacteriophages for *B. anthracis* identification one should consider the existence of atypical strains capable of forming a capsule in conventional nutrient media in an air atmosphere, which makes them resistant to the action of lytic bacteriophages.

## Determination of the minimal gene set needed for the antiphage activity of *E. coli* BREX system

Julia Gordeeva, Ksenia Tsvetkova, Konstantin Severinov

Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russia

The constant arms race between bacteria and their viruses (bacteriophages or phages) plays a key role in the evolution of bacterial and viral genomes and leads to the development of new resistance mechanisms, such as restriction-modification systems, abortive infection (Abi) mechanisms and the CRISPR-Cas adaptive defense system. The use of restriction enzymes underlies most of the common laboratory practices, while CRISPR/Cas9 system has proved its high potential for gene targeting studies. Novel insights and additional applications will stem from the characterization of the new forms of bacterial antiviral defense. It was shown bioinformatically that the genes encoding the components of bacterial and archaeal defense system are typically clustered in defense islands. These islands contain numerous uncharacterized genes, which are candidates for new types of defense systems. One example of such candidate is recently detected BREX (Bacteriophage Exclusion) – hypothesized novel phage defense system. The set of BREX genes (a putative alkaline phosphatase, methylase, an ATPase, a LON-like protease, a predicted RNA binding protein and a gene of unknown function) does not resemble any classical combination currently known to be involved in phage defense and seems to act via unusual mechanism. It was shown that BREX is not an abortive infection system, neither it leads to direct cleavage or degradation of phage DNA. The antiphage activity of BREX system was confirmed by integrating BREX cassette from *Bacillus cereus* into the *Bacillus subtilis* genome, naturally lacking one, with *B. subtilis* cells subsequently gaining resistance to the wide set of lytic and temperate bacteriophages.

Our research is devoted to study of BREX system of *E. coli*. BREX-cassette from *E. coli* HS genome was cloned into two compatible expression vectors and transferred to *E. coli* BW25113, which has provided the transformed cells with the resistance to various coliphages (T7, T5, T4, lambda). To determine the minimal set of BREX genes that is sufficient for protection against phage infection brx genes were deleted one by one. The resulting strains were tested for antiphage resistance against phages T4, T5, T7. All genes, except brxA, have turned out to be essential for the protection against the phages used in study.

## Bacteriophages in treatment of severe abdominal pathology

Gostishchev V.K., Gorbacheva I.V., Stanoevich U.S.

I.M.Sechenov First Moscow State Medical University,  
Moscow, Russia

During the period 2000–2015 in the I.V.Davydovsky GKH (on the base of the department of general surgery of I.M.Sechenov First Moscow State Medical University) more than 5,000 patients with abdominal infection were treated. Of these, 450 pa-

tients had the diffuse peritonitis, and in the treatment programs for these patients the programme-staged sanitations were used, 430 patients suffered from acute intestinal obstruction, 370 had destructive pancreatitis. We used a combined product of commercial bacteriophages that showed an activity against identified nosocomial strains. In case of prolonged preoperative patient stay in the hospital where some of these nosocomial strains already present, the combined preparation allows to deal with the actual infection and to prevent the change of the dominant pathogen, as one of the 3 components plays a role of the main therapeutic agent and the others prevent the pathogen swap. 200.0 ml of the bacteriophage that was active against nosocomial flora were injected through nasointestinal feeding tube twice a day, the phage concentrations was 10<sup>7</sup>. If the patient for some reason was in the hospital for more than 3 days before the operation the antibiotic treatment included antibiotics that were active against nosocomial flora in combination with enteral administration of bacteriophages. The use of bacteriophages prevented the joining of nosocomial pathogens from the group of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus bovis* and *Escherichia coli* in all the patients. *In vitro* activity of isolated adapted bacteriophages was superior to the activity of antibiotics to which the nosocomial strains remained sensitive by a factor of 1.5 +/- 0.2 times. The same phage preparation was also used locally in late-stage of the sanitation of the abdominal cavity or the sanitation of bursa omentalis daily, once a day. The use of active bacterial viruses can prevent infection of organs due to bacterial translocation of the nosocomial flora in 69.2% of cases. The ideal phage therapy is the type-specific phages for each hospital adapted to its own nosocomial microbial landscape. The criteria for ending the use of bacteriophages are relief of systemic inflammatory response syndrome SIRS, the eliminating the source of infection, peristalsis recovery, the microbiologically verified reduction of peritoneal contamination below 10<sup>5</sup> CFU / ml.

## Artilysin® – moving from topical to systemic applications in the clinic

Markus Matuschka v. Greiffenclau

LYSANDO AG, WANGERBERGSTRASSE 91,  
FL-9497 Triesenberg, Liechtenstein

Antibiotic resistance occurring in “ESKAPE” pathogens is continuously growing threat to human healthcare. ARTILYSIN®s constitute a novel class of efficient, enzyme-based antibacterials with a new, targeted mode of action [1]. ARTILYSIN®s are recombinant fusion proteins consisting of an endolysin, which destabilises the bacterial peptidoglycan, combined with a targeting peptide that transfers the endolysin through the outer membrane of Gram-negative pathogens. For example, Art-175 passes the outer membrane of *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii* including multidrug-resistant and XDR strains, puncturing the peptidoglycan layer which leads to a kill due to osmotic pressure within seconds [2]. We will show data in this context and underline the capability of this technology to actively widen, or focus the number of Gram-negative species that are targeted.

Importantly, resistance development against various ARTILYSIN®'s could not be provoked on all strains, including MDR strains, investigated. Due to its mechanical, enzymatic mode of action ARTILYSIN®'s do not require an active bacterial metabolism for its activity, they show superior bactericidal effect against persister strains of *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumanii* and other bacteria [3, 4].

Application of Art175 on decubitus wounds demonstrate that it accelerates wound healing, even of serious, deep, persisting wounds, since it spares the natural microbiome and predominantly kills the targeted, persisting strains of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* or *Acinetobacter baumanii*. ARTILYSIN®'s facilitate the commensal bacteria re-colonising skin and wound, thereby preventing pathogens from re-infecting. This is in contrast to traditional antibiotics which affect the entire bacterial population colonisation, delaying wound healing.

These preclinical data underline the broad applicability of ARTILYSIN®'s against bacterial infections. In addition, these enzymes can be produced to high quality standards and are non-cytotoxic and non-haemolytic. These elements can lead the application of ARTILYSIN®'s against systemic infections and sepsis. For these acute infections, the time to treatment correlates very strongly with the chance of survival of the patient and physicians lack the time to thoroughly test the patient for the various potential pathogen species. An ideal antimicrobial agent would eliminate fast and a large number of pathogen Gram-negative species. Does the ARTILYSIN® platform technology have the potential to achieve this goal?

## References

1. Engineered endolysin-based "Artlyns" to combat multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *mBio*. 2014 Jul 1;5(4):e01379-14.
2. Art-175 is a highly efficient antibacterial against multidrug-resistant strains and persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Jul;58(7):3774-84.
3. Breaking barriers: expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiol*. 2015;10(3):377-90.
4. Efficacy of Artlysin® Art-175 against resistant and persistent *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Mar 28. pii: AAC.00285-16.

---

## Immunodetection of bacteriophages by the electroacoustic analysis method

Gulyi O.I.<sup>1,2,3</sup>, Zaitsev B.D.<sup>4</sup>, Shikhabudinov A.M.<sup>4</sup>, Teplykh A.A.<sup>4</sup>, Borodina I.A.<sup>4</sup>, Fomin A.S.<sup>1,3</sup>, Staroverov S.A.<sup>1,3</sup>, Dykman L.A.<sup>1</sup>, Ignatov O.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms, Saratov, Russia;

<sup>2</sup>Saratov State Vavilov Agrarian University, Saratov, Russia;

<sup>3</sup>Saratov Veterinary Research Institute, Saratov, Russia;

<sup>4</sup>Saratov Branch of the V.A. Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics, Saratov, Russia

Currently the techniques for immunological detection of bacteriophages and viruses widely use the physical methods of analysis. The piezoelectric resonators with the transverse electric field are of particular interest for the study of the properties of biological fluids as characterised by high sensitivity and by

the possibility of analysis of biological objects directly in the liquid phase. The applicability of electro-acoustic analysis method to detection of bacteriophages using polyclonal antibodies was tested on the model of bacteriophages φAI-Sp59b, isolated from a strain of *Azospirillum lipoferum* Sp59b. It was shown that the frequency curves of the present and imaginary components of the electric impedance of the resonator containing the suspension of bacteriophages with the antibodies were significantly different from the curves measured for the resonator with the control suspension of viruses without antibodies. Bacteriophage φAI-Sp59b could be detected using antibodies in the presence of other viral particles. The concentration of φAI-Sp59b particles in the test suspensions varied app.  $10^{10}$  to  $10^6$  phage/ml, and the time of analysis did not exceed 5 minutes. Optimally informative parameter for obtaining the reliable information was the changing of present or imaginary components of the electric impedance at a fixed frequency near the resonance with adding of specific antibodies into the studying suspension. The registration of the bacteriophage interaction with antibodies opens up the prospects for the development of biological sensors for detection and identification of viruses in a liquid phase.

*This work was partially supported by grant RFFBR № 16-07-00818.*

---

## Temperate phage-encoded CRISPR-Cas as a genetically compact bet hedging strategy

Katherine R. Hargreaves, Stephen T. Abedon

*Department of Microbiology, The Ohio State University*

The encoding of CRISPR-Cas systems by prophages presumably serves as a means of endowing host bacteria with novel or additional means of resistance to episomes, particularly to other bacteriophages. Here we suggest that CRISPR-Cas could serve temperate bacteriophages as a genetically compact means of providing host bacteria with multiple potentially beneficial alleles. This multiplicity of alleles, we suggest, is analogous to conjugative plasmids also providing hosts with multiple potentially beneficial alleles such as in terms of otherwise independent genes encoding resistance to different antibiotics. A particular accessory gene may or may not be useful at a given time or within a given environment. Therefore, the carriage of multiple accessory alleles, each with distinct, ideally somewhat independent benefits, should serve to increase the potential that at least one allele will be beneficial. Phages, particularly due to their requirement for encapsidation, can be much more constrained in terms of genome growth than plasmids. The result can be a utility for genetic compactness. Thus, the acquisition of substantial numbers of accessory genes, each of which encodes an individual protein, likely is more difficult to achieve for phages versus plasmids. CRISPR spacers can by contrast serve as independently beneficial alleles which are much more compact in length than individual protein-encoding genes, by roughly an order of magnitude. CRISPR-cas systems thus may allow for prophage lysogenic conversion-associated "bet hedging" without substantial addition to phage genome size.

## The phage approach to control emetic *Bacillus cereus*

Hock L., Mahillon J.

Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium

*Bacillus cereus* has recently been implicated in an increasing number of foodborne intoxications, representing 5.5% of all outbreaks within the EU in 2014. Food intoxication by *B. cereus* emetic strains causes nausea and vomiting and, in some severe cases, the patient death [Dierick et al., 2005; Naranjo et al, 2011]. Moreover, the ubiquity and sporulation capacity of this bacterium, as well as the extreme resistance (pH, heat and proteases) of its emetic toxin, the cereulide, prevent an efficient sanitation by conventional methods. The present work aimed at isolating *B. cereus*-specific phages in order to develop new tools to control emetic strains in food matrices.

300 samples of various origins (soil, food or animal faeces) were incubated with a panel of emetic strains before isolating individual lytic phages. Six lytic phages were selected according to their properties and host spectra. To confirm their virulent and the absence of bacterial virulence genes, their sequences have been determined. Their morphology and growth parameters (e.g. multiplicity of infection, adsorption constant, eclipse period, latent period, burst size) as well as their resistance to pH and temperature were also evaluated. Although no individual phage was able to lyse the entire set of 155 emetic strains tested, a cocktail of our six phages could lyse almost 60% of our emetic *B. cereus* collection. So far, the lytic feature of one phage, Deep-Blue, has been verified. This 159-kb myovirus belongs to the Bastille-like group within the Spounavirinae and shares 88% of its proteome with phage VB\_BceM\_Bc431v3 [El-Arabi et al., 2013]. The other phage genomes have sizes comprised between 36 and 53 kb. All the phages complete their lytic cycle in ca. one hour and are stable to one hour heat treatment at 40°C and pH between 5 and 9. Although several phages have recently been FDA-approved and commercialized to control pathogenic bacteria (e.g. *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes*) in food, no phage cocktail active on *B. cereus* has been implemented so far. In this work, six phages able to lyse emetic *B. cereus* were characterized and their application to prevent foodborne intoxications looks promising. A cocktail of these phages will be implemented according to GRAS status and its efficiency in controlling emetic strains of *B. cereus* will be evaluated in food matrices.

## Bacteriophages for implants

Ignatov S.G., Voloshin A.G., Denisenko E.A.

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia

Despite the significant advances of materials science in the design of implants with antibacterial properties, the problem of post-operative infection is very important. Various modifications of the implant surface intended to reduce bacterial contamination of the surface were suggested. Therefore, the aim

of our study was to evaluate the bactericidal activity of samples with a developed surface area and nanostructured coatings that are modified by bacteriophages. Bacteriophages are the viruses that infect bacteria and multiply within their cells using the host systems of biosynthesis. Uncontrolled use of antibiotics and the weakening of the immune defence lead to the formation of multi-resistant pathogen strains that are very difficult to fight with using antibiotics. Currently, bacteriophages are considered to be an alternative to antibiotics. It is assumed that the bacteriophages not only lyse a part of microorganisms of the system but also prevent the formation of biofilms. The bacterial biofilm is the structurally organized group of microorganisms which is intercalated into a polymer matrix (which is often the product of the vital activity of these organisms) on any surface. The formation of biofilms is a mechanism of adaptation of planktonic forms of bacteria to the environment. Up to 80% of bacterial infections is accompanied by the biofilm formation. It is known that bacterial biofilms showed an increased resistance to different antimicrobial agents. Pathogenic microorganisms that are structured into biofilms lead to an increase in morbidity and mortality. The formation of biofilms by pathogenic microorganisms is very dangerous for all of the implant inside the human body. We used bacteriophage *Escherichia coli* ECD4. The modification of the surface by the bacteriophage leads to the bactericidal effect on *E. coli* cells that depends on the concentration of bacteriophages.

## Some insights from the study of BREX – a novel phage resistant system

Isaev A.B., Matlashow M.E., Tsvetkova K.M., Pechenov P.Y., Severinov K.V.

Institute of Gene Biology RAS;  
Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow,  
Russia

BREX is a novel phage defense system widespread in bacterial and archaeal genomes. It consists of 6 genes, including predicted DNA methyltransferase, Lon-like protease and alkaline phosphatase. In this work we have used BREX gene cluster from *Escherichia coli* HS strain. When this system is being expressed from low-copy number plasmid (pBTB) in sensitive strain BW25113, it confers resistance to a spectrum of DNA-containing phages, such as T7, T4, Lambda, but not to RNA-containing phages as MS2 or Q $\beta$ . General mechanisms of action of BREX system are not defined by the moment and our goal was to investigate which stages of viral infection may be affected by BREX.

We have shown that adsorption of phage particles to a cell is not affected by the action of BREX system. Therefore we decided to see whether accumulation of phage DNA may change in BREX active cells. In control cells transfected with an empty pBTB vector accumulation of phage DNA and disappearance of host DNA is visible at 30 min after addition of T7 phage at 30 C. In BREX+ cells degradation of host DNA was significantly delayed and T7 DNA accumulation was not observed even after 3 hours of incubation with the virus. This may indicate that phage DNA is being degraded in BREX cells

or that replication was inhibited. These results were also supported by T7 transcription analysis. Efficiency of T7 early, middle and late genes transcription was measured by quantitative PCR with the use of external "tracer" RNA approach. The total level of viral transcription in BREX active cells was two orders of magnitude lower, comparing to control cells, but no specific shift in timing of genes expression was observed.

Transduction efficiency in BREX+ cells also was estimated. Cells were treated with P1vir phage carrying a gene of tetracycline resistance and plated on double antibiotic. Comparing to control cells efficiency of BREX+ transduction was more than order of magnitude lower. Deletion of methyltransferase gene – brxX or mutation in catalytic center of this protein (Y519A) leads to restoration of transduction efficiency. Also from HPLC analysis of nucleosides we may conclude that BREX+ cells contain increased amounts of N6-methyl-adenine, suggesting a crucial role of host genome modification in phage resistance mechanism.

*The reported study was funded by RFBR according to the research project No. 16-34-00656.*

## Characterization of bacteriophage PP16 infecting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* phytopathogen

Kabanova A.P.<sup>1,2</sup>, Vo Thi Ngoc Ha<sup>2</sup>, Shneider M.M.<sup>1</sup>, Kulikov E.E.<sup>3</sup>, Samarov N.I.<sup>4</sup>, Miroshnikov K.K.<sup>2,3</sup>, Korzhenkov A.A.<sup>4</sup>, Toschakov S.V.<sup>4</sup>, Ignatov A.N.<sup>2</sup>, Miroshnikov K.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>PhytoEngineering R&D Center Rogachevo Moscow Region, Russia;

<sup>3</sup>Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* is an Enterobacterium abundant in soil microbiota. Some strains acquire phytopathogenic factors causing intensive soft rot on various plant species. In case of potato production *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* causes serious loss of harvest during its growth, transit, and storage. Specific lytic bacteriophages are potential agents for selective biocontrol of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* pathogenic strains.

*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* phage PP16 was isolated from potato storage facility wastewater in Moscow region in 2012 using highly virulent strain PB69. PP16 propagates in high titer and forms halo-surrounded plaques. Transmission electron microscopy reveals the short-tail icosahedral (*Podoviridae*) morphology of the phage, hence the phage should be referred as vB\_PccP\_PP16. Phage PP16 infects 11 of 47 tested strains of *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, and shows no infectivity against *P. atrosepticum*, *Dickeya* spp., and other potato phytopathogens.

Sequenced DNA genome of PP16 comprises 43902 bp and encodes 56 ORFs. The closest relative to this phage is recently described phage PPWS1 also infecting *P. carotovorum*. Based on the general genome layout and the composition of

the lysis module (spanin – holing – endolysin) we can refer PP16 as the member of KP34-like genus. Podoviruses of this class are known for a number of *Enterobacteria*, mostly *Klebsiella*. The tail spike protein of PP16 utilizes surface polysaccharide as primary receptor for adsorption, and possesses deacetylase activity.

---

## Potential therapeutic applications of *Staphylococcus aureus* bacteriophage Stab8

Ermir Kadija, Zack Hobbs

*Luigj Gurakuqi University, Shkodër, Albania;  
EpiBiome, South San Francisco, United States*

Repeated use of antibiotics has allowed for pathogenic bacteria to persist and develop unprecedented degrees of resistance. Pathogens such as *Staphylococcus aureus* constitute a major problem with viable treatment options dwindling. The isolation and utilization of lytic bacteriophages is one of the few remaining options to explore for treatment of single and multiple drug resistant bacterial infections.

Phages were isolated from environmental samples against *S. aureus* strains originating from nosocomial infections with consideration for a human therapy. Characterization of isolated bacteriophages constitutes an important step in the development of effective therapies using phage cocktails. To select for lytic phages, environmental samples were added to enriched media and incubated overnight and then screened for the presence of lytic phages.

After subsequent purification steps our eighth staph phage isolate, named Stab8 (*Staphylococcus* bacteriophage 8), was further characterized to determine its morphology, burst size, killer titer, host range and genomic sequence. Transition electron micrograph images revealed Stab8 to have a myoviridae morphology and therefor it was proposed to be Twort-like in the Spounavirinae subfamily. It is believed that Stab8 might produce endolysins due to its ability to effectively clear a mid-exponential growing culture within one hour using low to medium multiplicities of infections. Interestingly, Stab8 has a wide tropism, and possesses the ability to infect a variety of clinical bovine mastitis strains. Stab8 has been sequenced and confirmed to be a obligately lytic, Twort-like, Spounaviridae.

---

## Isolation of the phage of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by X-ray induction

Karamysheva N.N.<sup>1</sup>, Vasilyev D.A.<sup>1</sup>, Semenov A.M.<sup>2</sup>, Pichugin Yu.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The aim of our work was to isolate the phage of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by X-rays irradiation method.

The experiment was conducted using irradiating the samples in the conditions listed below with a focal distance of 1 meter, the height of the of the liquid in the test tubes (bio-

logical substrate) is not less than 5 cm, the distance between the tubes, while irradiation is done in one batch not more than 1 cm. Indicators of electrical parameters: the anode voltage for all studies was 63 kV (kilovolts), the current was 250 mA, and the exposure time varied depending on the task.

The obtained pure culture grown in a liquid medium was the subjected to irradiation in the X-ray unit using different modes. Doses of irradiation of bacteria were established experimentally: 55.2.0 the total radiation dose was 1.2 mSv; the 85.2.0x2 dose was 2.8 mSv; the 75.3.0 dose of 1.8 mSv. Time of exposition was 1 second, 3 seconds and 2 seconds.

After the irradiation 5 tubes of 5-day culture *A. ferrooxidans* in Silverman and Lundgren liquid medium 9K were placed to the theromstate at 30°C for 72 hours. In the first batch of irradiations the visible changes did not occur, in the second and third serial batches the culture became less turbid. To confirm the presence of the phage particles in the irradiated culture, 1 ml of estimated phagolysate were applied onto agar medium 9K by agar overlay method and placed into a thermostat at 30°C for 72 hours.

When viewing the results we found:

1. In a series of Petri dishes after irradiation by a total dose of 1.2 mSv for 1 sec. – the intact culture lawn.
2. In series by 2.8 mSv for 3 seconds – the presence of zones of growth inhibition.
3. In a series after irradiation by 1.8 mSv for 2 seconds – the lawn with sparse growth and the presence of small areas of lysis.

The most optimal is the mode of X-ray irradiation with a total dose of impact to the bacterial substrate of 1.8 mSv. As a result of irradiation by this dose the maximum lysis of the irradiated cells occurred. The substrate under the influence of an external inducer factor produces the temperate bacteriophage, as evidenced by lysis zones on the lawn of *A. ferrooxidans* lawn with applied irradiated phagolysate.

## Genome analysis of bacteriophages lytic for hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 capsular type

**Komisarova E.V., Myakinina V.P., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Kislichkina A.A., Volozhantsev N.V.**

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

Of 78 K-serotype *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 strains overproducing capsular polysaccharides are mostly virulent human pathogens. They cause nosocomial and community-acquired infections along with developing primary pyogenic liver abscess, meningitis, endophthalmitis, as well as infections of soft tissues, the urinary tract and lungs. These strains are additionally tending to acquiring antibiotic resistance determinants. Lytic bacteriophages with polysaccharide-depolymerase activity are treated as a potential remedy to control hypermucoviscous *K. pneumoniae*.

We have isolated 7 bacteriophages specifically infecting *K. pneumoniae* bacteria of capsular type K1, and 4 bacteriophages specific for *K. pneumoniae* type K2. The bacteriophages were characterized by their negative colony morphology,

spectra of their lytic activity, and infectious process parameters (time of adsorption, one step growth curve). The complete nucleotide sequences of the genomes of six bacteriophages were determined. The comparative analysis allowed us to determine taxonomic positions for the phages. Four K1-specific phages were attributed to the family Podoviridae, the subfamily Autographivirinae, and one phage was attributed to the family Siphoviridae, the subfamily Tunavirinae. A bacteriophage lysing only K2 strains was a member of the family Myoviridae. Based on homology to functional domains, as well as to amino acid sequences of known phage proteins, putative functions were assigned to products of the phage genes, including proteins involved in DNA metabolism, packaging DNA into the capsid, capsid structural proteins, the tail complex proteins, and lytic enzymes. In none of the phages genes coding for known toxins or any other virulence factors were found. In genomes of Podoviridae phages and myovirus genes of tail structures with a putative polysaccharide-depolymerase domain were identified.

Results obtained constitute a molecular-genetic basis for designing specific formulations based on bacteriophages and phage enzymes to diagnose and to cure infections associated with *K. pneumoniae* of capsular types K1 and K2.

*The research was supported by the Russian Science Foundation [Grant # 15-15-00058].*

## Immunological aspects of phage therapy of bronchial asthma in children with regular intercurrent respiratory infections

**Kosyakova N.I.**

*Hospital of the Pushchino Research Center of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

Immunological alterations contribute to increased morbidity and respiratory sensitisation. Given the degree of the dysbiosis of the respiratory tract, confirmed by microbiological and molecular genetic methods, the assess the effectiveness of therapy using polyvalent liquid bacteriophage "Pyobacteriophage" was conducted. Group 1 (experimental) consisted of 68 children with verified diagnosis of bronchial asthma (BA) in the period of remission and The treatment was carried out on the background of anti-inflammatory therapy with inhaled glucocorticosteroids (fluticasone propionate, budesonide). The control group (group 2) consisted of 20 children with BA who received only basic therapy.

Over the next 12 months the efficacy of the therapy was assessed on the basis of the frequency and severity of BA exacerbation, determination of the biochemical and immunological indicators (CRP, concentrations of total IgE, IgA, IgM, IgG, IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  in the serum, as well as sIgA, IgA1-2 and the C3 component of complement in nasal secretion). The important therapeutic effect of phage therapy observed was the reduction of the frequency and of the duration of intercurrent acute respiratory viral infections in children of group 1 by 2 times ( $p < 0.05$ ) and BA exacerbations by 1.3 times. The incidence of upper respiratory tract chronic infection exacerbations in children with asthma has decreased by 3 times

( $p < 0.001$ ), the duration decreased by 1.8 times ( $p < 0.001$ ), which is confirmed by the dynamics of immunological parameters. In group 2 no significant reduction of respiratory disease incidence was observed.

The improvement of the humoral immune response under the influence of phage therapy is confirmed by evaluation of the concentration of the C3 component of complement in the nasal secretions. Investigation of the composition of the microflora in patients with BA showed that the number of pathogens fell after the phage therapy. The number of patients shedding *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* decreased, and the number of patients who shedding only saprophytic flora increased. Thus the phage therapy has a positive therapeutic effect which is largely mediated by the changes in microbiocenosis of the upper respiratory tract and improvement of the immune status.

---

### **The study of $\text{Ca}^{2+}$ regulation of bacteriophage T5 endolysin**

Kovalenko A.O.<sup>1,2</sup>, Chernyishov S.V.<sup>1</sup>, Prokhorov D.A.<sup>3</sup>, Molochkov N.V.<sup>3</sup>, Mikoulinskaya G.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Coliphage T5 Endolysin (EndoT5) is a component of the cell lysis system that is required for bacteria of phage progeny to leave the infected cell. This enzyme is a zinc-containing M15 family metallopeptidase effectively hydrolysing peptidoglycan of gram-negative bacteria. We show that the activity of this enzyme is regulated by  $\text{Ca}^{2+}$  ions. A conservative zinc binding site is well known for such peptidases, but the mode of binding of regulatory  $\text{Ca}^{2+}$  had not been studied previously. In this paper, we investigated the  $\text{Ca}^{2+}$  regulation of EndoT5 by site-directed mutagenesis.

The mutant proteins containing a single a.a. replacements of a number of amino acid residues for alanine residue D113A, N115A and D130A were obtained. The analysis of circular dichroism spectra of these mutant proteins revealed that the mutations did not cause significant changes in the secondary structure of proteins. The mutants had different properties: the lytic activity of N115A mutant was 20 times lower than that of the wild type protein, the D113A activity was 2,000 times lower. D130A mutant showed no activity at all but retained the ability to bind the substrate. Interestingly that both enzymatically active mutants had the same thermal stability as the natural wild type enzyme – they retain 80% of the initial activity after 15 minutes of heating at 90°C.

Inhibition of mutants D113A and N115A activity using calcium chelating agents showed that for that 3 orders of magnitude (1 mM vs 100 mM for the native protein) higher concentration was required for complete inactivation. The addition of  $\text{Ca}^{2+}$  in the reaction medium partially restored the enzyme activity, but also higher ion concentrations were required.

Thus, the amino acid residues Asp-113 and Asn-115 coordinate  $\text{Ca}^{2+}$  ion as the mutations in these positions lead to a

decrease in affinity for the ion and a sharp drop in the enzyme activity. The key role belongs to Asp-113. The  $\text{Ca}^{2+}$  binding mechanism is similar to that of the proteins of EF-type. Aspartic acid at position 130 not only coordinates the  $\text{Ca}^{2+}$  but is also a conserved catalytic residue within the active site; mutation in this position totally inactivates the enzyme.

---

### **The role of bacteriophages in the treatment of bacterial infections**

Krasilnikov I.V.

Saint-Petersburg Institute of Vaccines and Sera,  
Saint-Petersburg, Russia

The number of bacteria strains that cause infections in humans and are resistant to most antibiotics, is increasing every year. An additional opportunities are necessary for successful treatment of bacterial infections. Bacteriophages are an effective means for supplementing antibiotics.

Completely different mechanism of elimination of bacteria from the body in comparison with antibiotics allows to destroy the bacteria by bacteriophages, even in the event of the formation of biofilms.

The presence of a modern bank of bacteriophages and tools of genetic engineering are playing an important role in improving the efficiency of exposure on the bacteria and for the individual bacteriophage therapy.

An important link in the development and production of new medications based on bacteriophages is the presence of a high selectivity of phages and their lytic properties. These two criteria must be standardized for each of manufactured products. Modern production with new standards have enable to create products with a wide range of activities such as "Sekstafag" and "Intest-bacteriophage".

Suffice it an important issue for phage therapy is the interaction of bacteriophages with antibiotics. In this case, is necessary to consider the possibility of modifying the receptors on the surface of bacteria sensitive to bacteriophages.

Continuous monitoring of the bacterial environment and the search for new strains of bacteriophages is the basis for the successful treatment of bacterial infections with medications based on bacteriophages.

---

### **The modular compositions of monospecific bacteriophage mixtures for therapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections**

Krylov V.N., Shaburova O.V., Pleteneva E.A., Bourkaltseva M.V., Krylov S.V., Kaplan A.M., Chesnokova E.N., Polygach O.A.

I.I.Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Phage therapy was introduced in the medical practice 100 years ago by Felix d'Herelle, later on was outcompeted by penicillin and virtually disappeared from the practice in the West medicine, but it is still in use in Russia, Georgia and in

Poland. The rapid development of resistance to new antibiotics and the emergence of bacterial pathogens with multidrug resistance forced to recall phage therapy as a possible alternative to antibiotics in the treatment of certain bacterial infections (such as wound, intestinal, urinary tract infections, infections of the upper respiratory tract and lungs).

For the treatment of lung infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with a hereditary disease – cystic fibrosis – the combinations of different antibiotics and the inhalations of colistin are used. High toxicity of colistin prevents its application until the child reaches 6 years age, and with the emergence of plasmids encoding resistance to colistin it may cease to be an antibiotic of the “last hope”. It is possible that phage therapy becomes the only possible approach to long-term treatment of frequent lung *P.aeruginosa* infections on the background of cystic fibrosis. The reported attempts at employment of bacteriophages to treat such conditions confirm the possibility of a short-term positive effect in this case.

However the rapid emergence of resistance to phages does not allow the use of commercial phage mixture for continuous long-term treatment of chronic infection. For the long-term antibacterial therapy of recurrent *P. aeruginosa* infections in children we suggest a new “modular” approach in phage therapy – the individual therapeutic preparation composed of several monospecific phage mixtures. The properties of phage types for monospecific compounds, methods of rapid screening of new phages of certain types, the advantages and possible problems of modular compositions are discussed.

## **Development of the bacteriophage product for indication and identification of *Aeromonas salmonicida***

Kuklina N.G, Vasilev D.A, Victorov D.A, Shcherbina A.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

*Aeromonas salmonicida* is an important pathogen of fish that causes a dangerous infectious disease – furunculosis. The disease inflicts very significant economic loss in fish farms. Currently, diagnosis of the disease takes quite a long time (up to 7 days).

The use of a biological product based on bacteriophages allows for indicate and identify the bacteria of *A. salmonicida* species within 28 hours.

For the construction of a biological product the bacteriophage Asl25-УГСХА having optimal properties – the range of lytic activity of 87.5% and the titre  $10^9$  by Appelman, titer  $3 \times 10^9 \pm 0.2 \times 10^9$  was selected.

Thermal stability study results showed that bacteriophage Asl25-УГСХА is resistant to a temperature of 53°C. At a temperature of 55°C bacteriophage died. Experiments show that the phage is not resistant to chlorophorm.

The optimum process parameters for the production of a preparation with high lytic activity were determined: the optimal temperature range for the phage Asl25- УГСХА cultivation is 20–28°C, the optimal ratio of phage and culture is 1: 2, ie,

0.2 ml of phage  $\times$  0.4 ml of the indicator culture, optimum passage time at a temperature of 28°C for phage Asl25-УГСХА is 12 hours.

Testing biological product designed for indication and identification, showed that out of 59 water samples, *A. salmonicida* strains were detected in the 23 that is confirmed by the bacteriological examination.

## **Experience of bacteriophage application in prevention of healthcare-associated shigellosis**

Kurakin E.S.

Medical Institute of Tula State University, Tula, Russia

The problem of HAIs remains highly relevant in the modern health care. Despite adherence to infection control measures in health facilities the outbreaks occurs, and their stopping is a difficult task. The standard complex of anti-epidemic measures does not allow to solve the problem of the elimination of persistent epidemic foci in a significant number of cases. In such situations, it is often necessary to resort to forced measures, the closure of the hospital, but even this action does not always solve all the problems of elimination of epidemic foci.

The broad spectrum of antimicrobial drugs that is used in modern medicine only partially destroys microbes and leads to the selection of the most resistant strains. Hospital strains acquiring multiple resistance to disinfectants, antiseptics, antibiotics and chemotherapy drugs, significantly reduce the efficacy of this substance in the combat with the HAIs. Therefore, an important aspect of modern health care is the search for additional agents to combat bacterial infections. In recent years in the literature one can find many communications of therapeutic and prophylactic activity of bacteriophages against bacterial infections.

The aim of our study was to evaluate the epidemiological efficacy of applying of polyvalent dysentery bacteriophage produced by SPC “ImBio” for relief the outbreak caused by *Sh. flexneri* in Tula psycho-neurological hospital, where on the background of the constant complex anti-epidemic measures a stable focus of shigellosis existed indicating the failure of all the efforts made.

A highly effective use of bacteriophage for surface disinfection of ward sections carried out by spraying  $100 \text{ ml/m}^2$  was noted. After the disinfection of objects of an environment deliberately contaminated with the infectious agent, in the control swabs (465) *Shigella* were not detected.

The method of disinfection that was described and applied allowed to eliminate the focus of the long-term current nosocomial infection which lasted for more than 1.5 years within 3 months period without a single day of the closing of any of the departments at the hospital. This approach can and should be widely used in practice since it offers the complex solution of the problem without a significant economic cost and significant organizational rearrangements of functioning hospital.

## GroEL-like proteins encoded by bacteriophages

Kurochkina L.P.<sup>1,2</sup>, Semenjuk P.<sup>1,2</sup>, Orlov V.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>A.N.Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

It is known that in the process of morphogenesis some bacteriophages use chaperonin GroEL of the host bacterium for the folding of their protein. Thus, the phage lambda uses GroEL along with its cochaperonin – GroES, and the cochaperonin function in T4 and RB49 phages is accomplished by their own proteins (gp31 and CocO, respectively). The search for chaperonins through databases allows identifying a number of proteins encoded by bacteriophages of Myoviridae and Podoviridae families which are annotated as the GroEL-like proteins. The bioinformatic analysis of these proteins was conducted in comparison with cellular and mitochondrial chaperonin. Despite the existence of highly conserved ATP and Mg<sup>2+</sup> binding sites, that are characteristic for all known chaperonins generally phage GroEL-like proteins have a low homology to each other and do not form a monophyletic group, however, they are located slightly closer to the bacterial chaperonin on the phylogenetic tree. Two GroEL-like proteins were obtained and characterized: gp146 and gp246, encoded by bacteriophages EL *P. aeruginosa* and OBP *P. fluorescens*, respectively. The *in vitro* experiments showed that both the phage proteins have chaperones properties and prevent the thermal inactivation and aggregation of phage endolysins. These phage chaperonins have low ATPase activity and unlike bacterial GroEL operate without cochaperonins. Chaperonin of EL phage has an architecture typical of the majority of known chaperonins and consists of two stacked heptamer rings, the chaperonin of OBP phage is a heptamer.

## Hot tales of T4's transition from host to phage metabolism

Elizabeth Kutter, Georgia Ray, Daniel Bryan

Evergreen State College, Olympia, WA

Radioactive labeling did much to inform our understanding of the transition from host to phage metabolism after T4 infection. As RNAseq, metabolomics and proteomics facilitate exploring that transition in various phage-host systems, we review that radioactive data and suggest such experiments are still uniquely useful.

**1. Protein synthesis:** 2-D protein gels of pulse-labeled T4 infections showed that all synthesis of host proteins is shut off within the first minute or so of T4 infection and clearly details the patterns and quantities of early, middle and late proteins. Gels of amber mutants and large deletion mutants of T4 allowed specific protein identification, including spotlighting many of the small “monkey-wrench” proteins made immediately after infection.

**2. T4 Infection of stationary phase *E. coli* in Hibernation Mode:** We have recently found that when T4 infects station-

ary phase cells, it can pause part way through the infection cycle, making no new phage until nutrients are provided but then making hundreds of phage per cell. Pre-labeling the host DNA with 3HdT, we found that it is gradually broken down in the first hour, as happens though more rapidly in exponential phase (Kutter and Wiberg, 1968), but this can only be observed using a mutant blocked in DNA synthesis; otherwise, the dT is quickly re-incorporated into phage DNA, implying that the phage program is paused only after middle-mode enzymes are made and the Nucleotide Synthetic Complex is functional.

**3. T4 effects on host membrane lipid synthesis:** While drastic changes in nucleic acid and protein patterns were expected after phage infection, it came as a surprise that T4 infection actually also substantially stimulates the synthesis of membrane lipid phosphatidyl glycerol for the first 15 minutes after infection. There is also ongoing synthesis of phosphatidyl ethanolamine, but but no stimulation. Both syntheses are controlled genetically by T4; they depend on different parts of the deletable region between genes 59 and rIIB, but the precise genes aren't yet identified.

**4. Substitution of other bases for thymine:** Labeling studies were also involved in the serendipitous discovery that distantly T4-related phage CBA120, specifically targeting *E. coli* O157, uses hydroxymethyl uracil (HMdU) rather than thymine in its DNA. It turns out that this substitution is found in all of the members of the Vil genus of phages, but had not been suspected, even though Vil had been isolated in the 1930s and long used to confirm typhoid fever. Vil was even successfully used to treat typhoid fever in the US and Canada until 1948, when other antibiotics finally became available for treating gram-negative bacteria.

## Application of *Salmonella* bacteriophages in industrial poultry farming

Kuzmin V.A., Fogel L.S.

Saint-Petersburg State Academy of Veterinary Medicine, Saint-Petersburg, Russia

Salmonellosis of birds is a dangerous problem not only from the epizootiology standpoint, but also of epidemiology, and this is especially true for *S. enteritidis* infection which is widespread in the human population due to the consumption of infected poultry products. Salmonellosis that was called a “disease of civilisation” is now so widespread that currently in no country of the world the possibility of its eradication is on the agenda. Only the possibilities to reduce the morbidity and to limit the spread of the infection from the main sources are discussed. The purpose of this work was to test the available preparations of *Salmonella* bacteriophages for the treatment and prevention of *S. enteritidis* infection in chickens in the poultry industry of the North-West region of Russia.

The indication of salmonella phage was conducted by the method of Gracia. The testing of polyvalent “*Salmonella* bacteriophage ABCDE” of (Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology) in dry and liquid form and

"Salmonella phage liquid" (SPbSPCF "Biotech") was conducted in a production environment. In the control group the bacteriophage against the pullorum-fever of birds and the bacteriophage against salmonellosis and colibacillosis of calves used in veterinary medicine were tested. The treatment of chickens by aerosols of *Salmonella* bacteriophages in 4 large poultry farms of egg and poultry meat lines was carried out once in a hatcher incubator for 1.5–2 h until the sampling of chickens at a dose of 4–5 ml/m<sup>3</sup>. The scheme of oral bacteriophage use included the application with drinking water in a dose of 0.1–0.3 ml per chicken during the first 5 days of life.

Aerosol and oral application of bacteriophages increased the safety of chicken 1–20 days of age in poultry farms: the use of *Salmonella* polyvalent bacteriophage ABCDE – by 5.4%, *Salmonella* liquid bacteriophage – by 2.25% in comparison with the control group. The use of bacteriophages, reduced the mortality but did not ensure the elimination of epizootic outbreak. In the experimental group *Salmonella* isolation frequency from the chickens aged 1–20 days was reduced by 25.05% with *Salmonella* bacteriophage ABCDE and 36.7% with *Salmonella* phage liquid. Given the ecological safety of the bacteriophages and their protective effect in the first hours of chicks, the aerosol and oral administration of bacteriophages are justified as a component of an integrated scheme for prevention of *S. enteritidis* infection among birds. A system of epizootic and epidemiological surveillance of salmonellosis is developed and this includes the complex analysis of epidemic and epizootic processes of this infection on the basis of the interaction of the sanitary-epidemiological and veterinary services.

## Hijacking *Pseudomonas* – Phage-encoded mechanisms impacting the infected bacterium

**Rob Lavigne**

Laboratory of Gene Technology, Department of Biosystems, KULeuven, Leuven, Belgium

During the lytic infection cycle, bacteriophages hijack the host metabolism to convert the bacterium into a virus producing 'virocell'. The laboratory of Gene technology (KULeuven, Belgium) aims to understand the molecular biosystem of the infect cell, at the different levels of governance, using RNAsequencing, proteome and protein-interaction analysis and metabolome studies.

More specifically, we focus on a diverse set of lytic phages infecting *Pseudomonas aeruginosa*, an important human pathogen. Indeed, the elucidation of the molecular virus-bacterium interactions can lead to novel strategies in antibacterial design. In this lecture, focus is placed on the central mechanisms governing host take-over and specific examples of phage-proteins influencing replication, transcription, (post)translational modification and metabolic refocusing are given.

As an example, a recent publication in eLIFE (Vandenbossche et al. 2016), describes and unique interaction bet-

ween a bacterial virus phiKZ -encoded protein and the *P. aeruginosa* RNA degradosome. The RNA degradosome is a key multicomponent regulatory hub of posttranscriptional gene regulation and RNA turnover in bacteria. This 'degradosome interacting protein' or Dip, adopts an 'open-claw' dimeric structure and hijacks both RNA binding sites on the scaffold domain of the RNase E component of the RNA degradosome during the virus infection cycle of its host. The data imply a time-regulated mechanism by the phage to subvert the RNA degradosome role in transcript degradation and processing to stabilize viral transcripts after the early infection phase.

---

## Structure and function of bacteriophage T4 baseplate in atomic detail

**Leiman P.G., Taylor N.M.I., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Shneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H.**

*University of Texas Medical Branch, 301 University Boulevard, Galveston, Texas, 77555-0144, USA*

The tail of bacteriophage T4 is a paradigm of a diverse class of complex multicomponent organelles called Contractile Injection Systems (CISs). Besides phage tails, CISs contain the bacterial Type VI Secretion System (T6SS), Antifeeding Prophages of *Serratia*, *Photorhabdus* Virulence Cassette, Metamorphosis-Associated Contractile arrays of *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, R-type pyocins of *Pseudomonas* and similar complexes of *Clostridium*. These systems have a common architecture and functional mechanism that involves a contractile sheath, which resembles a stretched coil spring, enveloping a central rigid tube. Upon interaction with a target cell, the sheath contracts and propels the tube through the cell envelope. The event of sheath contraction is coupled to delivery of toxins in T6SS or constitutes a prerequisite for subsequent protein and DNA translocation in phages. The sheath contraction triggering process is controlled by a multicomponent baseplate at the end of the tail. Using cryo-electron microscopy, X-ray crystallography and modeling, we have determined the atomic structure of the 6 MDa baseplate of bacteriophage T4 in two states – in its pre- and post-host cell attachment conformations. This information allowed us to describe – in atomic detail – how the baseplate undergoes its massive structural rearrangement that results in deployment of the short tail fibers and release of the central membrane-piercing spike complex while simultaneously initiating sheath contraction. We identified a critical disulfide bond that is essential for connecting the tail fiber network to the rest of the baseplate. Finally, we have established a minimal composition of the baseplate in all contractile injection systems.

## The mechanisms of microevolutionary adaptation of the intestinal N4-related phages as revealed by the comparative genomics

Letarov A.V.<sup>1</sup>, Golomidova A.K.<sup>1</sup>, Babenko V.V.<sup>2</sup>,  
Ivanov P.A.<sup>1</sup>, Letarova M.A.<sup>1</sup>, Kostrukova E.S.<sup>2</sup>,  
Prokhorov N.S.<sup>1</sup>, Knirel Y.K.<sup>4</sup>, Zdorovenko E.L.<sup>4</sup>,  
Kulikov<sup>1</sup>, Nazarov S.<sup>3</sup>, Riccio R.<sup>3</sup>, Leiman P.G.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology, RC Fundamentals of Biotechnology RAS, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FCRC Of Physico-Chemical Medicine FMBA, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Zelinsky Institute of Organic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>EPFL, Lausanne, Switzerland;

In phages, adaptation generally is equal to evolution. The mechanisms of the macro- and micro- evolution of the phages have been investigated using comparative genomics based on the sequences obtained from different habitats. Complementary experimental models employing various laboratory macrocosms containing the simplified bacterial and phage communities were widely used.

Here we report the comparison of seven intestinal *E. coli* bacteriophages belonging to the N4 virus genus that were isolated over 7 years period from the same population of horses: phages G7C, G8C and Alt63 isolated in 2006, phages St10y and 10Gb obtained in 2010, and phages Sz33 and N4G2 dating from 2013. These phages are all closely related to phage G7C which was well characterized by us. The level of relatedness and the occurrence of an unusual protein – G7C-like O-antigen deacetylating tail spike – support the conclusion that these phages (called by us the G7C-set) originated locally from a common ancestor as a result of a relatively short-term evolutionary process.

The overall nucleotide sequence identity between G7C-set isolates exceeds 95%, however the genomes feature a number of clear modular replacements originating from recent recombination events. Totally at least 21 loci have undergone clearly detectable recombination. Among these events are:

- Multiple replacements of the tail spikes that may be due to recombination with prophages.
- The modular swapping of a part of the gp63.1 tail spike, leading to altered enzymatic activity towards the O-antigen receptor and changed phage adaptability to the host strain variants in the phages Alt63, St10y, Sz33 and N4G2.
- The integration of a mobile self-splicing group I intron was detected in the RNAP2B gene of the phages Sz33 and N4G2.
- The similar integration of a potentially mobile intron-like element has split the essential DNAP gene of phage 10Gb into two independent ORFs.
- Multiple events involving the integration/excision of homing nucleases are observed.

In depth examination of the conserved parts of the genome suggests that these parts are also frequently subject to recombination. However these crosses occur between closely related phages that hide the traces of the recombination events.

We can thus conclude that the microevolutionary adaptation of the phages in high-density natural microbial communities fundamentally differs from the *in vitro* model experiments

due to access to the wide genetic pool of the microbial community that appears to be a major shaping force determining the evolutionary trajectories of the phages, comparable by its impact to the point mutations accumulation.

*This work was partially supported by RSF grant 15-15-00134 to A.L (phage proteins study and bioinformatics analysis) and by RSF grant 14-14-01042 to Y.K. (O-antigen structure determination).*

## Application of eukaryotic model system for therapeutic efficacy assessment of phages against clinical bacterial infections

Marusich E.I., Volozhancev N.V., Musatov I., Leonov S.V.  
Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny,  
Moscow region, Russia

The increasing resistance of pathogenic bacteria to the most of currently used antibiotics call for urgent needs for alternative antimicrobial agent's development. The use of bacteriophages will be a promising approach to solve this problem because of them being a natural enemies and regulators of microbial population. However, this approach has not found yet the wide application in human medical care because of scientific evidence lack for phage therapy efficacy, including therapeutic doses and safety of phages.

We developed eukaryotic cells model, which allows quantitatively assess the level of infection aroused by several clinical *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* strains followed by 90% of cell to recover after treatment with bacteriophages. The therapeutic effect of phages was monitored by imaging of morphological changes using ImageXpress Micro XL System. CellTiter – Glow viability assay and NucGreen Dead 488 ReadyProbes assay also confirmed the level of cells injury after bacterial infection and subsequent revitalization rate upon bacteriophages treatment. We validated declined apoptotic effect after infected cells treatment with phages by the several parameters, including visual change of cell morphology, the induction of chromatin condensation and nuclear exclusion, and the caspase-3 activation. Anti-inflammatory effect induced inside of the infected cells after fibroblast's treatment by therapeutic phages was estimated by the cellular levels of cytokines IL-6 and TNF-alfa production. We gathered set of quantitative data of phage therapy efficacy, including the optimal dose and incubation time with phages, human cells inflammatory and apoptotic factors production.

By this study, we demonstrated scientific evidence of the bacteriophage ability to decline pathogenic microbial agent's population in infected human cells. Best therapeutic dose was determined among wide-ranging doses of tested phages. Bacteriophage safety was confirmed by human cells toxicity assessment. Our results might serve as a scientific platform for future study of human cells microbial infection following by bacteriophages treatment.

Our model might be used in the future for the firsts screening of new anti-microbial drug's efficacy prior to proceed to expensive and time-consuming pre-clinical trials on animal models.

## Characterization of a new twortlikevirus infecting *Staphylococcus epidermidis* that exhibits activity against biofilm and stationary bacterial populations

Melo L.D.R., Pinto G., Oliveira F., França A., Ackermann H-W., Kropisni A.M., Sillankorva S., Azeredo J., Cerca N.

CEB – Centre of Biological Engineering, University of Minho, Braga, Portugal

*Staphylococcus epidermidis* is a major causative agent of nosocomial infections, mainly associated with the use of indwelling devices, on which this bacterium forms structures known as biofilms. Due to biofilms high tolerance to antibiotics, virulent bacteriophages were previously tested as novel therapeutic agents. However, several staphylococcal bacteriophages were shown to be inefficient against biofilms.

Using wastewater treatment plant raw effluents, a novel phage was isolated and characterized. This virus was named philBB-SEP1 and TEM micrographs suggested that it belonged to the Twortlikevirus genus. Phage philBB-SEP1 is able to infect 41 *S. epidermidis* clinical isolates used in this study, and contrarily to other polyvalent viruses of the Twortlikevirus genus, philBB-SEP1 is highly specific for *S. epidermidis* strains. The genome of this phage was fully sequenced and presents the typical structure of a member of the Twortlikevirus. However, when compared to other staphylococcal members of this genus, it showed DNA sequence identities no greater than 58.2%, suggesting that philBB-SEP1 is a new species within this subfamily.

Efficacy studies results showed that phage SEP1 is able to cause a 6 Log CFU per ml reduction of the cell titer in less than 2h for some of the clinical strains in exponential phase; and, in less than 4h for stationary phase cells (using a multiplicity of infection of 1). This phage has also the capacity of reducing, by up to 2 Log CFU per ml, 24h scraped biofilm cells. Besides CFU counting, this cell reduction was confirmed by flow cytometry counting. Additionally, live/dead flow cytometry staining allowed the observation that this phage kills biofilms bacteria in different physiological states including dormant cells. These are promising results, since the rare feature presented by this phage of infecting cells with reduced metabolic activity allied with its high broad host strain range suggest its use for therapy purposes.

## Thermostable bacteriophage peptidoglycan hydrolases as alternative to antibiotics

Mikoulinskaya G.V.<sup>1</sup>, Chernyshov S.V.<sup>1</sup>, Shavrina M.S.<sup>1</sup>, Zimin A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Branch of the Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

The wide use of antibiotics is one of the causes of the increase of the prevalence of antibiotic-resistant strains of bacteria (the problem is particularly acute for nosocomial infections pathogens). In recent years the antibacterial drugs alternative to antibiotic

arose much interest because they can effectively replace them or work synergistically with them. One approach is the use of bacteriolytic enzymes, most often of peptidoglycan hydrolases. The advantages of using of peptidoglycan hydrolases for bacterial lysis are the relative specificity of action, high speed of lysis, low immunogenicity, the ability to interact synergistically with each other and with other antibacterial agents, the relative cheapness of production (in the case of recombinant proteins) and the thermostability that is often observed in such proteins.

We have identified three new phage peptidoglycan hydrolases encoded by bacteriophages T5, RB43 and RB49. We obtained strains-producers of recombinant proteins, the enzymes were purified to electrophoretically homogeneous state and characterised biochemically. By their substrate specificity these proteins belong to M15 family of peptidases hydrolysing the connection between L-alanine and D-glutamic acid in the peptidoglycan of gram-negative bacteria belonging to A1 type. Peptidases of this family contain zinc ions; in addition, it was shown that endolysin of bacteriophage T5 is characterised by regulation of Ca<sup>2+</sup> ions.

Despite the differences in structure and biochemical properties (specific activity, pH-optimum, sensitivity to the buffer components and ionic strength), all three enzymes have high thermostability: they retain from 25 to 70% of enzyme activity even after 30-minute heating at 90°C. Besides this it was shown that these enzymes were able to lyse the gram-negative bacteria cells from the outside with the high efficiency in the presence of the outer membrane permeabilising agents. Conformational stability and bacteriolytic activity allow us to be optimistic about the prospects of the pharmaceutical use of these small-sized globular peptidases.

## Bacteriophages of pectolytic potato pathogens

Miroshnikov K.A.<sup>1,2</sup>, Kabanova A.P.<sup>1,2</sup>, Vo Thi Ngoc Ha<sup>2</sup>, Schneider M.M.<sup>1</sup>, Sykilinda N.N.<sup>1</sup>, Toschakov S.V.<sup>3</sup>, Ignatov A.N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>PhytoEngineering R&D Center Rogachevo Moscow Region, Russia;

<sup>3</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Pectolytic enterobacteria (*Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp.) are World-spread phytopathogens causing significant losses during potato vegetation and storage. IN the course of the present study a collection of 165 isolates of pectolytic bacteria was genetically systematized (RAPD-profiling, MLST-analysis, 16S rRNA sequencing), and subdivided into 26 strain groups. Isolated and characterized lytic *Pectobacterium* and *Dickeya* bacteriophages usually possess strain group infection specificity. Genome analysis of these (mostly KP34-like and Vi01-like) phages suggests their primary adsorption to the surface polysaccharide of bacterial cell. This trend enables to rationalize the selection of bacteriophages for bacteriosis prevention by tuber treatment in warehouses.

The study is supported by RSF grant # 16-16-00073

## Molecular characterization of the activity and requirements of a novel and promiscuous bacteriophage integrase

Mohammed R. Mohaisen, Alan J. McCarthy,  
Heather E. Allison

Institute of Integrative Biology, University of Liverpool,  
Liverpool, UK

Stx bacteriophages are responsible for the dissemination to and production of Shiga toxin genes (stx) in the Enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). These toxicogenic bacteriophage hosts can cause severe, life-threatening illness, and Shiga toxin (Stx) is responsible for the severe nature of EHEC infection. At the point of infection, the injected phage DNA can direct its integration into the bacterial chromosome becoming a prophage; the host cell is then known as a lysogen. Unusually, our model Stx phage, Φ24B, can integrate into at least four distinct sites within the *E. coli* genome that shared no easily identifiable recognition sequence pattern. The identification of what are actually required for phage and bacterial DNAs recombination has been tested using both an in vitro and in situ recombination assays. These assays enable easy manipulation of bacterial attachment site (attB) and phage attachment site (attP) sequences. The aim of our study is to fully characterize the requirements of this promiscuous integrase, carried by the Stx phage Φ24B (IntΦ24B), to drive integration. So far, a number of successful assays have enabled us to identify the minimal necessary flanking sequences for all of four attB sites (50 bp each side) and attP site (150 bp each side). The later one is very similar in size to the lambda attP (117 bp each side of the crossover site). Moreover, within these four attB sites, we have identified have confirmed the primary site.

## The test system for the accelerated indication *E. coli* 0157: H7

Molofeeva N.I., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N.,  
Merchina S.V., Shestakov A.G.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

The aim of our research was to optimize the time parameters of detection of *E. coli* O157: H7 by the phage amplification assay (PAA) while maintaining the other parameters (temperature, concentration of the bacterial cultures and phage corpuscles in 1 ml) of PAA protocol. The optimal exposure time was selected from six parameters: – in a pre-assay enrichment of the test material for 5, 16, 24 hours at 37 °C, after the addition of phages the mixture was incubated for 5 hours at 37°C; in the increasing the contact time of the material with phage up to 10, 16 and 24 hours at a temperature of 37 °C.

It was found that the enrichment of the material during 5 hours allows to detect *Escherichia* at a concentration of  $10^3$  microbial cells/ml with the help of PAA. The enrichment of the test material for 16 hours further increases the sensitivity of reaction and allows to detect bacteria at a concentration of  $10^2$  microbial cells/ml. The whole analysis takes 32 hours. Bacteriological methods were not able to detect the same

amount of *Escherichia*. Increase of the enrichment time up to 24 hours did not improve the sensitivity of reaction.

In the second variant of the experiment, the meat-peptone broth contaminated with *E. coli* O157: H7 strains: RL and №51659 RL from  $10^1$  to  $10^5$  microbial cells / ml were not enriched, but the contact time between the material and the phage was increased up to 10, 16, 24 hours.

The sensitivity of PAA depended on the time of incubation the test material. Using the time of up to 10 hours allowed to detect *Escherichia* at a concentration of  $10^3$  microbial cells/ ml using PAA method. While incubating the test material with the phage for 16 hours the sensitivity of the reaction increases, that allows detecting bacteria at a concentration of  $10^2$  microbial cells/ml. This analysis takes 32 hours. Bacteriological methods were not able to detect the same amount of *Escherichia*. Incubating the test material with the phage for 24 hours did not improved the sensitivity of reaction any more. Bacteriological methods were able to detect *E. coli* O157: H7 at a concentration of  $10^4$  microbial cells/ml and this analysis takes 96 hours.

According to our data, we believe that the most effective are the modes of PAA with 5 hours-exposition of the material with the phage, when it is possible to spend an indication of bacteria at a concentration of  $10^3$  in one ml of the test substrate, which study takes 16–18 hours, so this mode is used in future studies, although the most effective in sensitivity is the incubating of the test material with the phage for 16 hours, which takes up to 32 hours.

## Lytic bacteriophage pm16 specific to *Proteus mirabilis*: its genome, biological properties and some aspects of interaction with host bacterium

Morozova V.V., Kozlova J.N., Shed'ko E.D.,  
Babkin I.V., Kuril'scikov A.M., Junusova A.J.,  
Ryabchikova E.I., Vlasov V.V., Tikunova N.V.

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

*Proteus mirabilis* is a gram-negative bacterium belonging to Enterobacteriaceae family. An interesting feature of the *P. mirabilis* life cycle is its ability to differentiate into elongated, very mobile, multi-nucleotide cells 60-80 microns in length, called swarming cells carrying hundreds of flagella on their surface. *P. mirabilis* is one of the causative agents of infections of the gastrointestinal tract, urogenital system, it is able to infect surgical wounds and it is one of the infectious agents involved in a diabetic foot syndrome. Clinical isolates of *P. mirabilis* often feature multiple antibiotic resistance, therefore there is a demand for alternative treatment for *Proteus* infections.

In this paper we investigated the biological properties of new potential therapeutic lytic bacteriophage PM16 from the collection ICBFM SB RAS specific to the pathogenic strain of *P. mirabilis* KEMTK 73; we performed its full genomic and proteomic studies. Bacteriophage RM16 is characterized by high stability, rapid adsorption on the cells, short latent period

and high yield. Bacteriophage RM16 was assigned to the *phiKMVvirus* genus of Podoviridae family on the base of its genome organisation, gene synteny and similarity of protein sequences. Inside *phiKMVvirus* genus bacteriophage RM16 clusters with VP93, LIMElight, Petty, phiKDA1 phages and KP34-like bacteriophages.

According to electron microscopy data bacteriophage, RM16 attaches to the surface of *P. mirabilis* bacteria, not to flagella. While propagating on the *P. mirabilis* cells bacteriophage RM16 has a low frequency of occurrence of phage-resistant mutants. Phage-resistant derivatives of *P. mirabilis* obtained by infecting the cells of the host bacteria by the phage RM16 at a high multiplicity of infection had the non-swarming phenotype. Electron microscopic study of phage resistant mutants showed that they differed from the original strain in the size and shape of cells, lacked of flagella. The changes in the structure of the outer cell membrane and reduced periplasmic space were observed. Presumably the resistance of non-swarming cells to the phage infection is due to the changes in the macromolecular composition of the membrane, associated with the absence of flagella and the non-swarming phenotype.

## Structure and tail contraction-controlling mechanism of Staphylococcal twort-like phage 812 determined by cryo-electron microscopy

Novacek I., Siborova M., Pantucek R., Benesik M., Doskar J., Plevka P.

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

Bacteriophages from the family Myoviridae use double-layered contractile tails to infect bacteria. However, the mechanisms controlling the tail contraction and genome release are not well understood. Phage 812 is a polyvalent phage that can infect more than 95% of *Staphylococcus aureus* strains including those resistant to antibiotics. Therefore, phi812 and closely related phages are potential antibacterial phage-therapy agents. We have employed cryo-electron microscopy to determine structure and tail contraction mechanism for staphylococcal broad host-range mutant phage 812-K1/420 that belongs to genus Twort-like virus, family Myoviridae. The phage has a 90 nm diameter isometric head and 240 nm long contractile tail ended by a double layered baseplate. The tail and baseplate of the native phage are dynamic. The structure of the icosahedral head could be refined to 5.0 Å resolution and additional sub-averaging within the T = 16 icosahedral asymmetric unit allowed determination of the major capsid protein to 3.8 Å resolution. The structures of the native tail and baseplate were solved to 8 Å and 12 Å resolution, respectively. In order to examine the mechanism of the infection process, we determined the structure of the phage in the contracted state. The phage head is not altered after the DNA ejection. However, both the baseplate and tail undergo large reorganizations documented in their 6 Å and 8 Å resolution structures. Comparison of the tail and baseplate structures in

the native and contracted conformation allowed us to determine the changes accompanying cell wall recognition and binding which is then followed by injection of the bacteriophage genome into the host bacteria.

*This research was carried out under the project CEITEC 2020 (LQ1601), the Grant Agency of the Czech Republic (15-21631Y) and Masaryk University Student Project for Specific Research (MUNI/A/0967/2015).*

## A new phage endolysin as a powerful tool to detect and kill *Paenibacillus larvae*

Oliveira A., Santos S.B., Melo D.R.L., Azeredo J.

University of Minho, Braga, Portugal

American foulbrood (AFB) is an infection caused by *Paenibacillus larvae* (*P. larvae*), a Gram-positive spore forming bacteria. This disease occurs in honeybee larvae, when spores germinate and proliferate in their midgut and subsequently penetrate into the hemolymph, causing sepsis and larval death. This work was motivated by the need of finding alternatives to antibiotics, that will leave residues in honey if used to treat this infection.

Bacteriophages (phages) and/or their endolysins might represent valuable tools to use in AFB control as have already proved to be powerful biological antimicrobials. We have previously isolated and reported the first known *P. larvae* phage genome and by its *in silico* analysis we further identified, expressed and characterized the first *P. larvae* endolysin, PlyPl23. This enzyme has two functional domains: a catalytic domain (Amidase\_2) and a totally new cell wall binding domain (CBD). The latter confers specificity to the enzyme, targeting specific bonds of the cell wall surface.

The antimicrobial activity of PlyPl23 was tested *in vitro* against a panel of *P. larvae* strains and *in vivo* in bee larvae. PlyPl23 was effective in decreasing *P. larvae* infection yields in bee larvae experimentally infected with spores and no toxicity effects were encountered.

In a complementary study, the cell wall binding domain (CBD) of PlyPl23, fused to a green fluorescence probe was heterologously expressed. The specificity of the PlyPl23 CBD was assessed through flow cytometry and epifluorescence microscopy. Overall the results demonstrate the potential of a phage endolysin for detection and control of *P. larvae*.

## Capsule depolymerase activity of phages infecting the *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex

Oliveira H., Costa A.R., Konstantinidis N., Nemec A., Schneider M., Dötsch A., Sillankorva S., Azeredo J.

University of Minho, Braga, Portugal

To be able to enter and replicate in exopolysaccharide (EPS) slime or capsule surrounded bacteria, bacteriophages (phages) have evolved the ability to overcome the EPS struc-

ture by producing virion-associated proteins with polysaccharide depolymerization activities. We have studied phages infecting the *Acinetobacter baumannii*-*Acinetobacter calcoaceticus* (ACB) complex, which groups *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* and *A. seifertii* species. It is known that about 100 different capsule polysaccharide (CPS) synthetic loci are found in *A. baumannii* genomes alone. This situation is even more complex, with some strains of *A. baumannii* having nearly identical CPS synthetic loci to strains of *A. nosocomialis* or *A. pittii*, and supposedly producing identical CPS. We have isolated and characterized 21 phages infecting the ACB complex and demonstrate that they have specialized depolymerases that degrade polymers (e.g. capsular and structural polysaccharides) to facilitate their access to the hosts. To further characterize the phage-host interactions, we have sequenced bacterial genomes and mutated the CPS synthetic loci to create CPS-deficient mutants, to prove that the ACB phages recognize the CPS as the primary receptor. We further demonstrate that recombinantly expressed depolymerases are active and key components in the tail specificity apparatus of Podoviridae viruses. We could conclude that phages infecting the ACB complex represent a source of enzymes that degrade a complex variety of polymeric substances that can be further exploited as a serotyping scheme currently inexistent for *Acinetobacter* species.

## Phage therapy of urinary infection

Perepanova T.S., Darbeeva O.S.

Scientific Research Institute of Urology, Moscow, Russia

Therapeutic-and-prophylactic bacteriophages are the complexes of polyclonal highly virulent bacterial viruses that cause the death of the homologous bacterial species. Bacteriophage preparations are the sterile purified filtrates of relevant bacterial species phage lysates. They are exempt from the waste products of bacteria, endo- and exotoxins, products of phage lysis of bacterial cells.

Virulent bacteriophage action occurs is achieved in following stages: adsorption on the surface of the homologous microbial cell, penetration into the cell and subsequent intracellular propagation using its structural components, the destruction of cell and release of mature phage particles capable of infecting new bacterial cells.

Due to the strict specificity of the action, bacteriophages unlike antibiotics do not inhibit normal microflora, do not suppress the immune defense and practically do not cause allergy. The presence of bacterial resistance to antibiotics does not affect on the bacteriophage lytic activity.

Bacteriophages are produce in a form of mono preparations, containing the virulent phages of bacteria of the same genus or species. In urological practice the following bacteriophage preparations are used: staphylococcal; streptococcal; proteus; *Pseudomonas aeruginosa*; *Klebsiella*, *E.coli* and combined ones, composed of several mono-preparations: polyvalent pyobacteriophage (the composition of phages: staphylococcal, streptococcal, proteus, pseudomonas, klebsiiae, *E.coli*) and the pyobacteriophage complex, which includes

*Klebsiella oxytoca* phage in addition to the above mentioned six phages.

When taken orally a bacteriophage enter the bloodstream and quickly reaches the affected organs – the kidneys and urinary tract, then lyses the bacteria and is excreted to the urine. In the presence of bacterial infection, the appropriate bacteriophages propagate actively and may reside in the organism for up to 6–7 days. In healthy people bacteriophages are excreted within 24 hours. While treating the *E. coli*, proteus and staphylococcal urinary infection the clinical-and-bacteriological effect is achieved in 86–93%. Unlike antibiotics the adaptation of commercial bacteriophage preparations to nosocomial strains of a particular hospital (and in the future – to the patient's specific strains) can be done. The improvement of the lytic activity of the bacteriophage preparations by including of the races of bacteriophages that are active against "local" bacterial strains using phages passaged through the freshly isolated cultures of microorganisms of specific hospitals are possible. Such adaptation can increase the bacteriophage titer, achieve more sustainable lysis and extend the spectrum of the phage lytic activity. Treatment of patients with recurrent urinary tract infections (cystitis, pyelonephritis calculary, catheter-associated UTI) should be prescribed strictly after the determination of pathogen susceptibility to bacteriophage preparation: 30 ml × 3 times a day for 10–14 days.

## Biological properties of different genetic types of *P. aeruginosa* bacteriophages

Polygach O.A.<sup>1</sup>, Voroshilova N.N.<sup>1</sup>, Tikunova N.V.<sup>2</sup>, Dabizheva A.N.<sup>1</sup>, Morozova V.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NPO Microgen, Ufa, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Broad range of antibacterial activity of bacteriophage preparations is achieved by continuous renewal of their composition. The purpose of research is the study of infectious range and biological properties of *P. aeruginosa* bacteriophages. The object of the study is "Pyobacteriophage polyvalent purified" preparation, and 9 strains of newly isolated *P. aeruginosa* bacteriophages. The preparation demonstrated 99.6% antibacterial activity for 778 clinical strains of *P. aeruginosa* bacteria in 10<sup>-1</sup> titer by Appelmann. Metagenomic analysis shows that the preparation is composed of lytic bacteriophages of *P. aeruginosa*. Podoviridae species include phiKMV-likevirus and Luz24-likevirus, and the closest representatives of these species are bacteriophages phiKMV [NC\_005045] and TL [NC\_023583]. Analysis of 9 genomes of the newly isolated *P. aeruginosa* bacteriophages by genome sequencing and electron microscopy identified their taxonomic attribution to phiKMVlikevirus and N4likevirus species of Podoviridae family as well as PB1likevirus and phikzlikevirus of Myoviridae family. Functional identification of open reading frames revealed that 7 strains attributed to phiKMVlikevirus, N4likevirus,

PB1likevirus species do not contain genes responsible for potential recombination and toxin formation, unlike two strains of phikzlikevirus species where the putative recombinase gene is observed and pseudo lysogeny state is detected. This prevents the use of such phages in a preparation. The parameters of a single propagation cycle are the following: a degree of maximum adsorption for phiKMV-phages is 90–95%, latent period 20 minutes, yield 60–100 phage particles / bact.cell; the degree of a maximum adsorption for PB1-phage is ≥99%, latent period 25 minutes, the yield is 10–15 phage particles / bact.cell; the degree of maximum adsorption for N4-phages is ≥70%, latent period 35–40 minutes, yield 5–10 phage particles / bact.cell. Seven out of 9 bacteriophage strains can be attributed to lytic type with a broad spectrum of antibacterial activity and considered as candidates for inclusion to "Pyobacteriophage purified polyvalent" composition. These strains include 3 strains of phiKMVlikevirus – the spectrum of antibacterial activity is 48–49.9% and 51.8%, 1 PB-1 strain – 24.3%, and 3 N4likevirus strains – the spectrum is 24.2% – 11.7% and 7.5%.

## Endolysins of staphylococcal temperate phages with novel substrate-binding domain

Prijma A.D., Shneider M.M., Legotsky S.A., Klyachko N.L., Miroshnikov K.A.

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia;  
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

"Enzybiotic" concept, or application of bacteriophage-borne enzymes, degrading bacterial cell walls is an attractive alternative to treat bacterial infections. In case of Gram-positive bacteria, where peptidoglycan of the cell wall is accessible to the enzyme from outside, the enzybiotic strategy works properly, and some peptidoglycan-degrading enzymes are already commercialized. Thus, the study of structural and functional diversity of endolysins is an essential goal. Temperate bacteriophages, improper for direct use in phage therapy are, nevertheless, a good source for recombinant peptidoglycan-hydrolases.

Endolysins of phages infecting *Staphylococcus aureus* are reasonably well studied. They are multidomain enzymes that consist of one or more catalytic domains, and a C-terminal cell-binding domain (CBD). Above 70% of known and predicted staphylococcal endolysins contain a "SH3\_5" – like CBD, while other proteins possess a putative CBD with few homology to other conservative protein folds.

The presented study includes the construction of recombinant endolysins of temperate *Staphylococcal* phages 42E and 71, normally used for *S. aureus* strain typing. These proteins have Peptidase + CBD (Lys42E) and Peptidase + Amidase + CBD (Lys71) structure, where CBD are similar to each other, but differ from SH3\_5. Physico-chemical properties of recombinant Lys42E and Lys71 were investigated.

*The study is supported by RFBR grant # 15-04-07995*

## Clinical and microbiological efficiency of vaginal sanitation by bacteriophage gel «Phagogin» in treatment of anaerobic vaginitis and bacterial vaginosis

Priputnevich T.V., Apolikhina I.A., Muravyeva V.V., Dodova E.G., Lyubasovskaya L.A., Melkumyan A.R., Zhilenkov E.L., Popova V.M., Zurabov A.J.

Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

Opportunistic vaginal infections remain an urgent problem of obstetrics and gynaecology. Relapsing course and inefficient use of antibiotics generate the need for alternative treatment methods. The development of complex phage preparations can be a prospective trend.

The presented study included 42 women with complaints of abnormal discharge and discomfort in the vulva. A comprehensive microbiological examination of vaginal discharge ((microscopy Gram staining, cultural studies) and PCR assay on STIs were conducted.

We identified 30 women having vaginal infections associated with conditionally pathogenic microorganisms (CPM): 10 / 33.3% – vulvovaginal candidiasis (VVC), 2 / 6.7% – bacterial vaginosis (BV), 11/36, 7% – aerobic vaginitis (AV), 5 / 16.7% – + VVC + BV, and 2 / 6.7% – BV + AV. All patients, colonised by yeast fungi, assigned to standard treatment. The rest of the women held the vaginal sanitation using "PHAGOGIN" gel: 10 days twice a day for 5 ml intravaginally. All CPM strains were tested for the sensitivity to "PHAGOGIN". AV in 5 / 16.7% of the women was caused by mono-agent, in 8 / 26.7% – by associations of facultative-anaerobic CPC. *Escherichia coli* was isolated most frequently – 11 / 36.7%, less often – *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* (16.7 and 10%, respectively) in the titres 5–7 Ig CFU/ml. 90.9% *E. coli*, 66.7% *K. pneumoniae*, 60% *E. faecalis* strains were susceptible to "PHAGOGIN", and all strains of *S. agalactiae* and *Gardnerella vaginalis* were resistant to "PHAGOGIN". Clinical and microbiological efficacy of vaginal sanitation while in the case of AV was observed in 9/69.2% of women. Failure of therapy was related with BV and AV caused by CPM resistant to "PHAGOGIN" (*G. vaginalis*, *S. agalactiae*). "PHAGOGIN" gel is positioned to be potentially active against *Streptococcus spp.*, so we can assume that the inefficiency against *S. agalactiae* occurred due to the absence of the species-specific set of bacteriophages in it.

Thus, to achieve much efficiency, the test of the sensitivity to etiologically significant CPM to phage components of the gel should precede the application of gel "PHAGOGIN".

## Recognition of cellular surface by n4-like viruses

Prokhorov N.S., Riccio K., Nazarov S., Zdorovenko E.L., Guerero-Ferreira R., Shneider M.M., Golomidova A.K., Tatarskiy E.V., Gurko E.V., Knirel J.A., Leiman P.G., Letarov A.V.

S.N. Vinogradsky Institute of Microbiology, Moscow, Russia;  
École polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne,  
Switzerland;  
N.D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Moscow, Russia

Today, when the first adequate evaluation of numbers and genetic diversity of bacteriophages appears, bacteria viruses have become seriously considered as a potential mean of combating pathogenic bacteria with multidrug resistance. The rational use of viruses as antibacterial agents can only be based on a deep understanding of the mechanisms of interaction between viruses and their hosts, determining the specific nature of the infection. Questions about how exactly bacteriophages find and connect to sensitive cells, and how is the decision on the introduction of the viral genome into the cell proceeds, remains one of the most mysterious aspects of the biology of bacteriophages.

Using a combination of bioinformatic, biochemical, bioengineering approaches and structural analysis, we examined the molecular mechanisms of recognition of the cells of the sensitive strain of *E. coli* 4s (O22) by closely related N4-like podoviruses G7C and Alt63. The analysis of the genomes allowed formulating the hypotheses about the structure of the adsorption apparatus. The genetic analysis of mutants 4s resistant to phage infection allowed showing the involvement of lipopolysaccharides (LPS) into the infection process as primary penetration receptors. Biochemical tests with the use of recombinant component proteins of the adsorption apparatus and the NMR analysis of reaction products revealed two alternative mechanisms of LPS molecules modification required for successful infection by these phages – a non-hydrolytic cleavage and deacetylation of LPS. The second mechanism appears to be the only alternative of LPS depolymerisation while the infecting by podoviruses, as described so far. The structure of the virion and G7C adsorption apparatus was installed by cryoelectron reconstruction. All components of adsorption apparatuses G7C Alt63 were crystallised and the structures of proteins were defined by the X-ray analysis. The relationship between the obtained structures and enzymatic functions of the adsorption apparatus components were determined.

Bioinformatic analysis of the genomic sequences of bacteriophages and published structures of the components of phage adsorption apparatuses revealed the conservative elements G7C-like type of adsorption apparatuses not only between obviously related podoviruses, but also outlying representatives of tailed phages as large myoviruses Vil, CBA120 and even bacteriophage T4.

## Biological properties of *Citrobacter* bacteriophages isolated from the sand of children sandboxes

Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A.,  
Zolotukhin S.N., Efreytorova E.O.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

The Department has conducted the study for isolation and identification of *Citrobacter* bacteriophages from the sand of children sandboxes in Oktyabrsky township. Samples from 9 sandboxes were examined, and 8 *Citrobacter* phage strains were isolated. Basic biological properties of isolated phages were studied: morphology of the negative colonies, lytic activity, range of lytic activity and specificity.

Morphology of negative colonies was studied by seeding phages by agar overlay method onto meat-peptone agar according to Gratia. Negative colonies could be divided into two types: type 1 – transparent negative colonies round in shape with smooth edges, 0.5–1.0 mm in diameter – 5 phages, and type 2 – round colonies with smooth edges, a diameter is 2.0–2.5 mm, transparent, with no secondary growth, with a zone of incomplete lysis around the periphery, the zone width is 0.5 mm – 3 phages.

Isolated bacteriophages have demonstrated different lytic activity. It was evaluated by phage ability to induce lysis of the bacterial culture in liquid and solid nutrient media, and this was expressed by the maximum dilution where tested bacteriophage indicated their lytic action. The tested phages were active in the range from  $1 \times 10^5$  to  $3.2 \times 10^9$ .

To explore the range of lytic activity of isolated bacteriophages 7 strains of the *Citrobacter* genus were used (from the museum of the department of microbiology, virology, epizootiology and veterinary-sanitary examination). Experiments showed that studied phages possess different spectrum of lytic activity.

Phage specificity is used widely for differentiation of bacterial species. This ability is determined, above all, by their affinity to receptors of lysed bacteria. The determination was conducted on agar media by applying phage onto the culture lawn. Bacteriophages were strictly specific.

According to obtained data, the isolated bacteriophages can be used to the diagnose and identify of bacteria of *Citrobacter* genus in various objects.

## In vitro optimization of a phage cocktail

Richter M., Honaker R.

EpiBiome, South San Francisco, USA

Not every phage is created equal, nor is every combination of phages equal. As phage therapy is becoming a viable and increasingly important treatment option, it is crucial to understand the characteristics that make a phage or a combination of phages more effective as well as how to best measure this efficacy. The appeal of a phage cocktail over monophage therapy is the potential for having a greater overall host range as well as reducing the likelihood of producing phage-resistant

hosts. However, engineering a more effective cocktail requires a precise understanding of each individual phage's characteristics, phage-host interactions, and interactions with other phages used in the cocktail. Scoring phages based on individual ability to amplify, reduce bacterial count, and suppress the emergence of resistance can determine the best candidates for cocktail inclusion, and investigating synergism with other phages can also be a strong indicator for a cocktail that can more effectively curtail bacterial growth and phage-resistance. Finally, a directed evolution technique to amplify individual phages against a specific strain can vastly improve the resulting cocktail's efficacy against it. Together, optimizing a cocktail in these three areas- each phage's individual efficacy, phage-phage interactions, and phage-host interactions- can dramatically improve the cocktail's ability to lower bacterial count by several logs as well as delay, or in some cases eliminate, the emergence of phage-resistant hosts.

### Molecular-genetic typing of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages for phage therapy and phage prophylaxis

Rubalskii E.O., Aleshkin A.V., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S., Afanasiev S.S., Rubalsky M.O.

G.N.Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia; Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

One of the required conditions for safe application of bacteriophage for therapeutic and preventive purposes is a virulent nature of phage strains forming the preparations. The presence of at least one temperate bacteriophage strain in the cocktail may lead to negative consequences, such as spread of antibiotic resistance, transfer of bacterial factors of pathogenicity, formation of bacteria resistant to phages. In addition, the bacterial pathogenicity factors should not present in genomes of virulent bacteriophage strains.

The sources of temperate phage in preparations may be both incorrectly characterised candidate strains of bacteriophages and lysogenic bacterial cultures on where bacteriophages are propagated. Classical microbiological methods of temperate bacteriophages induction (heating, ultraviolet irradiation, mitomycin C) often give false negative results, and, therefore, cannot be an effective method of production control of drugs containing phages.

As an example, the effective control of absence of temperate phages at different stages of the production process the drug effective against *Klebsiella pneumoniae* was investigated. Currently, the candidate strains of bacteriophages against *K. pneumoniae* belonging to all three families of Caudovirales order are known. Therefore the aim of this study was to develop a universal methodical approach to identify moderate phages.

As a basis of the developed methodology, we chose the sequencing of viral metagenomes. For fast and reliable detection of temperate phages, we have developed a bioinformatic pipeline, which includes the original database of undesirable

amino acid and nucleotide sequences. In the study, we found the temperate phage of P2virus genus included to one of the cocktails. To this phage gene encoding integrase we constructed specific primers and conducted PCR to identify and eliminate the source of temperate phage, as well as to control its absence on the subsequent production stages.

### Features of selection of phages active to *Klebsiella oxytoca*

Sadrdinova G.R., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Liashengko E.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

The purpose of the study was to optimize the method of selection of bacteriophages active against *K. oxytoca* bacteria for their further use in the development of a biological preparation. Environmentally isolated bacteriophages active against *K. oxytoca* No. 1 strain were used in the study. The selection and enhancement of lytic activity of isolated bacteriophages was performed using the passage of phage on indicator culture with the periodic detachment of negative colonies according to the method proposed by Gabrilovich I.M.(1992), Zolotukhin S.N. (2007), Lyashenko E.A. (2014).

Selection of bacteriophages and enhancement of their lytic activity were performed by 5-fold passage of phage isolates by agar overlay method, with periodic re-seeding of negative colonies typical of this isolate to obtain a population of viruses possessing homogeneous negative colonies and a consistently high titre. Isolated phage was diluted in meat-peptone broth pH (7,1 + 0,1) of  $10^{-6}$  to  $10^{-9}$  concentration. After 18-hour incubation in the thermostat, one negative colony located 5–10 mm separately from the others was detached using a bacteriological loop and placed in a test tube with meat-peptone broth, followed by addition of 0.5 ml 18-hour indicator culture *K. oxytoca*. At the same time, we prepared the meat-peptone broth with indicator culture without phage (control). Experimental and control tubes were incubated at 37°C for 4 hours (monitored every hour for the amendments). In the case of change (enlightenment of the test tube as compared to the control) the obtained phagolysate was treated with chloroform for 30 minutes and examined by agar overlay method. If after a 4-hour observation there were no changes, the test tubes were left at room temperature for 20 hours. Then the tubes were also treated with chloroform (1:10), and examined by agar overlay method. During the study, in each case, the negative colony identical to the original were selected and passed. There were conducted up to five passages, and then the selection was considered to be completed.

As the result of studies, we selected two strains of *K. oxytoca* 1 bacteriophages from the environment.

## Lysogeny studies of strains of *Klebsiella oxytoca* species

Sadrtdinova G.R., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Liashengko E.A.

*Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia*

The frequency of prophage transition into infectious condition (temperate phage) can be enhanced by the range of inducing agents. According to the results of our previous studies, some strains of *K. oxytoca* bacteria, obtained from the museum collection of the department, were lysogenic (the exposure by UV-rays, X-rays). The purpose of the study was to optimize the method of isolation of viruses of bacteria, active against *K. oxytoca* by induction method. In our studies, we used two strains of bacteria isolated from the external environment and typed as *K. oxytoca* species.

The daily culture of studied strains in tubes with meat-peptone broth (4.5 ml) was subjected to X-ray II irradiation in II periods, each period of 1.6 sec., the total dose was 4.0 mSv. The X-ray irradiation is more potent compared to ultraviolet one because for the phage induction there was no need to contact directly with the bacterium. After irradiation in this mode, the tubes were incubated at 37°C for 24 hours. After one day, the prospective phagolysate (0.5 ml) was seeded onto sterile 1.5% meat-peptone agar in the form of a solid lawn. The day before the experiment, Petri dishes with meat-peptone broth (20 mL) were dried, as the presence of excessive moisture (as condensate) may distort the results of the study. Petri dishes were left for 30–40 minutes at room temperature. Inoculated plates were incubated at 37°C. The results were taken after 4, 8, 12, 16 and 20 hours. As a control, the bacterial strains onto meat-peptone agar were incubated without irradiation (solid bacterial growth). The formation of negative colonies on the lawn of culture after 20 hours testified the presence of induced phage.

In the course of the research related to the study of the effect of X-irradiation on isolation of bacteria viruses, one *K. oxytoca* phage was isolated. Thus, this method cannot be attributed to the universal methods of the isolation of phages, but may be used as an option.

## Features of isolation of virulent phages active to the tribe of *Klebsielleae*

Sadrtdinova G.R.<sup>1</sup>, Pulcherovskaya L.P.<sup>1</sup>, Efreytorova E.O.<sup>1</sup>, Vasilev D.A.<sup>1</sup>, Zolotukhin S.N.<sup>1</sup>, Lyashenko E.A.<sup>1</sup>, Pavlova I.B.<sup>2</sup>, Judina T.G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia;*

<sup>2</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

The purpose of the study was to optimize the method of isolation and selection of bacteriophages active against bacteria referring to the tribe *Klebsielleae*: *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Hafnia*. The subjects of the study were 10 sand samples (from a playground).

The selection of bacteriophages and enhancement of their lytic activity was conducted by 4 times routine passage of

phage isolates with indicator culture seeded by agar overlay method with periodic reseeding of negative colonies typical for the isolate until obtaining the virus population with uniform negative colonies and consistently high titre (according to the technique proposed by Gabrilovich I.M. (1992), Pulcherovskaya L.P. (2004), Zolotukhin S.N. (2007), Lyashenko E.A. (2014)).

Selected phages were diluted in meat-peptone broth from 10<sup>-6</sup>–10<sup>-9</sup>. After 20 hour incubation, we detached one negative colony located separately from the others, and placed it into a test tube with the meat-peptone broth, and then added 0.2 ml of 20-hour broth culture of the indicator strain: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E. cloaceae* 397, *E. aerogenes* 654. At the same time, we prepared the meat-peptone broth with the indicator culture without phage (control). Tubes were cultured at 37°C for 4 hours (monitored every hour for the amendments). In the case of changes (enlightenment of the test tube as compared to the control one) the obtained phagolysate was treated with chloroform (the phages active against strains *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16) and the temperature (phages active against *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *E. cloaceae* 397, *E. aerogenes* 654) for 30 minutes and examined by agar overlay method. In the course of the study, in each case, the negative colony that was identical to the original one was selected and passaged. There were conducted up to four passages, and then the selection was considered to be completed.

As the result of studies, we selected the virulent strains active against various species referring to tribe *Klebsielleae* from the objects of the environment.

## Characterization and cryo-em reconstruction of *Tectiviridae thermus* spp. bacteriophage PhiKo

Sedov A.S.<sup>1,2</sup>, Lopatina A.V.<sup>3</sup>, Pechnikova E.V.<sup>4</sup>, Severinov K.V.<sup>3</sup>, Miroshnikov K.A.<sup>2</sup>, Sokolova O.S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;*

<sup>2</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;*

<sup>3</sup>*Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russia;*

<sup>4</sup>*FEI, Eindhoven, Netherlands*

*Tectiviridae* is a rare phage family comprising of tailless phages infecting Gram-negative bacteria. Tectiviral particles include both a lipid membrane and a icosahedral protein capsid protecting double-stranded DNA. Bacteriophage PhiKo is propagated on thermophilic bacteria belonging to *Thermus* spp. The PhiKo genome contains 11,129 bp, and encodes 26 putative ORFs with very low similarity to any known genes. Only the roles of major capsid proteins (ORF 13) peptidoglycan hydrolase (ORF20) and ATPase (ORF14) can be proposed bioinformatically. The most striking feature is the absence of a phage-encoded DNA polymerase typical for other *Tectiviridae* phages. Structural proteome of PhiKo involves at least 4 proteins identified by mass-spectrometry.

PhiKo particles were purified using controlled pore glass chromatography, and vitrified in liquid ethane. Frozen phage particles were studied by cryo-electron tomography on the Titan Krios (FEI) at 300 kV accelerated voltage. Subsequent image reconstruction revealed an icosahedral capsid with  $T = 25$ , and an uneven internal lipid layer, with packed DNA genome. The structural composition of PhiKo is notably different from the most studied member of the *Tectiviridae* family, *Enterobacteria* phage PRD1.

The study is supported by RFBR grant # 16-04-01587.

Authors would like to thank the Resource Facility Center for scanning probe and electron microscopy of Kurchatov Institute for use of Titan Krios.

## Host range expansion of bacteriophage Sb-1 correlates with significant changes of bacteriophage genome

Sergueev K.V.<sup>1</sup>, Filippov A.A.<sup>1</sup>, Farlow J.<sup>1</sup>, Reddy A.<sup>1</sup>, Kvachadze L.<sup>2</sup>, Balarjishvili N.<sup>2</sup>, Kutateladze M.<sup>2</sup>, Nikolich M.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Walter Reed Army Institute of Research, USA;

<sup>2</sup>G.Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology and Virology, Tbilisi 0160, Georgia

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is a dangerous pathogen that became a major problem for the modern medicine. Bacteriophage therapy is one of the promising approaches to treat MRSA infections. A Twort-like phage Sb-1 was isolated in Georgian Republic (USSR) in 1977 and has been widely used for treatment of various human *S. aureus* infections. Sb-1 has a rather broad host range within *S. aureus* that includes MRSA strains, and its host range can be further expanded by multiple passages on phage-resistant strains (Kvachadze et al., 2011; *Microb. Biotechnol.* 4: 643-650). We tested Sb-1 phage manufactured at the Eliava Institute on a panel of 23 MRSA strains and showed that it was able to lyse 22 of them. Host range of the phage was expanded and the properties of the host range mutant designated Sb-1M were investigated. The efficiency of Sb-1 and Sb-1M plating was tested on 64 diverse global MRSA isolates. Fifty seven of these (89.1%) were susceptible to Sb-1, while five additional strains (62/64 = 96.7%) were susceptible to Sb-1M. The full genomes of Sb-1 and Sb-1M were sequenced to look into genomic changes that could contribute to this significant broadening of host range. An Sb-1 genome sequence determined earlier (NCBI Accession No. HQ163896, Kvachadze et al., 2011) was used as the reference sequence. Sb-1M differed from the parental Sb-1 phage by single nucleotide replacements in two genes encoding for AEJ79678.1 and AEJ79753.1, conserved hypothetical proteins. Further genomic analysis revealed that the Sb-1 phage has at least two hypervariable loci, while Sb-1M mutant grown on the resistant strain shows a marked reduction in the DNA sequence diversity.

## Lytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage in biofilm

Shestakov A.G., Vasilev D.A., Malinov E.S.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

*Pseudomonas aeruginosa* bacterial biofilm formation is directly affected by the secondary messenger signal molecule c-di-GMP (cyclic diguanidine monophosphate). One of the factors increasing the level of c-di-GMP is a signal molecule NO. Previously, we have modelled the stages of characteristic pathway of mature biofilm formation. Mature biofilms (exopolymeric alginate matrix as main feature) of *Pseudomonas aeruginosa* were obtained directly affecting L-arginine catabolism in the synthetic medium. We considered dynamic change, and then static number of CFU, increase of viscosity at standard atmospheric pressure, and qualitative reaction of the alginate matrix with CaCl<sub>2</sub> as main features of the mature biofilm.

We used Pa04 lytic bacteriophage and bacterial strains of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from the museum of the Department of Microbiology. The lytic activity of bacteriophage was investigated according to the Appelmann method, and it was 10. Further for each bacterial strain, three test tubes with 9 ml of nutrient broth (Obolensk) and 9 ml with special synthetic medium with L-arginine were prepared. 0.1 ml of bacteriophage with the activity mentioned above and 1 ml of the one-day-culture of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria were added to each tube. The obtained phage-bacteria systems were cultivated under optimal conditions for 12 hours. It was found that the increase of the phage titre and the decrease in CFU of bacteria occurred equally (taking into account the acceptable error) in all tubes. Then we repeated the experiment but we added bacteriophage in an amount of 0.1 ml directly into 10 ml of 24-hour-cultures grown up on nutrient broth (Obolensk) and synthetic medium with L-arginine. The parameters of the cultivation of the phage-bacteria systems were the same. The results of the experiment showed a reduction ("not increase") of bacteriophage Pa04 activity in the tubes with the synthetic medium as compared with GRM broth to three orders of magnitude by Appelmann 10<sup>-5</sup>. There was the reduction in biofilm viscosity and the increase of CFU of bacteria down to 10<sup>7</sup> cells/ml in comparison with the control test tube with a synthetic medium where 10<sup>5</sup> cells/ml bacteria were cultivated without bacteriophage addition. In the test tube with the nutrient broth, the bacteriophage titre was 10<sup>-8</sup> by Appelmann, and CFU was 10<sup>3</sup> cells/ml. In a tube with the nutrient broth without bacteriophage CFU was 10<sup>9</sup> cells/ml. The results of the experiments enable us to make a number of assumptions.

1. Bacteriophage can affect the level of C-di-GMP;
2. The phage-mediated enzyme system is activated;
3. CRISP immunity is stimulated or suppressed;
4. Alginate matrix inhibits the development of productive phage infection;
5. Messenger C-di-GMP alters the receptor apparatus of bacterial cells.

## Age dynamics of the titre of *E. coli* bacteriophage in digestive microbiocenosis of goslings of the first 45 days of life

Skoblikov N.E., Osepchuk D.V., Moskalenko E.A., Avdienko V.V., Zimin A.A.

North-Caucasus Scientific Research Institute of Animal Industry, Krasnodar, Russia;  
G.K.Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino, Russia

A study of changes in titre of *E. coli* bacteriophages (coliphages) of 10 gosling digestive microbiocenosis of the first 45 days of life was held. The samples were taken from each bird individually, 12 times with an interval of 3–6 days. The total number of the examined samples was 120.

After sampling the specimens were weighed, resuspended in buffer with the addition of bacterial growth inhibitors, and centrifuged. Series of 100-fold dilutions were performed from obtained supernatant, followed by seeding on the laboratory *E. coli* B strain culture by agar overlay method using hard and soft agar medium LB. Counting formed plaques yielded the calculation of phage titer in the sample in Ig(PFU / ml).

The study reflects of the dynamics of coliphages of goslings during the first 45 days of life, that is the new data, useful both for the general understanding of the formation of digestive microbiocenosis of birds in ontogeny, and for determination of the critical periods of development while veterinary drugs are applied.

*The reported study was partially supported by RFBR, research project No. 16-44-230855-r\_a.*

## Attenuation of the SS-DNA bacteriophage PHIX174 in *E. coli* topoisomerase IV mutant

Smelkova O.I., Aleshkin G.I., Voronina O.L., Markov A.P.

N.F.Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Bacteriophage phiX174 is one of the most virulent ss-DNA phages of *Microviridae* family, infecting enterobacteria of *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia genera*. High virulence of the phage is combines with its lysogeny in *E. coli* cells, that assists the selection of lysogens, highly resistant to nalidixic acid (NalR). It has been shown that the reason for this selection are mutations in genes encoding gyrase and topoisomerase IV, proteins that alter DNA topology. Such mutations result in NalR phenotype, also reducing the efficiency of the phage virulent cycle, and increasing the frequency of lysogen selection.

**Objective.** To find out the possibility of attenuation of phiX174 bacteriophage in NalR mutants of topoisomerase IV, and to characterize the features of mutants selected by phages.

**Materials and methods.** We selected spontaneous mutants of topoisomerase IV resistant to 90–120 µg/ml of nalidixic acid, and determined the effectiveness of the titration of

phiX174 on mutant cultures. We have isolated and characterized clones of phages overcoming the decrease of virulent cycle efficiency by mutant topoisomerases IV.

**Results.** All checked NalR mutants of *E. coli* decreased the efficiency of titration phiX174 2–5 fold. Maximum 10-50 fold reduction of the efficiency by incubation with nalidixic acid was observed in the mutant NalR90-UVS. Mutant NalR90-UVS topoisomerase IV possessed following features: sensitivity to UV light, SOS-replication defect, and mutagenesis defect. High level of reduction of phiX174 virulent cycle frequency occurs only upon incubation with nalidixic acid. Phage mutants phiX174VR1 and phiX174VS2 typical for two options of selected attenuated mutants, were isolated on NalR90-UVS culture. The clone phiX174VR1 kept the rate of reproduction of the wild-type phage, unlike phiX174VS2, with reduced rate of reproduction, a fivefold reduction in size and modified morphology of plaques. Genome sequencing of attenuated mutants is in progress.

**Conclusion.** Mutations of NalR90-UVS in topoisomerase IV gene lead to attenuation of bacteriophage PhiX174, that occurs at high frequency. According to their properties, the attenuated phage mutants are divided into two classes, one of them has a reduced rate of reproduction and the modified morphology of phage plaques. The proposed model of attenuation of phage defective in cells with defective topoisomerase IV can be used for other ss-DNA viruses.

## Delusion by dilution: the novel mechanism modulating the adsorption of the bacteriophage in response to the lysing cells density

Strelkova D.M.<sup>1</sup>, Kulikov E.E.<sup>1</sup>, Tatarski E.V.<sup>1</sup>, Prokhorov N.S.<sup>1</sup>, Kostrukova E.S.<sup>2</sup>, Letarov A.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Winogradsky Institute of Microbiology RC "Fundamentals of Biotechnology" RAS, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FRC Physico-chemical medicine FMBA, Moscow, Russia

Bacteriophage Alt63 was isolated from the same sample of the horse feces than N4-like bacteriophage G7C. Been very closely related to phage G7C over the bulk of its genome phage Alt63 carries an alternative version of the receptor binding tail spike protein gp63.1. The primary receptor for both phages is an O-antigen. While bacteriophage G7C can grow only on the wild type *E. coli* 4s producing O-acetylated O-antigen, bacteriophage Alt63, can infect both 4s strain and non-its acetylated mutant *E. coli* 4sl. However the efficiency of plating (EOP) depends on adaptation of the phage to particular host. The 4sl – adapted phage (Alt63 4sl+) features greatly reduced EOP on 4s wt host ( $10^{-6}$ ), while 4s-adapted phage (Alt63 4s+) infects 4s strain with only moderately decrease EOP (0.1–0.5). In our work we confirmed using the whole genome sequencing method that a single a. a. substitution in 500 position of receptor binding protein gp63.1 is responsible for these phenotypes: Alt63 4sl+ corresponds to H500 and Alt63 4s+ corresponds to R500 genotypes.

Interestingly, Alt63 4sl+ phage had an unusual adsorption curve. A limited part of phages adsorb rapidly in first 2 min-

utes, while the large fraction of the phage remained free thus forming a plateau of the adsorption curve. Unlike the well-known “residual fraction” phenomenon described for many phages, the plateau of Alt63 4sl+ phage adsorption was unusually high consisting of 50% or more of the total phage count. Surprisingly, there was an inverse relation between the plateau level observed and the cell concentration used in the experiment. The more is the optical density of the cells, the lower plateau was observed but in any conditions the curve did level off after 2 min of incubation. Interestingly, the type of the curve as well as the level of the plateau seen in standardized conditions varied between different stocks of Alt63 4sl+ phage.

We demonstrated that the adsorption with plateau is not a result of presence of a distinct fraction of the phage particles featuring different adsorption properties from the rest of the population, but due to the existence of a significant time gap between reversible and non-reversible adsorption that leads to the formation of the equilibrium between free and cell-bound phage. Our data suggest that this effect is caused by the modification of the phage by some particles originating from the host debris. If the infected cells were diluted before the lysis thus reducing the exposure of the progeny phage to the cell debris, the resulting phage population demonstrated the adsorption without the plateau while the control lysate that was formed in non-diluted part of the infected cells suspension showed the plateau.

We speculate that this phenomenon may serve as a kind of a *post-mortem* quorum sensing helping the phage to adapt to the current ecological situation. If many cells are simultaneously lysed producing high concentration of the cellular debris, the phage may benefit from avoiding multiple infections of the scarce non-infected cells remaining in the proximity. Inhibiting of the irreversible adsorption would allow the virus to spread to larger distance. Alternatively, if low number of the cells died from the infection in the particular site this may be indicative for higher cell to phage ratio encouraging the phage to adsorb more efficiently to the nearest cells.

## Use of *Listeria* bacteriophages for indication and identification of *L. monocytogenes*

Suldina E.V., Vasilyev D. A., Zolotukhin S.N., Kovalyova E.N., Shcherbina A.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

Listeriosis is a food-born infection of high epidemiologic and epizootic significance. Scientific interest to listeriosis can be explained by both biological features of *Listeria* and by broad range of human food (including plant origin) eaten in raw form and being a potential source of infectious *Listeria*.

Nevertheless, detection and identification of *Listeria* is primarily based on bacteriological and serological techniques with pronounced negative factor, the duration of analysis. Thus, the development of more efficient and less time consuming methods of *Listeria* diagnostics is necessary.

Application of listeria bacteriophages partly solves this problem, due to the phage specificity essential for indication

and identification of *Listeria*. For this purpose, we have developed an optimal scheme of listeria bacteriophages isolation by induction, and studied the basic biological properties of the obtained phage isolates.

The optimal scheme of listeria bacteriophage isolation is UV induction from the lysogenic cultures. The best suited conditions were liquid alkalescent medium, exposure time – 30 seconds, and the distance to the source of radiation – 40 cm. Using this scheme, we have isolated 3 bacteriophages – *L.m* 1, *L.m* 2 and *L.m* 12 from the lysogenic strains *L.m*. № 766, *L.m*. № 9-130 and *L.m*. 1196, respectively, and examined their basic biological properties. Isolated bacteriophages have lytic activity in the range of  $10^{-6}$  to  $10^{-7}$  according to Appelmann method and from  $1 \times 10^6$  to  $2 \times 10^7$  phage particles in 1 ml according to Gratia method. Testing bacteriophages Lm 1 and Lm 2 infectivity on other bacterial genera (*Erysipelothrix*, *Jonesia*, *Staphylococcus*) and species of *Listeria* genus (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. murrayi*, *L. rayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*) have revealed that these phages lyse only bacteria of *L. monocytogenes* species. The range of the phage lytic activity was from 37.5% to 62.5% tested strains. Using this set of bacteriophages, we have typed up to 93% of the studied cultures. Thus, these phages can be applied to *L. monocytogenes* diagnostics.

---

## The sensitivity of clinical strains of *Staphylococcus* spp. to the polyvalent bacteriophage Sekstafag<sup>®</sup>

Sverkalova D.G., Karamysheva N.N., Shcherbina A.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

Due to widespread of the strains resistant to chemotherapeutic drugs in recent years, phage therapy methods are used increasingly. Today, the biotech industry produces a wide range of phage preparations, as exemplified by the polyvalent bacteriophage Sekstafag<sup>®</sup> FSUE “NPO “Microgen”.

In order to verify the clinical efficacy the determination of the sensitivity of the clinical strains to polyvalent phage Sekstafag<sup>®</sup> was conducted.

The objects of the study were five clinical strains of bacteria of *Staphylococcus* genus, isolated from the festering wounds, which were highly resistant to commonly used antibiotics. One of the strains was resistant to methicillin.

The strains were tested for sensitivity to polyvalent phage Sekstafag<sup>®</sup> using standard agar overlay method (A.Grati, 1936). As a result, the lytic activity of polyvalent bacteriophage Sekstafag<sup>®</sup> for four clinical strains was determined in a range from  $2,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$  to  $2,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$  PFU in  $1 \text{ cm}^3$ . The strain, resistant to methicillin, was also resistant to the polyvalent bacteriophage.

Based on the obtained results we concluded that the use of the polyvalent bacteriophage Sekstafag<sup>®</sup> can be effective against clinical strains of *Staphylococcus* spp., resistant to chemotherapeutic drugs.

## Isolation of MB-phages from environmental objects and biological material

Syrym N.S., Espembetov B.A.

Scientific Research Institute for Biological Safety Problems,  
Gvardeyskiy, Kazakhstan

Further development of farming, livestock growth and productivity increase, especially on organised large industrial farms, require scientific efforts for development new veterinary methods. One of the most promising approaches in such cases is the use of mycobacteriophages (MBphages). The aim of this work was isolation of MBphages from environmental and biological material for subsequent application for development of effective anti-tuberculosis treatment.

To perform this task we used samples obtained from environment of livestock buildings and biological material. As the test culture, *Mycobacterium tuberculosis* were used. For cultivation of MBphages, we used Dubos Broth Base and Dubos Oleic Agar Base nutrient media. In the beginning of the experiment we selected and flayed test mycobacterial culture to enrich and verify the specificity of the lytic action in the isolation of MBphage.

Experimental studies of the isolation of MBphage, active against *Mycobacterium tuberculosis*, was conducted on 33600 samples collected from various regions of Kazakhstan, including biological material from the cattle – 1682 and the samples from the environmental objects – 1678.

Experiments on MBphages isolation were conducted by two methods:

The 1<sup>st</sup> method – analysed materials after appropriate preparation were passed through the sterilisation filters CN – 115 ml 0,2 µ; 150 ml 0,45µm; 150 ml 0,8µ.

The 2<sup>nd</sup> method – analysed materials were incubated in nutrient medium for 1.5–2 months with weekly enrichment with a dense suspension of test *Mycobacterium* cultures and then the obtained mixtures were filtered as mentioned above, and subsequently tested for the presence of MBphages in filtrates. As a result, the method enables us to isolate 24 MBphages that lysed atypical mycobacteria from the objects of environment from different regions.

## Bacteriophages specific to *Stenotrophomonas maltophilia*

Tikunov A.J., Kozlova J.N., Morozova V.V., Kretien S.O., Saranina I.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V.

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

*Stenotrophomonas maltophilia* is an abundant free-living bacterium that belongs to the *Xanthomonadaceae* family. In some cases, it causes hospital infections, especially intensive care unit patients – pneumonia, urinary tract infections, wound infections, peritonitis, cholangitis, meningitis, septicemia, endocarditis. *S. maltophilia* is multiresistant to antibiotics due to low permeability of its outer membrane, and induced synthesis

of beta-lactamases, that severely limits the possibility of effective antimicrobial therapy. Bacteriophage preparations can be used both separately and in combination with antibiotic therapy as the antibacterial agent against *S. maltophilia*. Among commercial preparations of bacteriophages permitted for using in Russian Federation, bacteriophages having lytic activity against *S. maltophilia*, are not available. The purpose of the work is the selection and investigation of bacteriophages specific to *S. maltophilia*.

On the first stage we used ten strains of *S. maltophilia* isolated from clinical samples obtained from patients with paraprosthetic infection. Taxonomic affiliation of strains was confirmed by sequencing of 16S rRNA gene. All of these strains were resistant to carbapenems, monobactams, nitrofurans, cephalosporins; four strains were also resistant to ticarcillin/clavulanate and co-trimoxazole.

Totally seven bacteriophages specific to *S. maltophilia* were isolated from clinical samples, and the lytic properties of bacteriophages were investigated. Two of seven bacteriophages, SM4 and SM5, demonstrated broad spectrum of lytic activity against strains of *S. maltophilia*. For SM4 bacteriophage, which has a high lytic activity, the full-genome sequencing was conducted. The size of the genome of SM4 was 42682 bp. and the closest homologous phage sequence, deposited in the GenBank database, is bacteriophage vB\_Pae\_PS9N [KM434185].

## Bacteriophages specific to *Acinetobacter* spp.

Tikunova N.V., Kozlova J.N., Morozova V.V., Vlasov V.V.

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

Bacteria of *Acinetobacter* genus are the free-living saprophytic gram-negative bacteria that belong to the *Moraxellaceae* family. *Acinetobacteria* may be the causative agents of nosocomial infections and due to their natural multiple resistance to antibiotics these pathogens are a serious problem in clinical practice. As an alternative to antibiotics or in combination with them, bacteriophage preparations can be used against the bacteria of *Acinetobacter* genus. However none of the commercial phage preparations approved for clinical use in Russia, has lytic activity against *Actinobacter*. The aim of this work was to isolate and characterize the bacteriophages specific *Acinetobacter* genus.

The species identification of *Acinetobacter* strains isolated from clinical samples was performed on the base of 16S rRNA genes sequencing using the NCBI GenBank database. The analysis of clinical samples identified 16 strains belonging to *A. baumannii/calcoaceticus* complex, 4 strains of *A. junii* and 2 strains *A. pittii*. *A. junii* and *A. pittii* were found to be sensitive to all tested antibiotics. Seven strains of *A. baumannii/calcoaceticus* complex were resistant to ten or more antibiotics. Furthermore, 5 bacteriophages specific to *Acinetobacteria* were isolated from clinical specimens. All phages were specific only to the strains of *A. baumannii/calcoaceticus* complex. Three of them had a wide spectrum of activity, and two bacte-

riophages were narrowly specific phages. Full-genome sequences of isolated bacteriophages have been obtained and analyzed. Most of the antibiotic resistant strains of *A. baumannii/calcoaceticus* complex were sensitive to bacteriophages.

## Influence of phage preparations on formation of biofilms

Tolordava E.R., Romanova Yu.M.

N.F.Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

One of the actual problems of contemporary medicine is chronic infections, frequently linked to the formation of bacterial biofilms by pathogenic bacteria. Therefore currently the treatment of chronic infections cannot be based on the traditional concept of microbiology. New concepts of biofilms require changes in approaches to the diagnosis and treatment of infections in many different areas of medicine. Due to the problems of multiple resistance of pathogens to antibiotics the interest to the possibilities of therapeutic use of bacteriophages rised again in the recent years.

We studied the influence of well-known commercial phage preparations "Sekstafag" and "Bacteriophage coli-proteus" on the formation of biofilms by the clinical isolate of *Escherichia coli*, isolated from the urinary stones. The chosen clinical isolate was sensitive to phage preparation "Bacteriophage coli-proteus" and at the same time resistant to the "Sekstafag" preparation.

As a result of these investigations the dependence of the formation of biofilm on the amount of added phage was revealed. It was found that the bacteriophage preparation "Bacteriophage coli-proteus" applied in a concentration lower than  $10^3$  PFU/ml stimulated the formation of *Escherichia coli* biofilm in comparison with the control without the phage. Furthermore, the formation of biofilm was also stimulated by the "Sekstafag" phage preparation to which the examined bacterial isolate is resistant.

Due to the fact that the formation of biofilms by pathogenic bacteria is one of the main causes of the formation of chronic foci of infection, it is necessary to pay close attention to the dose selection while applying the phage preparation. We have shown that regardless of the sensitivity or the resistance of the tested microorganism to phage preparations, the application of the phage in low concentrations can substantially stimulate the formation of biofilms.

## Development of a scheme for phagotyping of *Bacillus anthracis* strains

Tsygankova O.I., Golovinskaya T.M.

Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russia

Susceptibility of *B. anthracis* strains to the lytic action of various specific anthrax bacteriophages underpins one of the major tests of identification. It depends on both biological prop-

erties of phages, and the individual characteristics of *B. anthracis* strains. General phage typing scheme for studying *B. anthracis* strains is not designed as of yet

The aim of this project was the selection of a minimum set of specific bacteriophages for the simultaneous identification of anthrax strains, and identification of differences in phage sensitivity.

For this purpose, the spectrum of lytic activity of anthrax bacteriophage Fah – VNIIVVM, R/D-Ph-6, Gamma A-26, BA-9, Saratov, K VIEV, and 186 with respect to 114 *B. anthracis* strains was studied.

Analysis of the results allows to divide listed bacteriophages into two groups according to the width of their range: 1 – Gamma bacteriophages A-26, BA-9, R/D-Ph-6 lysing 99.1% of *B. anthracis* strains; 2 – 186, Fah-VNIIVVM, K VIEV, Saratov lysing 59.6–65.8% of the same strain set.

Accordingly, it seems optimal to select and simultaneously use bacteriophages with different lytic range. One phage should lyse all cultures of *B. anthracis* and provide reliable identification test of anthrax strains. Other phages should display selectivity in the lytic activity to the part of strains with similar properties, and to be markers of this difference. Typical representatives of the two groups of bacteriophages Gamma A-26 and 186 were selected for phage typing of anthrax strains. Sensitivity of examined strains to at least one of them should be considered as positive test of identification. Depending on susceptibility to both bacteriophages or one of them, three phage typing classes are determined:

- Phage type 1 – the culture is sensitive to both bacteriophages;
- Phage type 2 – the culture is sensitive only to the Gamma bacteriophage A-26;
- Phage type 3 – the culture is sensitive only to the bacteriophage 186.

While phage typing of 114 *B. anthracis* strains using the mentioned method the identification test was positive for all strains, 74.6% belonged to phage type 1, 24.5% belonged to phage type 1 and 0.9% belonged to phage type 1 of the examined strains. The most typical are the strains that belong to phage type 1. Strains of phage types 2 and 3 are interesting for the comprehensive study of their phenotypic properties.

## Biological properties of phagoresistant variants of *Bacillus anthracis* 44/1 strain with disturbance in spore germination in an atmosphere with a high content of CO<sub>2</sub>

Tsygankova O.I., Koteneva E.A., Golovinskaya T.M.

Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Stavropol, Russia

The sensitivity of *B. anthracis* to specific anthrax bacteriophages, as well as strain phenotypic characteristics, are variable. Investigation of variants of *B. anthracis* strain 44/1, resistant to bacteriophages Gamma A-26, W-9, K VIEV

yielded 11 *B. anthracis* strain 44/1 variants resistant to bacteriophage K VIEV, and spores of 9 of them were unable to grow in an atmosphere of increased CO<sub>2</sub> content on a whey-soda agar.

Three white mice in series were infected subcutaneously with spores of *B. anthracis* 44/1 variants, RK1 and RK4 (dose 10<sup>3</sup>). No animals died and no bacteria isolated from tissues in case of *B. anthracis* 44/1 RK4. *B. anthracis* variant 44/1 RK1 also did not cause the death of animals, but from one of the mice, killed after 10 days, the culture was isolated from the injection site, and spores of this culture were used for subsequent infecting. In two following passages, the infection dose was increased up to 5 × 10<sup>7</sup> spores. Animals died in 2–6 days, and at the third passage, one of them were killed in 10 days after infecting. The cultures were isolated from all animals, mainly from the injection site. All variants of *B. anthracis* 44/1 RK1 strain did not grow on whey-bicarbonate agar in the incubation atmosphere containing 50% CO<sub>2</sub> while plating as spores. The vegetative culture at these conditions showed the weak growth except for 2 variants found in third passaging, that grew well in capsule form. After intraperitoneal infection of white mice with a dose of 2 × 10<sup>7</sup> spores of *B. anthracis* 44/1 RK1, there was no vegetative culture neither within phagocytes nor outside the cells in smears from the abdominal cavity of animals killed in 2,3,6 and 24 hours after infecting.

Considering that all strains of *B. anthracis* 44/1 were isolated based resistance to phage K VIEV, we have tested the ability of 6 other strains of *B. anthracis*: 71/12, 228, 1035/51, 81/1, 14/41, 1173, 1174, 12/16, to grow at high CO<sub>2</sub> content. No strains demonstrating the same properties were detected. Probably, in the studied population of *B. anthracis* 44/1 variants with these properties were present in significant concentration. This observation allowed to isolate 9 cultures simultaneously, but the combination of sensitivity to high concentrations of CO<sub>2</sub> with the resistance to phage K VIEV was accidental.

### **Microbiological monitoring of the *Staphylococcus* sensitivity to bacteriophages**

Vasilieva E.I., Kostyuk E.A.

Scientific Clinical Center of JSC «Russian Railways»,  
Moscow, Russia

Widespread and often uncontrolled use of antibacterial drugs in medical practices has created a serious problem of multi-drug resistant bacteria associated with inflammatory diseases of different localization. The most known example is the increase in the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococci* (MRSA). As an alternative to the antibiotic therapy the use of bacteriophages to treat a variety of urologic, wound and other infections caused by bacteria of the genus *Staphylococcus* may be considered. We analyzed the results of microbiological testing of 5584 samples where the growth of *Staphylococcus* spp. was detected. Among *Staphylococcus* strains isolated from eyes (778), from the

upper (1420) and lower respiratory tract (376), from urine (1227), sperm (696), gynaecological smears (420), wounds and other surgical material (667), *S. aureus* was found in 32% of cases. Among these isolates 12% were MRSA. *S. epidermidis* was isolated from 40%, *Staph. haemolyticus* from 28% of the samples. The percentage of MRSA among *S. epidermidis* was 35% and *S. haemolyticus* – 32%. Susceptibility of staphylococci isolated from 82 patients to mono- and combined (pyo- and intesti-) bacteriophages was studied. Pyo- and intesti- bacteriophage had the greatest antistaphylococcal activity. 88 and 80% of *S. aureus*, 42 and 37% of *S. haemolyticus*, 25% and 21% of *S. epidermidis*, respectively, were sensitive to these bacteriophages. 77% of *S. aureus* strains, 33% of *S. haemolyticus* strains and only 13% of *S. epidermidis* strains were sensitive to the staphylococcal bacteriophage. MRSA and MRS *Staphylococcus* were sensitive to the studied bacteriophage preparations in 25% of cases.

---

### **Isolation of *Bordetella bronchiseptica* bacteriophages**

Vasilyeva Yu.B., Vasilyev D. A., Mastilenko A.V., Semanina E.N., Lomakin A.A., Pronin K.N., Zolotukhin S.N., Shcherbina A.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

From the 1980s Russian and foreign researchers attempt to isolate phages infecting *Bordetella* genus. In 2013 a group of US researchers developed a technique of phage isolation for different phages of *B. bronchiseptica* (virulent BVG+ and avirulent BVG-).

No other detailed description of the techniques for isolation of *Bordetella* phages, except for the mention about induction of *B. bronchiseptica* prophages by repeated UV (Liu, 2004). Due to the actuality of the problems the aim of our study was the development of a scheme for induction and isolation of *B. bronchiseptica* phages.

The objects of research were reference strains *B. bronchiseptica* №1, №7, №214, №22-067, №8344 (from the Museum of the department of microbiology, virology, epidemiology and veterinary-sanitary examination of Ulyanovsk State Agricultural Academy), that according to the passport data, possessed morphological, cultural and biochemical properties typical for this bacterial species. In the course of work we used conventional microbiological methods for isolating, identifying and indicating bacteria, and appropriate media and reagents.

During the experimental work, we have isolated 6 phages inducing 5 laboratory strains of *B. bronchiseptica* by ultraviolet irradiation.

The optimised scheme of bacteriophage isolation includes a 3-day exposure using ultraviolet radiation on a daily culture *B. bronchiseptica* using different options of distance to the lamp (l) and the exposure time (t): Day 1: t = 5–7 min; l = 1 m. Day 2: t = 7–10 min; l = 1 m. Day 3: t = 7–10 min; l = 0.5 m. Then the washout of growing up colonies out of Petri dishes was conducted using meat-broth, and it was placed into the

tube containing *Bordetella* strains. The cultivating was processed in an incubator. On the 5<sup>th</sup> day the treatment with chloroform 1:10 to phage lysate was carried out for 15 minutes, and the centrifugation at 3000 rpm for 15 min, and then removing the fluid to a sterile tube. The next day, the presence of bacteriophage is determined by the presence of the lysis zones. After isolating bacteriophages must be passaged to increase their lytic activity.

We consider it to be promising to further select the isolated phages to construct diagnostic and therapeutic and prophylactic biological products.

## Personalised phagotherapy of infected trophic ulcers on the background of diabetes

Vlasov V.V.<sup>1</sup>, Ganichev D.A.<sup>2</sup>, Kozlova J.N.<sup>1</sup>, Morozova V.V.<sup>1</sup>, Saranina I.V.<sup>1</sup>, Tikunova N.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia;

<sup>2</sup>Road Clinical Hospital of r.s. Novosibirsk-Main of JSC "Russian Railways", Novosibirsk, Russia

Personalised phage therapy involves the use of patient-oriented application of bacteriophage preparations. The microorganisms isolated from a patient are tested for the sensitivity to various bacteriophage preparations and the one that shows the best antibacterial effect is used for the treatment. Using the personalized phage therapy is very important in treatment of patients with infected trophic ulcers because such patients are often infected with micro-organisms that have multiple resistant to antibiotics.

This study involved 34 patients who were admitted to the hospital with trophic ulcers on the background of diabetes. The samples were taken from the infected trophic ulcers and the microorganisms were isolated. The mixed bacterial infections (*Staphylococcus* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, etc...) were identified in 16 patients, the mono-infections were identified in 16 patients, one sample contained fungal mono infection, and in the samples of two patients no microorganisms were found. Isolated microorganisms were tested for the sensitivity to antibiotics and to various bacteriophage preparations. If the sensitivity to bacteriophages was revealed the phage therapy was conducted by the method applications for 5–7 days.

The phage therapy was applied in 23 cases: out of 13 patients with mono infections, eight were infected with *Staphylococcus aureus* (three methicillin-resistant strains), three patients – *Pseudomonas aeruginosa* and two patients – *Escherichia coli*. After the phage therapy the infectious agent completely disappeared in the control swabs (*S. aureus* and *E. coli*) or a decrease of the titer by 3–4 orders of magnitude was observed (*P. aeruginosa*). Among 10 patients with mixed infection, only in five all the pathogens were sensitive to the bacteriophages. In four of them a positive result of treatment was obtained and only one patient phage therapy had no effect. Complex mixed infections – 3 or more infectious agents

with only 1–2 of them sensitive to bacteriophages – were observed in the remaining five cases. In these cases the use of the bacteriophage led to the disappearance of the phage sensitive strains while the others remained. Thus the use of personalised phage therapy had a positive effect in 100% (13/13) cases of mono infections and in 40% (4/10) cases of mixed infections.

## Genomics and properties of bacteriophage PP90 infecting potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*

Vo Thi Ngoc Ha<sup>1</sup>, Kabanova A.P.<sup>1,2</sup>, Shneider M.M.<sup>2</sup>, Sykilinda N.N.<sup>2</sup>, Kulikov E.E.<sup>3</sup>, Karandashov V.E.<sup>1</sup>, Toschakov S.V.<sup>4</sup>, Ignatov A.N.<sup>1</sup>, Miroshnikov K.A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>PhytoEngineering R&D Center Rogachevo Moscow Region, Russia;

<sup>2</sup>Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Winogradsky Institute of Microbiology RAS, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

*Pectobacterium atrosepticum* is a highly virulent potato pathogen causing soft rot and black leg diseases. Despite this bacterium is comparatively rare in Russia, local outbreaks cause significant economic losses in potato production. Therefore, appropriate diagnostics and selection of potential biologic antagonists are essential for plant disease control. Very few information exists on *P. atrosepticum* bacteriophages, so isolation and characterization of such viruses is important for the formation of collections of specific biocontrol agents.

*P. atrosepticum* phage PP90 was isolated from potato pathogenic material in Moscow region in 2014 using strain PB72 found in European Russia. PP90 has fast infection cycle, and forms small plaques surrounded with semi-transparent halo. Transmission electron microscopy reveals icosahedral virion morphology with a short tail (*Podoviridae*). According to ICTV proposal the phage may be officially named vB\_Pat\_PP90. Infection range of PP90 is currently limited by its host strain. Other tested *P. atrosepticum* strains, as well as *Enterobacteriaceae* potato pathogens *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya* spp. are resistant to this phage.

Sequenced linear DNA genome of PP90 consists of 44570 bp encoding 56 open reading frames and no tRNAs. The closest relative to this phage is the only known *P. atrosepticum* phage Peat1 with 89% homology. The order of gene cascades in the genome and similarities between major proteins (DNA polymerase, capsid protein, connector) suggest PP90 to be a member of KP34-like genus, which includes mostly *Klebsiella pneumoniae* phages. The only major genome difference between PP90 and Peat1/other KP34-like phages is located in ORF56 encoding a tail spike protein with proposed polysaccharide-degrading activity. This difference indicates the exopolysaccharide as primary receptor for PP90 adsorption, and explains the narrow host range.

## **Podoviruses with polysaccharide depolymerase activity that infect hypervirulent hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*: isolation, comparative genome analysis and effectiveness in mouse models**

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

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

In crisis of antibiotic therapy alternative approaches to combat bacterial infections are required. One of the approaches allowing prevention and cure of infections implies use of bacteriophages, viruses infecting exclusively bacterial cells.

In the present study, we examined the medical-prophylactic efficiency of bacteriophage VB\_KpnP\_KpV289 using three models of *Klebsiella* lethal infection induced in outbred mice (sepsis, acute pulmonary infection and hip infection). To induce *Klebsiella*-associated sepsis mice were subcutaneously infected with culture of highly virulent hypermucoviscous *K. pneumoniae* strain KPM9 at dose of  $1 \times 10^4$  CFU (200 LD50). The procedure allowed dissemination of the pathogen in the animal body in the first day. The animals died between the 2<sup>nd</sup> and 7<sup>th</sup> day after infection. The pulmonary infection was induced via intranasal instillation of KPM9 culture at  $2.5 \times 10^5$  CFU (150 LD50). In this case *K. pneumoniae* bacteria entered the lungs, blood, and the liver and spleen of infected mice in 3 and 6 hours, and overnight, respectively. The animals (at least 90%) died from day 3 to day 10 after challenge. Soft tissue inflammation of animal hips followed by infection generalization was induced by injecting i/m KPM9 culture at  $4 \times 10^3$  CFU (100 LD50), with the mortality rate being of 90–100 %.

It is shown that a single intraperitoneal or subcutaneous injection of the bacteriophage ( $5 \times 10^{7-2} \times 10^8$  PFU) an hour before the challenge provides the survival of the animals in 80% (pulmonary infection), 90 % (hip infection) and 100% (sepsis) of cases. The complete elimination of the pathogen is observed in all survived animals. In the phage therapy initiated 3 hours after challenge (twice a day for 5 days) the animals survive in 100% of all cases. In therapy delayed for 24 hours the survival rate of animals is 50% for sepsis, 90% for lung infection, and only 10% for soft tissue inflammation of the hip followed by infection generalization.

The results of the present study bear out the potential of bacteriophages as an alternate preventive approach to treat *K. pneumoniae*-induced infections of different localization.

*The research was supported by the Russian Science Foundation [Grant # 15-15-00058].*

## **Prophages as a part of genomes of microorganisms infecting mammals, as a sign of the bacterial adaptation to the host organism**

**Voronina O.L., Kunda M.S., Sharapova N.E., Aksanova E.I., Ryzhova N.N., Semenov A.N., Gintsburg A.L.**

*N.F.Gamaleya Federal Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia*

Studying the genomes of microbes with medical significance enabled us to identify significant differences in prophage-encoding regions in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Comparison of prophages in microorganisms of 3 taxonomic groups: *Listeria monocytogenes* (L.mon), *Mycobacterium bovis* (M.bov), *Achromobacter ruhlandii* (A.ruh), isolated from the environment and from clinical specimen, was the purpose of this work.

Strains L. mon VIM007, VIM081, M. bov BCG Russia 368, A. ruh SCCH3: Ach33-1365 were sequenced by 454 Roche technology. The following resources were used for genome annotation and analysis. Genotype (ST, sequence type) was determined using MLST (Multilocus sequence typing), and IP (internalin gene profile) according to Adgamov, 2012.

Strains L. mon from different ST contain conservative prophage 22,9 kb in a genome. The number and composition of additional prophages of strains isolated from clinical material, even having identical ST and IP, differ. Conservative prophage 7,5 kb is abundant in wild-type strains M. bov, as well as in early and late substrains M. bov BCG. However, the second prophage of wild-type strain was replaced by a smaller size one in of early substrains BCG, and totally in late substrains. Influence of cultivating conditions on the prophage profile is reflected by genomes of substrains BCG Montreal and BCG Tice that include 7 and 15 other prophages, respectively. Strains A. ruh of different ST, isolated both from patients with cystic fibrosis and from the bull suffering of respiratory disease, contained conservative prophage 13,7–18,9 kb as a part of the genome. At the same time, strains of the same ST, obtained from patients from different continents, were different in quantity and composition of additional prophages. However, strains isolated in similar geographic areas, even having differences in ST, had an additional common prophage.

Prophage taxonomy of gram-positive bacteria is monosemantic. All strains of L. mon prophage belong to *Caudovirales ordo, Siphoviridae family*; but the prophage taxonomy of gram-negative bacteria is complex: as for the A. ruh, only the general prophage relates to this family; the others contain ORFs, homologous to phages referring both to families *Myoviridae, Podoviridae* as well as other ordines, for example, *Herpesvirales* and other familiae of the Group I: *Phycodnaviridae, Ascoviridae*.

Thus the set and the composition of prophages in the bacterial genome may serve as an indicator of the pathogenicity of the strain.

## New preparations of bacteriophages – highly effective and safe agents of antibacterial therapy and prophylaxis

Voroshilova N.N., Kazakova T.B., Bogovazova G.G., Alferova E.V., Usmanova S.S., Polygach O.A.

FSUE "NPO "Microgen" of the Russian Ministry of health

The increasing polyresistance septic pathogens and enteric diseases to antibiotics and a large number of adverse reactions to their application led to the need to develop preparations of bacteriophages. We were selected highly virulent lytic bacteriophages *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K.pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *C diphtheriae*, *Y. enterocolitica*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. odoriferae*, *Hafnia alvei*, *E. aerogenes*, *E cloacae*, studied their biological properties, the spectrum of antibacterial activity, patterns of reproduction processes are developed based on these novel pharmaceutical compositions and dosage forms of polyclonal drugs studied pharmacodynamics, the reactogenicity, immunostimulating and antibacterial activity, clinical efficacy in the treatment of localized forms of diseases and sepsis.

Scientifically substantiated and developed the universal regularities in their production technology bacteriophages preparations, which are protected 11 patents of Russia, including the use of highly productive the methods for producing biomass bacteriophages, new methods of the barometric separation for purification of bacteriophages from bacterial cells and their toxins, allowing, in comparison with traditional technologies, to increase by 10–100 times the yield of biomass bacteriophages by culturing and purification, to increase the concentration of bacteriophages in preparations at 30–900 million in 1 ml, and also ensure high antibacterial (85–99,6%) and clinical (85–100%) efficacy of preparations, absence of toxic and allergic reactions to their application, that enables to consider new preparations of bacteriophages as alternatives antibiotics and highly safest antibacterial agent the therapy and prophylaxis.

## The impact of phage resistance on the sensitivity of the mathematical model of the intestinal biocenosis state

Zatevalov A.M., Selkova E.P., Aleshkin A.V., Gudova N.V., Gusarova M.P., Zatevalova E.A.

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

**Objectives.** To evaluate the sensitivity of artificial neuronal networks of the state of intestine microbiocenosis using concentrations of microorganisms in the faeces with regard to microorganisms sensitive to bacteriophages and without. To compare correct classification rates in groups with varying degrees of microbiological disorders and in group with violations of enzymatic digestion.

**Results.** In this work the data of bacteriological and scatological analysis of 2357 patients' faeces receiving from outpatient of consultative diagnostic center at G.N.Gabrichhevsky

Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology consultations were processed. The results of bacteriological analysis were evaluated by an expert and the grades of microbiological disturbances from normal to the 3rd degree of the disorder were ascribed. The parameter of microbiological disorder degree was used to group the data of the bacteriological analysis in two artificial neural networks. In the first one the rounded values of the logarithms of the microorganisms concentrations in the fecal samples were used. In the second artificial neural network also the rounded values of the logarithms of microorganism concentrations were used, but the number of microorganisms was increased by splitting the phage sensitive and phage resistant microorganisms in separate groups. The sensitivity of hemolysin producing *E. coli* and *Proteus* to *coliproteus* bacteriophage, the sensitivity of *Enterococcus* to streptococcal ones, the sensitivity of *Klebsiella* to a *Klebsiella* bacteriophage and the sensitivity of *Staphylococcus* to the staphylococcal ones were taken into account. In the second part of the work, we also investigated two artificial neural networks with regard to microorganisms sensitive to bacteriophages and without, but for the grouping of the samples we used the data of scatological analysis processed by the algorithm of determination scatological syndrome. 508 results of bacteriological analyses with the signs of normal scatological syndrome, steatorrhea and amylorrhea were processed. The comparisons of the mean values of correct classification showed that for the use of bacteriophage sensitivity as a criterion increases the proportion of correct classification for the degrees of microbiological disorders from 97.25 to 98.05%, and for the types of scatological syndrome from 42.7 to 50.7%.

### Conclusions:

1. Taking into account the parameter of the microorganisms sensitivity to corresponding bacteriophages increases the sensitivity of the mathematical modeling.
2. The increase of the sensitivity is more pronounced if the indicators for the scatological syndrome is used for the grouping of the data.

## Phage-resistance of opportunistic bacteria in the microbial landscape of individuals suffering from intestinal dysbiosis

Zavgorodnyaya E.F.

Khabarovsk Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Khabarovsk, Russia

Bacteriophages are increasingly used not only for prevention and treatment of acute intestinal infections, but also to treat septic pathology in surgical, gynecological, urological hospitals, and in recent years – for the correction of the intestinal microbiota, etc. Nevertheless, studies on the growing isolation of opportunistic bacteria that are resistant to bacteriophages periodically appear.

**Objective:** to study the prevalence of opportunistic bacteria strains resistant to commercial bacteriophage preparations of Russian production among people with intestinal dysbiosis.

**Materials and Methods:** 1197 opportunistic bacterial strains isolated from the large intestinal content of citizens

of the city of Khabarovsk in course of the study of the intestinal microbiota (2014-2016.), including 382 *S. aureus* strains, 276 – *Klebsiella pneumoniae*, 141 – *Klebsiella oxytoca*, 33 – *Proteus vulgaris*, 37 – *Proteus mirabilis*, 131 – *E. coli* hemolytic (hem+), 197 – of *E. coli* lactose-negative (lac-). Analysis of microbiota and evaluation of results were carried out according to standard procedure and the identification of strains – according to classical methods. Some of the strains were identified using automated bacteriological analyzer Vitek-2 "Compact 30". Lytic activity of specific bacteriophages was studied by the spot-test method. We used staphylococcal and *Klebsiella pneumonia* (production of "Microgen", Perm, Russia) monophages, as well as polyvalent coliform-proteus bacteriophage (production of "Microgen", Nizhniy Novgorod).

**Results and Discussion:** among the studied strains a high prevalence (46.2%) of phage-resistant isolates was detected. The highest percentage of phage-resistant strains was found among the strains of following bacterial species: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* and *Klebsiella pneumoniae* (89.2; 78.0; 72.7 and 69.2% respectively); compared to the previous year the proportion of phage-resistant strains significantly increased among *E. coli* (hem+) and *E. coli* (lac-) strains – 42.7 and 37.6%, respectively, and decreased to 17.0% among *S. aureus* strains. The phage-resistant strains of opportunistic bacteria are often found in microbial or fungal-microbial associations. This is especially characteristic for *S. aureus* and *E. coli* (hem+) strains among which the prevalence of the phage resistant isolates was 4 and 2 times (respectively) higher for the strains obtained from the associations compared to the isolates from the mono infections ( $p < 0.01$ ). It should also be noted that probably the prolonged circulation of phage-resistant strains in microbiota extends the duration of the individual dysbiotic cases. One possible reason for the high level of phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains that began to be registered in our region since 2014 was the change of the dominant strain. Another possible reason may be a small coverage or even the absence of Far East region strains in the phage production.

Conclusion. The isolation of phage-resistant strains of opportunistic bacteria continues to increase in our region and for today their prevalence reached 46.2%, with the highest levels among *Proteus* and *Klebsiella*, and the lowest – among *S. aureus*. We consider it to be important to draw the attention of phage production companies to the necessity of inclusion of Far East region pathogen strains in the bacteriophage production processes.

---

## Application of bacteriophages in veterinary medicine

Zolotukhin S.

*Ulyanovsk State Agricultural Academy, department of microbiology, virology, epizootiology and veterinary-sanitary examination, Ulyanovsk, Russia*

The scope of practical application of bacteriophages in many social and economic sectors of the Russian Federation has recently been widened.

Unfortunately, the biological industry of our country does not produce bacteriophages for the needs of veterinary medicine on a large scale, although there is an enormous amount of factual material and positive examples of their application in veterinary practice.

The application of bacteriophages for treatment and prevention of infectious diseases of animals and birds has almost a century of history. The phages were for the first time applied for the treatment of salmonellosis chickens (pullorosis and fever) by a French researcher d'Herelle in 1928 and in 1935. In 1957 Kvesitadze used bacteriophages for the treatment of salmonellosis calves. In 1949 Sherstobaev, a soviet scientist, applied bacteriophages for prophylaxis and treatment of escherichiosis piglets.

The gradual fading of the interest in bacteriophages as therapeutic and prophylactic products in the middle of the last century was caused by the discovery of antibiotics, and only a few laboratories and centers continued to work on the release of new phages and to study the possibility of their practical application. One of such centers is the department of microbiology, virology, epizootiology and veterinary-sanitary examination at Ulyanovsk State Agricultural Academy.

The new interest in bacteriophages was raised with the emergence of multidrug resistance of pathogenic microorganisms to one, two or more antimicrobial agents, as well as with a negative influence of antibiotics on the organism of animals and humans.

Nowadays bacteriophages have shown high efficiency in the fight against infectious diarrhea of bacterial etiology in young animals and birds. The authors point out the highest efficiency of phage prophylaxis in comparison with phage therapy.

There are some published data on the use of bacteriophages in the treatment of mastitis, endometritis, the prevention of postoperative purulent complications of different animal species.

Using the fact that bacteriophages have a narrower spectrum of activity compared with antibiotics, many authors have applied polyvalent phage drugs.

Another promising direction of the practical application of bacteriophages in veterinary medicine is the indication and the identification of pathogens in the pathological and biological material, feed, food and raw materials as well as in other environmental objects.

Currently the schemes and the methods of phage prophylaxis and phage identification of pathogens for many diseases (pathogenic enterobacteria, pseudomonas, bacilli, enterococci, etc.) of mammals, birds and fish have been developed and tested. The authors demonstrated that these methods have a great quantity of advantages over the bacteriological methods: they are less labor intensive, they require less time, reagents and utensil.

For the successful implementation of bacteriophages in veterinary practice the production and testing of medical diagnostic and preventive biological products on a larger scale is necessary.

## Development of parameters of the accelerated identification of *Y. pseudotuberculosis* bacteria by means of indicator bacteriophages

Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

Given the strict genus specificity of selected bacteriophages *Yersinia pseudotuberculosis*, we developed a scheme for the isolation and quick identification of the bacterium *Y. pseudotuberculosis*. In our work we used water, food raw materials, animal feed, and non-sterilized faeces, contaminated with *Y. pseudotuberculosis* at the concentrations of  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  and  $10^1$  microbial cells in 1 ml.

The samples were subjected to a bacteriological analysis for isolation of *Y. pseudotuberculosis* using a standard procedure (the incubation of the material in the enrichment medium, inoculation of selective media, etc.). The Gram-stained smears from primary broth cultures obtained after from the colonies typical for *Yersinia* were analyzed. In case of presence of small gram-negative rods with rounded ends, not forming spores and capsules, the isolated cultures were identified using the bacteriological method and with the help of *Yersinia pseudotuberculosis* bacteriophages by the method of flowing drop.

The presence of a clear zone of lysis with the secondary growth of phage-resistant microorganisms or without it as well as the growth of phage plaques on the lawn of particular culture at the place of application of at least one of two phages indicates that the examined strain belongs to the species *Y. pseudotuberculosis*. The absence of any lysis signs on the lawn was interpreted as a negative result.

As a result of the conducted researches it was established that the concentration of infecting the target bacteria below  $10^3$  microbial cells in 1 ml prevents its isolation of bacteria from the environmental samples, in case faeces analysis the sensitivity of the bacteriological method is drops down to  $10^5$  microbial cells in 1 ml due to their heavy contamination by the accompanying microflora. In all cases the results of phage identification of the isolated strains of the bacterium *Y. pseudotuberculosis* were confirmed by the biochemical profiling of the isolated cultures.

Experimental data confirm the possibility of identification of bacteria of the species *Yersinia pseudotuberculosis* using indicator *Yersinia pseudotuberculosis* phages, with the analysis time reduced from 4 to 2 days compared to the standars bacteriological protocol with reduced material consumption.

## Selection of bacteriophages for indication of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* by phage amplification assay (PAA)

Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

Yersiniosis is the group of infections caused by the bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*.

Currently the laboratory diagnosis of yersiniosis is based on bacteriological method, gene diagnostic methods (PCR) and different variants of ELISA including immunoblot methods. The bacteriological method includes isolation of the pure pathogen culture from the sample and its identification using conventional biochemical tests. A typical bacteria isolation scheme for the *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* species includes several steps: incubation of the material in the enrichment medium (cold enrichment), plating on the solid selective medium, the identification of the biochemical properties of the isolated cultures. For the maximum efficiency of this method the sampling should be performed within certain time from onset of the disease symptoms that is associated with biological characteristics of pathogens. This fact limits the applicability of the classical bacteriological method for yesrisniosis diagnostics.

Several indicator bacteriophages were proposed for the use in clinical practice for the rapid detection and identification *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* as well as for detection of these organisms in the objects of the sanitary surveillance. We isolated phages that are active against bacterial species. We found that the isolated bacteriophages have a high lytic activity (not less than  $10^{-8}$  by Appelmans method and  $10^9$ – $10^{10}$  by Gratia titration method), a broad spectrum of lytic activity and are highly specific. These phages can be used for rapid indication and identification of *Yersinia* by the phage amplification assay (PAA). Using this method we were able to detect in the test substrate *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* bacteria at the concentration of  $10^3$  microbial cells/cm<sup>3</sup> within 19–22 hours.

The obtained experimental data allow recommending the reaction of PAA method for indication of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* pathogens in food raw materials and foods.

## Determination of the optimal temperature for *Yersinia pseudotuberculosis* bacteriophages cultivation

Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A.

Ulyanovsk State Agricultural Academy, Ulyanovsk, Russia

According to the literature the optimal temperature of growth for the bacterial species *Y. pseudotuberculosis* is in the range from 25 to 28°C. The necessary step for development of the the indication of these bacteria using bacteriophage amplification assay (BAA) was the determination of the opti-

mal temperature for the phage cultivation. For this purpose we analyzed the lytic activity of pseudotuberculosis phages at different temperature conditions: at 25–28°C and at 37°C.

Determination of the optimal temperature for the cultivation of pseudotuberculosis phages was carried out as follows: the bacteriophage dilutions ( $10^6$ – $10^{10}$ ) in sterile meat-peptone broth were prepared. Phage dilutions containing  $10^6$ – $10^{10}$  phage particles per 1 ml were plated using agar overlay method. Simultaneously the control of culture growth was set up (without the addition of phage). Plates were incubated in a thermostat at 25–28°C and 37°C for 12–16 hours. Interpretation of results was performed by counting of the negative phage colonies on the plates.

It was found that the cultivation of the phage at 25–28°C slightly reduced the phage lytic activity (from  $10^9$  to  $10^8$ ) and had a marked negative effect on the morphology of the negative colonies: the growth of the hardly visible turbid negative colonies with the vague edge was observed. At 37°C the growth of clear transparent phage negative colonies with smooth, well-defined edges was observed.

The lytic activity of the bacteriophages by the Appelman method at 25–28°C and 37°C was  $10^9$  and  $10^{10}$  respectively, and by Gratia method –  $10^8$  and  $10^9$ , respectively.

From the data obtained we can conclude that the optimal temperature for the Yersinia pseudotuberculosis phage cultivation is 37°C.

---

## Optimisation of antibiotic prophylaxis of wound suppuration using the polyvalent bacteriophages and immune-directed therapy

Zubritsky V.F.<sup>1</sup>, Ivashkin A.N.<sup>1</sup>, Kovalev A.I.<sup>2</sup>, Krivoshchapov P.G.<sup>3</sup>, Nizovoy A.V.<sup>3</sup>, Fominykh E.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Institute of Postgraduate Medical Education of Moscow State University of Food Production, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>N.N.Burdenko Chief Military Clinical Hospital, Moscow, Russia

Widespread of poly-antibiotic-resistant bacteria in surgical hospitals is one of the major risk factor of postoperative septic complications. The other reason for such a situation is the increase in the proportion of patients with immune suppressive states caused by the natural (age, ecological state of the environment) or artificial factors (for instance, in organ transplantation, as a side effect of cancer chemotherapy).

In recent years, for the preventing and treating of septic complications the combined phage preparations designed to destroy such pathogens – “Sekstafag” (production of “Microgen”) were developed. Previously this preparation was never used for prevention of the soft tissue post-surgery infections however it was successfully applied for the treatment of a number of purulent septic conditions.

On the previous stage of the research, the patients with purulent septic postoperative complications were examined and it was detected that for nearly 70% of all patients the

tests revealed a decrease in the count or functional impairment of lymphocytes or their fractions during the preoperative period. Among the drugs used to correct these immunity depressive state one can mention the yeast recombinant interleukin-2, identical to the human protein (“Roncoleukin” produced by “Biotech” Ltd.). Unlike other drugs used to correct the lymphocyte deficiency the immunomodulatory effect of Roncoleukin develops within the day after the administration.

This study evaluated the efficacy of bacteriophages and immunomodulatory therapy for the prevention of post-surgery septic complications in patients with lower limb amputations.

The study involved 90 patients suffering from atherosclerosis obliterans of the lower limbs or diabetic angio-neuropathy with decompensated ischemia of distal extremities.

Patients were divided into three groups of 30 patients (one control and two experimental groups). All patients received the preoperative antibiotic prophylaxis with cefazolin at a dose of 2.0 g intramuscularly 30–40 minutes before the operation. In the experimental group I patients ingested 20 ml of “Bacteriophage Pio polyvalent” twice: for 30–40 minutes prior to surgery operation and on the 5th day after it. Patients of the second experimental groups in addition to bacteriophage received injections of 50000 ED of Roncoleukin (recombinant human interleukin-2) 30–40 minutes before the operation and on the 3rd and 5th days after the surgery.

In the case of the development of a septic inflammation during the postoperative period, the bacteriological study of wound discharge was conducted. The material was collected in a sterile environment with sterile cotton swab and placed into the tube with meat-peptone agar.

It was found that 10% of patients (3 patients) of the control group developed the purulent inflammations of the wound. *Staphylococcus aureus* was detected in all the cases in an amount of  $10^5$ – $10^7$  per 1 g of tissue. The bacteria were resistant to methicillin, cefazolin and sensitive to vancomycin. In the experimental group I one patient had the suppuration of the surgical wound, caused by the *Escherichia coli* association present at the level of  $10^6$  per 1 g of tissue that was resistance to ampicillin, lincomycin, cefazolin, ciprofloxacin and sensitive to amikacin, cefepime, vancomycin cefotaxime, cefoperazone were detected. In the experimental group II where the antibiotics, bacteriophages and “Roncoleukin” were used simultaneously no purulent septic complications were observed.

---

## Characterisation of bacteriophage cocktail effectively prolonging the shelf life of chilled fish

Zul’karneev E.R., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Efimova O.G., Rubalskii E.O.

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

The application of the original cocktail of bacteriophages allowed to increase the shelf life of chilled fish production up to 5 days.

**Objective.** Phenotypic and molecular genetic characterisation of bacteriophages as a part of the auxiliary technological agents for decontamination of fresh fish.

**Materials and methods.** Using microbiological (including electron microscopy) and molecular genetic methods 5 natural bacteriophage active against the microflora of live Karelian region hydrobiontes were characterized. The phages were active against the target bacteria both in vitro experiments and while decontamination batch of products. High titer bacteriophage stocks were prepared on the solid medium. The minimal content of the toxins in the cocktail were achieved by using affinity chromatography.

**Results.** Bacteriophage Ah1 of Myoviridae family lysed 87% of strains of *Aeromonas hydrophila* has a genome of 221 kbp with maximum homology to already known Bacteriophage Aeh1 77%, Bacteriophage Pf1, belonging to Podoviridae, lysed approximately 80% strains of *P. fluorescens*, its genome is about 39 kbp and was homologous to closest relative phage for not more than 95%. Bacteriophage Cf1 with 171 kbp dsDNA genome is a myovirus family lysing approximately 64% of *Citrobacter freundii* strains, it shares homology

with already known *Citrobacter* phages at the level below 89%. Bacteriophage Ro1 belonging to Myoviridae family lysed approximately 66% of histamine-producing *Raoultella ornithinolytica* strains and the its 145 kbp genome sequence differs from the closest relative phage<sup>1</sup> for more than 25%. *Listeria* phage Lm1 referring to Myoviridae family lysed more than 95% of *L. monocytogenes* strains, It contained 35 kbp genomic dsDNA that differs by the sequence from the phages P35 and P40 for also more than 25%. The titre of the bacteriophage in the pilot production reached  $10^{11}$ – $10^{12}$  PFU/ml.

**Conclusion.** The performed bioinformatic analysis of phage DNA confirmed that the absence of the pathogenicity factors and known integrase, transcription repressors or their homologs in our phages. This fact along with a minimal content of exo- and endotoxins in the phage preparations guarantees the safety of the developed auxiliary technology agent for decontamination of chilled fish. Phenotypic characterization of phage along with the tests of cocktails while the processing of production hydrobiontes batch confirmed its high efficacy against a broad spectrum of the bacterial microflora of live fish.

## Геномный анализ ETA-конвертирующих бактериофагов *Staphylococcus aureus* phiB-7772 и phiB-7774

Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Дятлов И.А.

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

Известно, что лизогенная конверсия служит одним из основных способов адаптации *Staphylococcus aureus* к окружающей среде. Умеренные бактериофаги *S. aureus* семейства *Siphoviridae* классифицируют согласно последовательности гена интегразы (SalInt-тип). Каждый SalInt-тип имеет ограничения по распространению среди клonalных линий (СС) *S. aureus*. Показано, что гены вирулентности, кодируемые фагами семейства *Siphoviridae*, строго коррелируют с SalInt-типами. Так, ген эксфолиативного токсина A (eta), ведущего фактора патогенности заболеваний кожи, кодируется ETA-конвертирующими бактериофагами SalInt1-типа, ETA-like профагами. ETA-like профаги локализуются в геномах нескольких СС, например, CC15, CC109 и CC121, конвертируя их в этиологический агент таких инфекций, как буллезное импетиго и стафилококковый синдром ошпаренной кожи (ССОК). Для доминирующей в России и в Западной Европе СС8 явление ETA-конверсии и ассоциация с ССОК ранее не были известны.

При расследовании эпидемических вспышек ССОК в 2013–2014 гг. в Центральной России нами было выявлено замещение традиционного для ССОК штамма CC15-eta (B-7774) на штамм CC8-eta (B-7772). Определены полногеномные последовательности штаммов B-7772 (LJBK00000000) и B-7774 (LJBL00000000), в пределах которых выявлены последовательности профагов, кодирующих ген eta. Целью данного исследования является сравнительный геномный анализ последовательностей профагов phiB-7772 и phiB-7774, и известных последовательностей ETA-like профагов и других фагов SalInt1-типа.

OFR и регуляторные области профагов phiB-7772 и phiB-7774 определены с помощью программ Prodigal, GeneMarks и BPROM. Проведен сравнительный анализ основных функциональных областей phiB-7772 и phiB-7774. Обсуждаются особенности структуры регионов, ответственных за лизогению и репликацию. Показана высокая степень гомологии регионов phiB-7772 и phiB-7774, кодирующих белки хвостовых структур и капсида, с последовательностью фага phiETA3. Выявлены специфические вариации в регионе бактериофагов SalInt1-типа, кодирующем белки лизиса клетки-хозяина и токсины. Отмечена зависимость последовательности сайтов интеграции профагов SalInt1-типа от СС.

Адаптация штамма СС8 к новой экологической нише связана с включением в состав генома ETA-like профага. Специфические особенности генома фага phiB-7772 определили уникальную возможность лизогенной конверсии штамма B-7772 (CC8-eta).

## Бактериофаги: история изучения и применения

Акимкин В.Г.

НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва; Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва, Российская Федерация; Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Канадским сотрудником Института Пастера (Париж) Феликсом Д'Эреллем в начале 20 века были заложены основы современного учения о бактериофагии. Важной исторической научной вехой является создание Тифлисского бактериологического института (1923 г.), в котором были разработаны, осуществлены и распространены теория и практика применения бактериофагов в СССР, последующем в России и мире в целом.

Сегодня опыт научного и практического применения бактериофагов в России составляет около 100 лет. В 30–40-е годы двадцатого века разрабатывались методы и способы фагопрофилактики дизентерии и брюшного тифа. В этот же период были разработаны бактериофаги против основных возбудителей гнойно-воспалительных инфекций: стафилококковый, стрептококковый, коли-, протейный и синегнойный, позволившие применять их в хирургической практике для лечения гнойных процессов и послеоперационных осложнений.

К началу 90-х годов 20 века в связи с ростом значимости проблемы резистентности микроорганизмов к антибиотикам расширилась область применения препаратов бактериофагов, их стали активно применять для лечения различных гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений в хирургической практике, гинекологии и акушерстве, урологии, офтальмологии, стоматологии и других областях медицины.

В 20 и 21 веках применение бактериофагов в эпидемических очагах инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), было высокоэффективно и документировано многими российскими исследователями – представителями различных отечественных эпидемиологических школ (гг. Кемерово, Санкт-Петербурга, Москвы, Нижнего Новгорода, Уфы, Хабаровска и др.).

В настоящее время бактериофаги в России активно используются в целях лечения и профилактики широко распространенных нозологических форм инфекций, включая стрептококковую, стафилококковую, дизентерию, сальмонеллез и широкий комплекс различных нозокомиальных инфекций. Во многом, активное использование бактериофагов определяется их уникальными свойствами: высокая эффективность применения в отношении многих микроорганизмов, сопоставимая с антибиотиками, эффективность в отношении антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, являющихся возбудителями ИСМП, совместимость применения с любыми лекарственными средствами, они не угнетают собственную микрофлору человека, не токсичны, не реактогенны.

В последнее десятилетие стали появляться и первые публикации опыта применения бактериофагов в США и

отдельных странах Европы. Учитывая активный интерес и популярность использования врачами-специалистами лечебно-профилактических препаратов бактериофагов, расширение спектра различных форм их применения, определяемого практическими потребностями современной медицины, в ближайшие годы можно прогнозировать значительный рост научных изысканий в данной области и увеличение объема применения бактериофагов не только в России, но и за рубежом.

---

## Оценка эпидемиологической эффективности бактериофагов для профилактики стрептококковых и других бактериальных инфекций дыхательных путей в организованных коллективах

Акимкин В.Г.<sup>1</sup>, Алимов А.В.<sup>2</sup>, Поляков В.С.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора, Екатеринбург, Российская Федерация;

<sup>3</sup>1026-й центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Минобороны России, Екатеринбург, Российская Федерация

Острые болезни органов дыхания стрептококковой этиологии в настоящее время являются одной из самых актуальных проблем для военной медицины в связи с высоким уровнем заболеваемости военнослужащих.

Бактериофаги – это современная альтернатива антибиотикам. Особенно в тех случаях, когда применение антибиотиков затруднено.

Целью работы была оценка эпидемиологической эффективности применения бактериофагов (стрептококкового, стафилококкового, пиобактериофага поливалентного) для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах в период их формирования.

**Материалы и методы.** Оценку эпидемиологической эффективности бактериофагов осуществляли по двум направлениям: микробиологическое и эпидемиологическое.

Микробиологические исследования – динамика изменения микробного пейзажа у военнослужащих основной и контрольной групп до и после применения профилактических средств. Эпидемиологическую эффективность применения бактериофагов оценивали путем анализа проявлений эпидемического процесса заболеваемости тонзиллитами (и другими болезнями органов дыхания бактериальной этиологии) в опытной и контрольной группах до и после применения профилактических средств. В исследовании принимали участие 510 здоровых военнослужащих (мужчин).

Результаты и обсуждение. В структуре выделенных культур (до применения бактериофагов) преобладали стрептококки – 76,9%, в т.ч. *Str. pneumoniae* – 47,7%, *Str. pyogenes* – 29,2%. *S. aureus* выделялся в 23,1% случаев. Наибольшую эффективность показал стрептококко-

вой бактериофаг, после профилактического курса которого, количество выделенных стрептококков уменьшилось в 2,4 раза, а уровень заболеваемости тонзиллитами и ОРЗ бактериальной этиологии снизился в 1,8 и 3,0 раза соответственно.

Таким образом, применение бактериофагов в целях профилактики простудной заболеваемости вызывает эффект санации организованного воинского коллектива. В результате местного действия на микрофлору носоглотки нарушается циркуляция в коллективе возбудителей простудных заболеваний кокковой этиологии. Как следствие тем самым тормозится формирование эпидемиологического штамма обуславливающего групповую заболеваемость военнослужащих. Применение бактериофагов является современным направлением профилактики инфекционных болезней стрептококковой этиологии в организованных коллективах военнослужащих.

---

## Опыт совместного применения иммунного лактоглобулина и бактериофага для лечения экспериментального сальмонеллеза

Алексанина Н.В., Моисеева О.В., Яговкин Э.А.

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

Целью данного исследования явилось изучение антibактериальной эффективности совместного применения иммунного лактоглобулина и сальмонеллезного бактериофага при лечении экспериментального сальмонеллеза у мышей.

Экспериментальную сальмонеллезную инфекцию воспроизводили путем однократного интрагастрального введения 2 LD<sub>50</sub> суточной агаровой культуры *S. typhimurium*. Животные были разделены на четыре группы по характеру лечения. Препараты вводили мышам перорально с помощью зонда через сутки после заражения в течение 7 дней. При изучении совместного лечебного действия лактоглобулина и бактериофага особое значение придавали срокам элиминации возбудителя из органов животных. Анализ полученных данных показал, что во всех четырех группах выявлена положительная динамика выведения из организма мышей возбудителя. В группах животных, получавших оба препарата, элиминация сальмонеллы из органов происходила в 1,5 раза быстрее, чем в контрольных группах мышей. Одновременно в опытных группах уже на трети сутки лечения препаратами выявлено статистически достоверное снижение количества *S. typhimurium* в содержимом толстого кишечника животных. В процессе исследования установлено, что применение для лечения животных иммунных лактоглобулинов в сочетании с сальмонеллезным бактериофагом в течение 7 дней уменьшало тяжесть и длительность течения заболевания и блокировало дальнейшее развитие инфекционного процесса, способствовало эффективному и быстрому очищению организма животных от возбудителя

инфекции, повышало степень выживаемости мышей. Полученные в ходе эксперимента данные позволяют сделать вывод о целесообразности совместного применения препаратов иммунных лактоглобулинов и бактериофагов для лечения острых кишечных инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами сальмонелл.

## Анализ генома бактериофага *Propionibacterium acnes* a1-14

Алексеева А.Е., Альховский С.В., Бруснигина Н.Ф.

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

**Цель работы** – характеристика генома нового умеренно бактериофага *Propionibacterium phage PA1-14*, обнаруженного при анализе результатов полногеномного секвенирования штамма *Propionibacterium acnes* A1-14.

Полногеномное секвенирование проводили на приборе MiSeq, для подготовки ДНК-библиотек использовали набор Nextera XT. С помощью программного обеспечения CLC Genomics Workbench 5.5 (CLC bio, США) осуществляли выравнивание и сборку нуклеотидных последовательностей *de novo*. Геном аннотировали с использованием сервера RAST.

В результате выравнивания и объединения получена нуклеотидная последовательность длиной 29407 п.о. с уровнем покрытия 25000. Число ГЦ пар составил 53,85%. При аннотировании было установлено наличие 45 белок кодирующих последовательностей, 31 из них – кодируют гипотетические белки, функция которых неизвестна.

Бактериофаг *Propionibacterium phage PA1-14* относится к семейству *Siphoviridae*, установлено, что в составе генома присутствуют гены, детерминирующие синтез и сборку белков капсида и хвостового отростка, репликацию ДНК, а также гены, ответственные за лизис стенки хозяина. При посеве штамма *Propionibacterium acnes* A1-14 методом агаровых слоев по Грациа, образование негативных бляшек не наблюдалось, свидетельствуя о том, что исследуемый бактериофаг не является лизитическим. В геноме *Propionibacterium phage PA1-14* не обнаружены гены интегразы и ее репрессора, ответственные за встраивание ДНК бактериофага в геном клетки-хозяина, что согласуется с данными литературы. По-видимому, ДНК бактериофага сохраняется в клетках бактериальной культуры-хозяина в виде внекромосомной единицы.

По данным литературы это свойство является характерным для всех изученных бактериофагов *Propionibacterium acnes*, которые утратили генный модуль, ответственный за интеграцию в геном хозяина.

## Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации

Алешкин А.В.<sup>1</sup>, Светоч Э.А.<sup>2</sup>, Воложанцев Н.В.<sup>2</sup>, Киселева И.А.<sup>1</sup>, Рубальский Е.О.<sup>1</sup>, Ершова О.Н.<sup>3</sup>, Новикова Л.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация;

<sup>3</sup>НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Впервые в РФ на основе оригинальных вирулентных штаммов бактериофагов, активных в отношении возбудителей инфекций, передающихся пищевым путем, связанных с оказанием медицинской помощи и ряда других, созданы новые категории средств, разработана технология их получения, внедрены процедуры оценки безопасности бактериофагов, включающие микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические тесты, а также испытания на лабораторных животных и ограниченные клинические исследования. Профилактическое использование разработанных фагосодержащих продуктов в медицинской, пищевой, парфюмерно-косметической и других отраслях народного хозяйства РФ позволит снизить риск развития спорадических случаев и вспышек социально-значимых инфекционных заболеваний бактериальной этиологии.

## Гуморальный иммунный ответ на бактериофаги в оценке эффективности энтеральной фаготерапии

Алешкин В.А.<sup>1</sup>, Новикова Л.И.<sup>1</sup>, Бочкарева С.С.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>1</sup>, Ершова О.Н.<sup>2</sup>, Киселева И.А.<sup>1</sup>, Зулькарнеев Э.Р.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В настоящее время все более значимой становится проблема широкого распространения антибиотикорезистентных штаммов бактерий, решить которую возможно, заменяя антибиотики препаратами бактериофагов. Не смотря на то, что фаготерапия переживает второе рождение, не существует единого алгоритма проведения такой терапии, результаты, полученные на больных, противоречивы, а клиническая картина не всегда соответствует микробиологическим данным. Оценивая эффективность клинического применения фагов с точки зрения доказательной медицины, необходимо учитывать воз-

можный ответ иммунной системы на бактериофаги, тем более что данных по этой проблеме в литературе практически не имеется. В связи с этим, цель работы заключалась в изучении гуморального иммунного ответа на бактериофаги на фоне соответствующей терапии у оперированных больных, находящихся в постоперационном периоде, отягощенном присоединившейся внутрибольничной инфекцией, резистентной к антибиотикам.

Для выполнения поставленной цели были сконструированы иммуноферментные тест-системы, позволяющие установить наличие соответствующих IgG-антител в сыворотке крови или любой биологической жидкости пациента. Для работы были использованы как коммерческие реагенты, так и реагенты, приготовленные в лабораторных условиях. Так, в частности, были получены кроличьи моноспецифические антисыворотки к бактериофагам, специфичность которых была доказана методом иммуно-препарации по Оухтерлони и в реакции нейтрализации фаголизата.

Антиген (бактериофаг) сорбировали в лунках полистиролового планшета, затем в лунки вносили исследуемый образец, а связавшиеся с антигеном IgG-антитела выявляли с помощью конъюгата Protein A-Peroxidase (Sigma). Выбор конъюгата был обусловлен способностью Protein A взаимодействовать с IgG разных видов животных. Сконструированные тест-системы были апробированы при анализе IgG-антител к соответствующим бактериофагам в сыворотках, полученных от неиммунизированных и иммунизированных кроликов, а также в сыворотках крови здоровых добровольцев, принимавших и не принимавших бактериофаг *per os*. В дальнейшем были проведены исследования по анализу гуморального иммунного ответа на бактериофаги у больных, подтвердившие необходимость детекции соответствующих IgG-антител для определения штаммового состава препаратов при проведении повторного курса фаготерапии.

## Роль топологии и репликонной структуры ДНК у клеток *E. coli* в лизогенении и вирулентном цикле он-ДНК бактериофагов phiX174 и I<sub>o</sub>7

Алешкин Г.И., Смелкова О.И.,  
Марков А.П., Русина О.Ю., Воронина О.Л.,  
Добрынина О.Ю., Большакова Т.Н.

Федеральный научно-исследовательский центр  
эпидемиологии и микробиологии им. почетного  
акад. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва,  
Российская Федерация

Вирулентные он-ДНК бактериофаги phiX174 и I<sub>o</sub>7 способны к лизогении у бактерий родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*. Сочетание лизиса популяции *E. coli* этими фагами с повышенной частотой их лизогении в спонтанных мутантах регуляторной ФТС-системы (P<sub>ts</sub>) и топоизомераз II (NalR) обогащает популяции лизогенами этих мутантов, способными изменять скорость роста, патогенность и антибиотикорезистентность бактерий. Согласно интегра-

ционно-репликативной модели лизогения phiX174, I<sub>o</sub>7 у *E. coli* происходит за счет интеграции он-ДНК фаговых геномов в области терминации репликации хромосомы или плазмид, то есть в структуру репликона. Наследование геномов в этом сайте или их разрешение и начало вирулентного цикла фагов зависит от активности бактериальных XerCD геликаз, топоизомераз II и других белков, изменяющих топологию ДНК.

**Цель работы.** Выяснить влияние мутаций в генах указанных белков на лизогению и вирулентный цикл phiX174, I<sub>o</sub>7 у *E. coli*. Установить особенности указанных процессов в клетках с различной репликонной структурой ДНК.

**Материалы и методы.** Получена коллекция штаммов с мутациями в генах ДНК гиразы, топоизомеразы IV, ДНК геликаз. Сконструированы штаммы с совмещением хромосомных и плазмидных репликонов. Сравнивали частоты индукции лизогенов и титрования фагов на мутантах и исходных клетках *E. coli*, на штаммах, отличающихся репликонной структурой клетки.

**Результаты.** Установлено, что мутации в генах ДНК гиразы, топоизомеразы IV приводят к 2–10 кратному снижению титров phiX174, I<sub>o</sub>7. Соответственно, у мутантов возрастает титр лизогенов. Совмещение мутаций в генах ДНК гиразы, топоизомеразы IV с мутациями в гене репарации и рекомбинации ДНК recA, приводит к ингибции вирулентного цикла фагов. Мутации в генах геликаз DnaA, UvrD, обеспечивающих различные типы репликации ДНК, снижают эффективность титрования фагов. Совмещение в клетке репликона хромосомы с коньюгационными репликонами HfrH, плазмид F+, pKM101 снижает титры фагов в 2–6 раз.

**Выводы.** Изменение топологии ДНК репликонов *E. coli* играет решающую роль в эффективности лизогении или вирулентного цикла фагов phiX174, I<sub>o</sub>7.

## Разработка вязко-пластичных лекарственных форм бактериофагов

Анурова М.Н.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Бахрушина Е.О.<sup>1</sup>,  
Киселева И.А.<sup>2</sup>, Бочкарева С.С.<sup>2</sup>, Зулькарнеев Э.Р.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва,  
Российская Федерация;

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

Актуальность разработки новых лекарственных форм бактериофагов обусловлена необходимостью повышения комплаентности лечения и эффективности фармакотерапии при применении данной группы препаратов вне стационара.

**Целью** данной работы является разработка новых вязко-пластичных лекарственных форм комбинированной субстанции бактериофагов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования является лекарственная субстанция, представляющая собой коктейль бактериофагов. В качестве основы для получения суппозиториев изучали возможность применения:

Witepsol марок H, W-35 (Cremer Oleo); в качестве эмульгаторов – полисорбат-80 (BASF), эмульгатор T-2 (Ласкрафт). Получали экспериментальные образцы суппозиториев по стандартной технологической схеме. Технологические характеристики суппозиториев изучали на аналитическом оборудовании ERWEKA: тестер точки плавления SSP, тестер распадаемости ST 32, тестер определения времени полной деформации RM 30.

**Результаты.** Критическим параметром технологии суппозиториев является способ введения лекарственной субстанции в состав суппозиторной массы: комбинированную субстанцию бактериофагов вводили в виде раствора и по типу суспензии. Показано отсутствие влияния способа введения действующего вещества на показатели качества лекарственной формы. Образцы на основе Witepsol H и W-35 с использованием эмульгатора T-2 имели время распадаемости более 30 мин, время полной деформации в интервале от 15 до 25 мин, точка плавления –  $38^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , что не соответствует требованиям государственной фармакопеи. Кроме того, образцы суппозиториев на основе Witepsol H имели узкий диапазон температуры затвердевания, что создает определенные технологические трудности при масштабировании данного состава суппозиториев с бактериофагами, являющимися термолабильными субстанциями. Образцы на основе Witepsol W-35 с использованием в качестве эмульгатора полисорбата-80 показали удовлетворительные технологические характеристики.

**Вывод.** Разработаны суппозитории с коктейлем бактериофагов, удовлетворяющие требованиям современной нормативной документации.

## **Бактериофаги для предотвращения формирования биопленок *Pseudomonas aeruginosa***

**Асланов Б.И., Конев С.Д., Ильина М.Н., Гришко Т.А.**

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

Особого внимания заслуживает вопрос о возможности применения бактериофагов для борьбы с биопленками. К настоящему времени накопился ряд работ по оценке эффективности фагов против формирования биопленок (Lu T.K., Collins J.J., 2007; Liao K.S., et al., 2012; Weiling Fu, et al., 2010 и др.). Наибольшую важность представляет возможность использования фагов для профилактики образования биопленок на устройствах для инвазивных медицинских манипуляций, в частности, сосудистых и мочевых катетерах.

Целью работы явилась оценка эффективности лизических бактериофагов для предотвращения формирования биопленок *P. aeruginosa*.

В работе использовался штамм *P. aeruginosa* Ps5 с высокой интенсивностью пленкообразования, выделенный из клинического материала в одном из урологических стационаров Санкт-Петербурга. Изучалась эффектив-

ность бактериофага B6, выделенного из клинического материала в клинике гнойной остеологии одного из стационаров Санкт-Петербурга. Интенсивность пленкообразования оценивали, измеряя оптическую плотность (ОП) на микропланшетном ридере при длине волны 540 нм.

Для изучения способности бактериофага предотвращать образование биопленки была использована культура штамма *P. aeruginosa*, внесенная в 7 лунок планшета с питательным бульоном. В первую лунку одновременно с внесением культуры *P. aeruginosa* был однократно добавлен бактериофаг. Во вторую лунку бактериофаг был внесен одновременно с культурой, затем через 3, 6, 9 и 11 ч. В остальные лунки фаг добавлялся однократно: в третью – через 3 ч, в четвертую – через 6, в пятую – через 9, в шестую – через 11 ч после начала эксперимента. Седьмая (контрольная) лунка содержала только культуру *P. aeruginosa*. ОП оценивалась каждые три часа.

Результаты работы показали, что ОП в лунке с однократным добавлением фага осталась практически неизменной на всем протяжении эксперимента: 0,11 в начале и 0,12, спустя 11 часов. Схожий эффект отмечался и в лунке с добавлением фага каждые три часа. В остальных лунках выросшая к моменту добавления фага ОП оставалась неизменной к концу эксперимента (в пределах 0,2). В контрольной лунке через 11 часов наблюдался рост ОП в 4 раза (с 0,1 до 0,4).

Эксперимент позволил констатировать, что и однократное, и многократное добавление фага эффективно предотвращает образование биопленки. Более позднее взаимодействие фага со штаммом *P. aeruginosa* сдерживает нарастание пленкообразования.

## **Комплексная оценка патогенности клинических штаммов стафилококков, различающихся резистентностью к антибиотикам и чувствительностью к бактериофагам**

**Байракова А.Л., Лахтин В.М., Афанасьев С.С.,  
Лахтин М.В., Алешин В.А.**

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

Проведена оценка патогенности 180 клинических штаммов стафилококков (за исключением *S. aureus*). Были выделены 20 групп в зависимости от резистентности к антибиотикам (РА) и бактериофагам (РБФ), наличия гемолиза (ГЗ), способности к биопленкообразованию (БПО). Штаммы со средневыраженной РА (устойчивы к 1–2 антибиотикам), отсутствием ГЗ, проявляли РБФ (интестинальному (И), комплексному (К) и поливалентному (П), стафилококковому (С)). Высокие коэффициенты БПО в 80 и более % указывали на инфекционный потенциал изолята. 7 штаммов группы 12 с высокой РА (к 5 и более) были восприимчивы ко всем БФ (И, П, К и С). Высокий коэффициент БПО являлся предпосылкой к развитию инфекционного процесса. При сравнении БПО в группах,

устойчивых к рокситромицину и кларитромицину, с отсутствием ГЗ, выявлено, что в одной из групп коэффициент БПО выше. В 75% случаев имелась более высокая чувствительность к цефазолину, цефотаксиму, ампициллину. Сочетание антибиотикорезистентности и высоких значений БПО характеризовало инфекционную агрессию патогена. У 7/12 изолятов с чувствительностью ко всем БФ, наличием ГЗ, РА к 8 и более антибиотикам низкий коэффициент БПО свидетельствовал о возможных мутациях в геноме. Результаты указывают на важность всех 4 факторов для prognostico-diagnosticской оценки риска патогенности штаммов стафилококков.

## Бактериофаги *Providencia* и их роль в патологии животных

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

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

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

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

В результате проведенных исследований нами было выделено 16 термостабильных изолята бактериофагов, образующих прозрачные колонии различного диаметра от 1,0 до 5,0 мм или стерильные пятна в виде зон лизиса, диаметром от 5,0 до 9,0 мм. Литическая активность выделенных фагов по методу Аппельмана составляет от  $10^{-6}$  до  $10^{-9}$ , по методу Грация – от  $2,1 \times 10^8$  до  $1,2 \times 10^{11}$  фаговых корпускул в 1 мл среды. Изучение специфичности двух бактериофагов (F-67 УГСХА, F-87 УГСХА), имеющих высокую активность и широкий диапазон литического действия проводили по отношению к представителям других родов семейства *Enterobacteriaceae*. Нами было выделено и селекционировано 16 термостабильных изолятов фагов, активных в отношении бактерий вида *Providencia rettgeri*.

Отобраны два специфичных штамма фагов с наиболее выраженными биологическими свойствами, которые позволяют использовать их для изготовления диагностических биопрепарата. Индикаторные бактериофаги F-87 и F-67 УГСХА представляют собой прозрачную жидкость

желтоватого цвета (цвет засеянной среды), без посторонних примесей, осадка и имеют титр не ниже  $10^8$ .

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

## Специфичность действия бактериофагов рода *Providencia*

Барт Н.Г.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>, Павлова И.Б.<sup>2</sup>, Юдина Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

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

Изучение специфичности бактериофагов рода *Providencia* проводили на плотном питательном агаре методом нанесения капель фагов на газон исследуемой культуры (Ганюшин, 1988; Золотухин, 2007). Изучение специфичности бактериофагов F-67 УГСХА, F-87 УГСХА проводили по отношению к представителям следующих видов: *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, а также *Streptococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp.

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

Установлено, что селекционированные фаги неактивны по отношению к представителям бактерий других родов и видов.

Бактериофаги активны в отношении 25 полевых штаммов *Providencia rettgeri*: А 101, Н 20, М 45, С 17, Н 5, Н 11, Н 15, Н 10, Н 3, Н 4, Д 1, Н 12, Д 73, Н 2, Н 87, Н 8, Н 6, К 1, Н 14, Д 102, Н 13, Н 9, Н 7, Н 67, Н 17.

## Термофильный бактериофаг *Aeribacillus pallidus* ap45: биологические свойства, анализ генома, взаимодействие с микроорганизмом-хозяином

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

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

Изучение термофильных бактериофагов представляет интерес для установления взаимоотношений микроорганизмов в экстремально высоких температурных условиях, а также для получения данных о термостабильных структурных белках и ферментах. При этом в отличие от бактериальных сообществ, бактериофаги многих экстремальных местообитаний до сих пор мало исследованы.

Термофильный бактериофаг AP45 и его термофильный микроорганизм-хозяин КЭМТК 656 были выделены из почвенных образцов Долины гейзеров на Камчатке.

Бактериальный микроорганизм-хозяин был идентифицирован термофильный микроорганизм *Aeribacillus pallidus* методом филотипирования по последовательности гена 16S рРНК.

По морфологии фаговых частиц бактериофаг AP45 был отнесен к семейству *Siphoviridae*.

Фаг обладает следующими биологическими свойствами: на газоне чувствительной культуры продуцирует бляшки размером 0,5–1 мм и широкую зону лизиса за счет продукции растворимого белка-лизина. Фаг термостабилен при 55–65°C, сохраняет жизнеспособность при нагревании в течение 2 ч при температуре 95°C, чувствителен к хлороформу.

Размер генома по данным полногеномного секвенирования составил 51606 н.п. Анализ полученной последовательности выявил 74 предполагаемых ОРТ. Геном содержит ОРТ, кодирующие белки рекомбинации и регуляции ДНК метаболизма, белки лизиса бактериальной клетки, структурные белки, а также 41 ОРТ, кодирующих белки с неизвестными функциями. Геном бактериофага не содержит ДНК- и РНК-полимераз, которые есть у большинства хвостатых фагов. Наибольшее сходство (36%) среди геномных последовательностей бактериофагов было обнаружено с термофильным фагом D6E [GU568037] в кластере структурных белков. Большинство ОРТ неструктурных белков фага AP45 имеют сходство с ОРТ термофильных микроорганизмов, относящихся к семейству *Bacillaceae*.

Способность к лизогенному пути развития была предположена благодаря наличию нескольких белков рекомбинации и подтверждена индукцией выхода профага из резистентных клеток культуры 656.

Таким образом, впервые был охарактеризован бактериофаг, специфичный к термофильной бактерии *Aeribacillus pallidus*, выделенной из камчатского термофильного сообщества. Бактериофаг AP45 способен как к лизическому, так и к лизогенному путям развития. Для последовательностей, кодируемых неструктурными ОРТ фага, не обнаружено аналогичных последовательностей бактериофагов в существующих базах данных.

## Псевдолизогения у фага T7 и ее использование

Большакова Т.Н., Добринина О.Н.,  
Каратаев Г.И., Сивов И.Г.

ООО «Биотехнология», Москва, Российская Федерация

Бактериофаг T7 в определенных экспериментальных условиях может вызывать псевдолизо-генное состояние у ряда грам-отрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica Typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Bordetella parapertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Erwinia carotovorum*, *Yersinia enterocolitica*, *Francisella spp.*, *Brucella abortus*).

Псевдолизогенное состояние возникает с частотой  $1,5 \times 10^{-6}$  в потомстве реципиентов фага, предварительно размноженного на штаммах *E. coli*, носителях плазиды рKK3. Геном частиц фага T7, способных вызвать псевдолизогению, содержит строго-полярную мутацию, которая является следствием IS481-зависимой интеграции плазиды рKK3 в ДНК фага. Строго-полярная мутация находится между копиями тетрануклеотида CATG за промотором A3, что приводит к драматическому снижению частоты транскрипции генома фага.

При размножении фага T7 на потомстве псевдолизогенных клонов получали Hft-лизаты, в которых соотношение частиц фага и частиц, способных вызвать псевдолизогению, равно 1 : 1.

Когда с помощью Hft-лизатов проводили T7-трансдукцию *Pseudomonas putida* геном ble (бактериальный цитохром P450), то, в условиях подавления бактериальной РНК-полимеразы, получали гиперпродукцию цитохрома (50% тотального белка; OD450/OD280 = 2761; 90%-е чистое вещество с M<sub>r</sub> ≈ 15kD, против расчетного – 14kD).

## Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи

Борисова О.Ю., Рубальский Е.О., Алешкин А.В.,  
Гадуа Н.Т., Ершова О.Н., Курдюмова Н.В.,  
Савин И.А., Киселева И.А., Бочкарёва С.С.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва,  
Российская Федерация;  
НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко Минздрава  
России, Москва, Российская Федерация

Проведенные в XX веке научные работы по изучению фармакокинетики препаратов бактериофагов выполнялись с использованием классических микробиологических и иммунологических методов. Однако, эти методы зачастую имеют недостаточную чувствительность для подтверждения наличия бактериофагов в крови, в том числе из-за факторов естественной резистентности организма, которые могут маскировать наличие фага. В на-

стоящее время с развитием молекулярно-генетических технологий, в частности, методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), появились новые возможности исследования бактериофагов и их коктейлей. Для повышения эффективности контроля системного действия бактериофагов нами был предложен новый подход по изучению их фармакокинетики за счет высокочувствительного обнаружения ДНК фагов в крови методом двойной вложенной ПЦР (double-nested PCR). Разработанный нами метод включает выделение тотальной ДНК из образца цельной крови объемом 300 мкл, постановку трех раундов ПЦР со специфическими парами праймеров и детекцию продуктов амплификации каждого раунда ПЦР методом горизонтального электрофореза. Впервые этот метод мы применили в исследовании по индикации бактериофагов в крови пациентов с ИСМП при проведении им фаготерапии. В исследовании участвовало 26 пациентов с инфекцией, вызванной синегнойной палочкой, находящихся на продленной ИВЛ в отделении нейрореанимации ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» МЗ РФ. Пациенты получали внутрижелудочно (через зонд) лечебно-профилактический продукт (ЛПП), содержащий в том числе штамм бактериофага *P. aeruginosa* PA5 в титре не менее 108 БОЕ/мл, по 20 мл 1 раз в день в течение 3–5 сут. Через 24 ч после последнего приема ЛПП у пациентов забиралась венозная кровь в вакуумные пробирки с ЭДТА. Для контроля персистенции фага в крови в исследование были включены два здоровых добровольца, принимавших ЛПП *per os* в течение 3 суток по той же схеме, у которых взятие крови осуществляли через сутки после окончания приема. Выделение ДНК проводили с использованием набора К-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия). Далее последовательно ставили 3 раунда двойной вложенной ПЦР со специфическими праймерами, flankирующими фрагменты ДНК фага размером 447, 343 и 322 п.н. Реакционные смеси готовили с использованием реагентов фирмы Fermentas (Литва). В качестве отрицательного контроля использовали пробы венозной крови добровольцев и пациентов до приема фагобиотиков. В качестве положительного контроля использовали ДНК фага *P. aeruginosa* PA5. В результате были обнаружены специфические ампликоны после 2 раунда (соответствует количеству 1000–10 000 копий) и 3 раунда (соответствует количеству <200 копий) ПЦР образцов от пациентов и добровольцев. При исследовании периода персистирования фага в крови здоровых добровольцев оказалось, что ДНК фага удается обнаружить через сутки после окончания приема ЛПП. Таким образом, нами впервые показаны возможности применения молекулярно-генетических технологий МАНК для выявления бактериофагов в крови пациентов с ИСМП с целью проведения своевременной и адекватной фаготерапии. Использование этих технологий открывает новую эру в изучении бактериофагов и повышает эффективность фаготерапии.

## Исследование литического цикла стафилококкового бактериофага SA20 методом проточной цитометрии

Бронников К.А.<sup>1</sup>, Морозова В.В.<sup>2</sup>, Козлова Ю.Н.<sup>2</sup>,  
Матвеев А.Л.<sup>2</sup>, Тикунова Н.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Новосибирский государственный университет,  
Новосибирск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Классическими методами исследования взаимодействия литических бактериофагов и клеток-хозяев являются микробиологические методы, позволяющие оценить литический потенциал бактериофага и спектр штаммов бактерий, на которых он способен размножаться. В то же время эти методы не дают возможности исследовать более тонкие аспекты взаимодействия клеток и бактериофага, такие как изменение бактериальной стенки при взаимодействии с бактериофагом, отсутствие или наличие образования бактериальных агломератов при инфекции и т.д. Классическим методом исследования таких особенностей является электронная микроскопия, но этот метод исследования трудоемок и занимает много времени, поэтому желательно было бы иметь альтернативные методы исследования. В настоящей работе был использован метод проточной цитофлуориметрии для изучения взаимодействия литических бактериофагов с бактериальными клетками в ходе развития литической фаговой инфекции.

В работе исследовали литический стафилококковый бактериофаг SA20 и штамм *Staphylococcus aureus* КЭМТК 33 из коллекции ИХБФМ СО РАН. Измерения проводили с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte Flow Cytometer (Acea Bioscience, США). В результате была выявлена корреляция между данными о развитии литической фаговой инфекции, полученными методами классической микробиологии и данными, полученными с помощью цитофлуориметра. Обнаружено различие (существенно меняющееся со временем) в окраске флуоресцентным красителем DAPI бактерий контрольной культуры и культуры, инфицированной бактериофагом. Мы интерпретируем это как следствие изменения клеточной оболочки под воздействием литических ферментов фаговых частиц, а также дополнительным вкладом ДНК фага в интенсивность флуоресценции. Наблюдалось относительное уменьшение размеров регистрируемых бактериальных частиц в первые 30 мин после добавления фага, что свидетельствует о распаде крупных агломератов клеток под воздействием бактериофага.

Таким образом, в ходе исследования были выявлены достоверные отличия между ростом контрольной культуры и культуры, инфицированной бактериофагом. Метод проточной цитофлуориметрии может быть использован для выявления литической активности у бактериофага и анализа состояния клеточной популяции в ходе развития фаговой инфекции.

## Микробиологический мониторинг чувствительности стафилококков к бактериофагам

Васильева Е.И., Костюк Е.А.

Научный клинический центр ОАО РЖД, Москва,  
Российская Федерация

Широкое, зачастую неконтролируемое применение в медицинской практике антибактериальных препаратов, создало серьезную проблему полирезистентности бактерий, ассоциированных с воспалительными заболеваниями различной локализации. Самый известный пример – рост доли метициллин-резистентных стафилококков (MRSA). Альтернативный путь – применение бактериофагов для лечения ряда урологических, раневых и др. инфекций, вызванных бактериями рода *Staphylococcus*. Проанализированы результаты посевов 5584 образцов, в которых обнаружен рост бактерий рода *Staphylococcus*. Среди штаммов *Staphylococcus*, выделенных из глаз (778) верхних (1420) и нижних дыхательных путей (376), из мочи (1227), спермы (696), гинекологических мазков (420), ран и др. хирургического материала (667), *Staph aureus* встречался в 32% случаев. Из них MRSA составляли 12%. *Staph. epidermidis* выделен в 40%, *Staph. haemolyticus* – в 28% посевах. Доля MRS среди *Staph. epidermidis* составила 35% и *Staph. haemolyticus* – 32%. Изучена чувствительность стафилококков, выделенных от 82 больных, к моно- и комбинированным (пио- и интести-) бактериофагам. Наибольшей антистафилококковой активностью обладали пио- и интести-бактериофаги. Чувствительными к ним были 88 и 80% *Staph. aureus*, 42 и 37% *Staph. haemolyticus*, 25 и 21% *Staph. epidermidis* соответственно. К стафилококковому бактериофагу чувствительны были 77% штаммов *Staph. aureus*, 33% – *Staph. haemolyticus* и лишь 13% – *Staph. epidermidis*. MRSA и MRS стафилококки были в 25% случаев чувствительны к изученным видам бактериофагов.

## Выделение бактериофагов *Bordetella bronchiseptica*

Васильева Ю.Б., Васильев Д.А., Мастиленко А.В.,  
Семанина Е.Н., Ломакин А.А., Пронин К.Н.,  
Золотухин С.Н., Щербина А.А.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная  
академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

С 80-х годов XX-го века отечественными и зарубежными исследователями предпринимаются попытки выделения фагов бактерий рода *Bordetella*.

В 2013 г. группа американских исследователей разработали методику выделения фагов для разных фаз *B.bronchiseptica* (вирулентной BVG+ и авирулентной BVG-).

В литературных источниках мы не нашли подробного описания методики выделения фагов бактерий рода *Bordetella*. Имеются упоминания, что в 2004 г. исследователем Minghsun Liu были выделены бактериофаги *B.bron-*

*chiseptica* путем многократного облучения бактерий ультрафиолетовыми лучами.

В связи с актуальностью проблематики целью нашего исследования явилась разработка схемы выделения фагов *B. bronchiseptica* методом индукционного воздействия.

Объектами исследований явились референс-штаммы *B. bronchiseptica* №1, №7, №214, №22-067, №8344 (из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА), которые, в соответствии с паспортными данными, обладали типичными для бактерий этих видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В работе использовали общепринятые микробиологические методы выделения, идентификации и индикации бактерий и соответствующие им среды и реагенты.

В процессе экспериментальной работы из 5 лабораторных штаммов *B. bronchiseptica* нами было выделено 6 индуцированных фагов методом ультрафиолетового облучения бактерий.

Оптимизированная схема выделения бактериофагов, включает 3-дневное воздействие ультрафиолетовым излучением на суточную культуру *B. bronchiseptica* в различных вариациях расстояния до лампы (l) и времени облучения (t): 1 день: t = 5–7 мин; l = 1 м. 2 день: t = 7–10 мин; l = 1 м. 3 день: t = 7–10 мин; l = 0,5 м. Далее проводят смыв выросших колоний мясопептонным бульоном с чашек Петри, помещение в пробирку со штаммами бордептелл. Культивирование в термостате в течение суток. На 5-е сутки осуществляется обработка хлороформом 1 : 10 к фаголизату в течение 15 мин, центрифугирование при 3000 об/мин – 15 мин, снятие надосадочной жидкости в стерильную пробирку. На следующий день присутствие бактериофага определяют по наличию зон лизиса. После выделения бактериофаги необходимо пассивировать для повышения их литической активности.

Мы считаем перспективной дальнейшую селекцию выделенных фагов для конструирования диагностических и лечебно-профилактических биопрепаратов.

## Персонализированная фаготерапия инфицированных трофических язв на фоне сахарного диабета

Власов В.В.<sup>1</sup>, Ганичев Д.А.<sup>2</sup>, Козлова Ю.Н.<sup>1</sup>,  
Морозова В.В.<sup>1</sup>, Саранина И.В.<sup>1</sup>, Тикунова Н.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН,  
Новосибирск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Дорожная клиническая больница  
на ст. Новосибирск-Главный ОАО «РЖД»,  
Новосибирск, Российская Федерация

Персонализированная фаготерапия подразумевает использование пациенто-ориентированного применения препаратов бактериофагов. При этом выделенные от пациента изоляты микроорганизмов тестируются на чувствительность к различным препаратам бактериофагов, и для лечения используется препарат, обладающий наи-

лучшим антибактериальным эффектом. Использование персонализированной фаготерапии весьма актуально в лечении пациентов с инфицированными трофическими язвами, поскольку такие пациенты зачастую инфицированы микроорганизмами с множественной устойчивостью к антибиотикам.

В проведенном исследовании участвовало 34 пациента, находившихся на стационарном лечении с трофическими язвами на фоне сахарного диабета. Из образцов, взятых из инфицированных трофических язв, высевали микроорганизмы. В ходе исследования у 16 пациентов были выявлены смешанные бактериальные инфекции (*Staphylococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* и др.), у 15 – моноинфекции, один образец содержал грибковую моноинфекцию, в образцах от двух пациентов микроорганизмов обнаружено не было. Выявленные микроорганизмы тестировали на чувствительность к антибиотикам и к различным препаратам бактериофагов. В случае выявленной фагочувствительности проводилась фаготерапия методом аппликаций в течение 5–7 дней.

Фаготерапия применялась в 23 случаях: из 13 пациентов с моноинфекциами, восемь были инфицированы *Staphylococcus aureus* (три метициллин-резистентных штамма), три пациента – *Pseudomonas aeruginosa* и два пациента – *Escherichia coli*. После фаготерапии наблюдалось полное исчезновение инфекционного агента в контрольном мазке (*S. aureus* и *E. coli*) или уменьшение титра инфекционных агентов на 3–4 порядка (*P. aeruginosa*). Из 10 пациентов с микст-инфекциами только у пяти пациентов все выявленные клинические штаммы были чувствительны к бактериофагам. Положительный результат лечения наблюдался у четырех пациентов, у одного пациента применение фаготерапии было неэффективным. В остальных пяти случаях наблюдались сложные микст-инфекции – 3 и более инфекционных агента, из которых только 1–2 были чувствительны к бактериофагам. В этих случаях применение бактериофага приводило к исчезновению фагочувствительного штамма и сохранению остальных. Таким образом, применение персонализированной фаготерапии дало положительный эффект в 100% (13/13) случаев с моноинфекциями, и в 40% (4/10) случаев с микст-инфекциями.

---

## Оценка эффективности бактериофагов при лечении экспериментального сепсиса, острой пневмонии и инфекции бедра, вызванных *Klebsiella pneumoniae* у мышей

Воложанцев Н.В., Борзилов А.И., Мякинина В.П., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Красильникова В.М., Веревкин В.В., Светоч Э.А.

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

В условиях кризиса антибиотикотерапии возникает очевидная необходимость поиска альтернативных способов борьбы с бактериальными инфекциями. Одним из

таких подходов является использование для профилактики и лечения инфекционных заболеваний бактериофагов – вирусов, инфицирующих исключительно бактериальные клетки.

В настоящей работе мы исследовали лечебно-профилактическую эффективность бактериофага vB\_KpnP\_KrV289 на трех экспериментальных моделях летальной клебсиеллезной инфекции у аутбредных мышей (сепсис, острая легочная инфекция, инфекция бедра). Для воспроизведения клебсиеллезного сепсиса мышей заражали подкожно культурой высоковирулентного гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* KPM9 в дозе 10 тыс. КОЕ (200 ЛД50). Данный способ заражения приводит к диссеминации возбудителя в организме животных уже в первые сутки, а гибель мышей наступает на 2–7-е сутки после заражения. Легочную инфекцию моделировали путем интраназальной инстилляции мышам культуры штамма KPM9 в дозе 250 тыс. КОЕ (150 ЛД50). В этом случае клетки *K. pneumoniae* проникают в легкие инфицированных мышей через 3 ч, в кровь – через 6 ч, в печень и селезенку – через сутки. Гибель не менее 90% животных наступает на 3–10-е сутки экспериментальной инфекции. Воспаление мягких тканей бедра у мышей с последующей генерализацией инфекции и гибелю животных вызывали внутримышечным введением 4 тыс. КОЕ (100 ЛД50) культуры KPM9. Генерализация инфекции в этом случае начинается не раньше, чем через 3 ч после заражения; летальность составляет 90–100%.

Проведенные эксперименты показали, что однократное внутрибрюшинное или подкожное введение бактериофага (50–200 млн БОЕ) за 1 ч до инфицирования обеспечивает выживание 80% (легочная инфекция), 90% (инфекция бедра) и 100% (сепсис) мышей при полной элиминации бактериальной культуры у выживших животных. При фаготерапии, проводимой через 3 ч после инфицирования (дважды в сутки в течение 5 дней), выживаемость животных во всех случаях составляла 100%. При задержке лечения до 24 часов выживаемость мышей составила 50% при сепсисе, 90% при легочной инфекции и 10% при воспалении мягких тканей бедра.

Результаты проведенных исследований подтверждают перспективность использования бактериофагов для профилактики и лечения клебсиеллезных инфекций различной локализации.

Работа выполнена при поддержке  
Российского научного фонда (грант 15-15-00058).

## Профаги в составе геномов микроорганизмов, инфицирующих млекопитающих, как признак адаптации бактерии к организму-хозяину

Воронина О.Л., Кунда М.С., Шарапова Н.Е.,  
Аксенова Е.И., Рыжова Н.Н., Семенов А.Н.,  
Гинцбург А.Л.

Федеральный научно-исследовательский центр  
эпидемиологии и микробиологии им. почетного  
акад. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва,  
Российская Федерация

Изучение геномов микроорганизмов, имеющих медицинское значение, позволило нам выявить существенные отличия в областях профагов, как у грамположительных, так и у грамотрицательных бактерий.

Сравнение профагов микроорганизмов 3 таксономических групп: *Listeria monocytogenes* (*L. mon*), *Mycobacterium bovis* (*M. bov*), *Achromobacter ruhlandii* (*A. ruh*), выделенных из окружающей среды и из клинического материала, было целью данной работы.

Штаммы *L. mon* VIM007, VIM081, *M. bov* BCG Russia 368, *A. ruh* SCCH3:Ach33-1365 были секвенированы по технологии 454 Roche. Для аннотации и анализа геномов были использованы специализированные ресурсы. Генотип (ST, sequence type) определяли, используя MLST (Multilocus sequence typing), IP (internalin gene profile) – согласно Adgamov, 2012.

Штаммы *L. mon* разных ST содержат в геноме консервативный профаг 22,9 kb. У штаммов, выделенных из клинического материала, даже с идентичными ST и IP, количество и состав дополнительных профагов отличаются. Дикие штаммы *M. bov*, а также ранние и ряд поздних субштаммов *M. bov* BCG объединяет консервативный профаг 7,5 kb. Однако у ранних субштаммов BCG второй профаг дикого штамма заменен меньшим по размеру профагом, который вовсе утрачен у поздних субштаммов. Влияние условий культивирования на профиль профагов отражают геномы субштаммов BCG Montreal и BCG Tice, включающие 7 и 15 иных профагов, соответственно. Штаммы *A. ruh* разных ST, выделенные как от больных муковисцидозом, так и от быка при респираторном заболевании, содержали консервативный профаг 13,7–18,9 kb в составе генома. В тоже время штаммы одного ST, но от больных разных континентов, отличались по количеству и составу дополнительных профагов. Однако штаммы, изолированные в близких географических областях, даже при отличии ST имели дополнительный общий профаг.

Таксономия профагов однозначна у грамположительных бактерий: у штаммов *L. mon* все профаги принадлежат отряду *Caudovirales*, семейству *Siphoviridae*; но сложна у профагов грамотрицательных бактерий: у *A. ruh*, только общий профаг относится к указанному семейству; остальные содержат ORF, гомологичные ORF фагов, как семейств *Myoviridae*, *Podoviridae* того же отряда, так и иных отрядов, например, *Herpesvirales* и других семейств группы I: *Phycodnaviridae*, *Ascoviridae*.

Таким образом, набор и состав профагов в геноме бактерии могут служить индикатором патогенности штамма.

## Новые препараты бактериофагов – высокоэффективные и безопасные средства антибактериальной терапии и профилактики

Ворошилова Н.Н., Казакова Т.Б., Боговазова Г.Г.,  
Алферова Э.В., Усманова С.С., Полягач О.А.

Научно-производственное объединение «Микроген»  
Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Нарастающая полирезистентность возбудителей к антибиотикам и большое количество побочных реакций на их применение привели к необходимости разработки новых препаратов бактериофагов. Нами селекционированы высоковирулентные лизические бактериофаги *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *C. diphtheriae*, *Y. enterocolitica*, *S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea*, *S. odoriferae*, *Hafnia alvei*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, изучены их биологические свойства, спектр антибактериальной активности, закономерности процессов репродукции, разработаны на их основе новые фармацевтические композиции и лекарственные формы поливалентных препаратов, изучена фармакодинамика, реактогенность, иммуностимулирующая и антибактериальная активность, клиническая эффективность препаратов при лечении локализованных и генерализованных форм заболеваний. Научно обоснованы и разработаны и защищены 11 патентами России технологии производства препаратов бактериофагов. Технологии предусматривают использование высокопродуктивных способов получения биомассы бактериофагов, новых способов барометрического разделения для очистки бактериофагов от бактериальных клеток и их токсинов. В сравнении с традиционными технологиями, выход биомассы бактериофагов при их репродукции и очистке, повысить концентрацию бактериофагов в препаратах до 30–900 млн в 1 мл (повышаются в 10–100 раз) и обеспечивают высокую антибактериальную (85–99,6%) и клиническую (85–100%) эффективность препаратов. Отсутствие аллергических и токсических реакций на их применение дает возможность расценивать новые препараты бактериофагов как альтернативные антибиотикам высокоэффективные и безопасные средства антибактериальной терапии и профилактики.

## Экспериментальные бактериофаги для диагностики холеры

Гаевская Н.Е., Кочеткова А.О.

Ростовский-на-Дону противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ростов-на Дону,  
Российская Федерация

В схеме лабораторной диагностики возбудителя холеры большое место занимают фаговые тесты, но в последние годы наблюдается неуклонное снижение чувствительности холерных вибрионов к применяемым диагностиче-

ским фагам (до 77,4%). Поиск новых рас холерных фагов актуален и, в первую очередь, связан с необходимостью подтверждения специфических свойств возбудителя холеры эффективным, простым и надежным способом.

В связи с этим целью нашей работы было найти новые диагностические холерные бактериофаги активные в отношении фагоустойчивых штаммов *Vibrio cholerae*. Вновь полученные расы фагов будут отличаться от исходных образцов целым рядом биологических признаков, ведущим из которых будет преодоление резистентности клетки хозяина.

В работе использовано 267 штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor (52 штамма ctx+tcp+, 9 штаммов ctx-tcp+, 206 штамма ctx-tcp-), из них фагорезистентных к фагу «Эльтор» – 253 штамма, выделенных в 2001–2015 гг. из различных источников, а также 24 штамма *Vibrio cholerae* Classical. В исследование были взяты как типичные культуры *Vibrio cholerae* El Tor, так и измененные варианты (RO, RS). Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% agar Мартена pH 7,6–7,8.

В результате проведенной работы были отобраны четыре холерные бактериофага. Анализ результатов литической активности показал, что все штаммы, взятые для лабораторных испытаний, лизируются в той или иной степени и в разных вариантах экспериментальными холерными бактериофагами (O1, Cl, El 1, El 2).

По данным электронно-микроскопического исследования новые холерные бактериофаги относились по морфологии коккуску: фаги O1, El 1 и фаг Cl к типу С семейства *Podoviridae*; фаг El 2 к типу А семейства *Myoviridae*. По серологическим свойствам холерный монофаг O1 относится ко 2 серологическому типу холерных фагов, монофаг Cl – к 3 типу, El 1 и El 2 – к 7 типу.

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги. Экспериментальные фаги лизировали исключительно только штаммы *Vibrio cholerae* O1.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что экспериментальные диагностические холерные фаги могут быть применены для идентификации штаммов холерных вибрионов серогруппы O1.

## Чувствительность к бактериофагам штаммов *Bacillus anthracis* с различным типом капсулообразования

Головинская Т.М., Цыганкова О.И.

Ставропольский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Специфические сибириязвенные бактериофаги используются для индикации *B. anthracis*. Особенность сибириязвенного микробы – возможность существовать в трех моррофункциональных формах: вегетативной акапсулой, вегетативной капсульной и споровой. Зна-

чительный интерес представляет вопрос воздействия различных сибириязвенных бактериофагов на капсульные культуры штаммов *B. anthracis* как на специальных средах в условиях повышенного содержания углекислого газа (для типичных по капсулообразованию штаммов), так и на питательных средах в атмосфере воздуха для штаммов, образующих капсулу в этих условиях.

Цель настоящей работы – изучить фагочувствительность штаммов *B. anthracis* с различным типом капсулообразования в зависимости от условий проведения теста.

Использовали штаммы 3 групп: 1 – *B. anthracis* 81/1, 1284 – типичные, образующие капсулу *in vivo* и на сывороточно-бикарбонатном агаре в условиях повышенного содержания углекислого газа; 2 – *B. anthracis* 12/16 S и 140 П – способные к капсулообразованию на питательных средах в атмосфере воздуха, 3 – *B. anthracis* СТИ-1, 228/8 – акапсулевые (отсутствует плазмида pХО2). Применили бактериофаги Fah – ВНИИВВИМ, R/D-Ph-6, Гамма А-26, ВА-9, Саратов, К ВИЭВ и 186.

Для проведения теста были подобраны питательные среды и условия культивирования, оптимальные для капсулообразования штаммами 1 и 2 групп. Существенное влияние на четкость результатов теста оказало использование при постановке теста культур, предварительно выращенных в капсулной форме, так как при нанесении бактериофага на бескапсулную культуру ее лизис наступал раньше, чем формирование капсулы. В этих условиях штаммы 1 и 2 групп отчетливо демонстрировали устойчивость ко всем использованным бактериофагам. Штаммы группы 3 росли во всех случаях в акапсулной форме и были чувствительны ко всем бактериофагам.

Очевидно, что одним из решающих факторов чувствительности *B. anthracis* к литическому действию специфических бактериофагов является особенности поверхностных структур бактериальных клеток на начальном этапе взаимодействия между бактериальной клеткой и бактериофагом. При проведении идентификации *B. anthracis* с использованием специфических сибириязвенных бактериофагов необходимо учитывать существование атипичных штаммов, способных формировать капсулу на обычных питательных средах в атмосфере воздуха, что делает их нечувствительными к литическому действию бактериофагов.

## Применение бактериофагов в программе лечения больных с тяжелой абдоминальной патологией

Гостищев В.К., Горбачева И.В., Станоевич У.С.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова,  
Москва, Российской Федерации

С 2000 по 2015 гг. в ГКБ им. И.В.Давыдовского (базе кафедры общей хирургии ПМГМУ им. И.М.Сеченова) было пролечено более 5000 больных с абдоминальной инфекцией. Из них 450 пациентов с распространенным перитонитом, в программе лечения которых использовались программируемые этапные санации, 430 пациентов с острой

кишечной непроходимостью, 370 пациентов с деструктивными панкреатитами. Мы использовали комбинированный препарат из коммерческих бактериофагов, проявивших активное действие в отношении выявленных нозокомиальных штаммов. В случае длительного предоперационного нахождения больного в стационаре, где уже имеется какой-либо из перечисленных нозокомиальных штаммов, комбинированный препарат позволяет бороться с уже присутствующей инфекцией и предупредить смену доминирующего возбудителя, так как один из 3 компонентов играет роль основного лечебного агента, а другие предотвращают смену возбудителя. В назоинтестинальный зонд 2 раза в день вводился бактериофаг, активный в отношении нозокомиальной флоры, в концентрации  $10^7$  – 200,0 мл. Если больные по каким-либо причинам находились в стационаре более 3 сут до момента операции, то антибактериальная терапия включала антибиотики активные в отношении внутрибольничной флоры в комбинации с энтеральным введением бактериофагов. При использовании бактериофагов, ни в одном случае не отмечено присоединения внутрибольничной флоры из группы *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus bovis* и *Escherichia coli*. *In vitro* активность выделенных адаптированных бактериофагов превосходит активность антибиотиков, к которым нозокомиальные штаммы сохранили чувствительность, в  $1,5 \pm 0,2$  раза. Местно аналогичный фаговый препарат использовался в конце этапной санации брюшной полости или санации сальниковой сумки ежедневно 1 раз в сутки. Использование активных бактериальных вирусов позволяет предупредить инфицирование органов в результате бактериальной транслокации нозокомиальной флорой в 69,2% случаев. Идеальная фаготерапия – типоспецифичные фаги для каждого стационара с учетом своего собственного внутрибольничного микробного пейзажа. Критериями прекращения использования бактериофагов являются купирование ССВР, устранение источника инфицирования, восстановление перистальтики, микробиологически верифицированное снижение перitoneальной контаминации ниже  $10^5$  КОЕ/мл.

## Иммунодетекция бактериофагов методом электроакустического анализа

Гулий О.И.<sup>1,2,3</sup>, Зайцев Б.Д.<sup>4</sup>, Шихабудинов А.М.<sup>4</sup>,  
Теплых А.А.<sup>4</sup>, Бородина И.А.<sup>4</sup>, Фомин<sup>1,3</sup>,  
Староверов С.А.<sup>1,3</sup>, Дыкман Л.А.<sup>1</sup>, Игнатов О.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова, Саратов, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт РАН, Саратов, Российская Федерация;

<sup>4</sup>Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А.Котельникова РАН, Саратов, Российская Федерация

В настоящее время наиболее распространены иммuno-логические методы определения бактериофагов и вирусов с помощью физических методов анализа. Пьезо-

электрические резонаторы с поперечным электрическим полем представляют особый интерес для исследования свойств биологических жидкостей, поскольку характеризуются высокой чувствительностью и возможностью анализа биологических объектов непосредственно в жидкой фазе. Показана возможность детекции бактериофагов с помощью поликлональных антител методом электроакустического анализа на примере бактериофагов ФАІ-Sp59b, выделенных из клеток *Azospirillum lipoferum* штамма Sp59b. Установлено, что частотные зависимости реальной и мнимой частей электрического импеданса резонатора с суспензией бактериофагов с антителами значительно отличались от зависимостей резонатора с контрольной суспензией вирусов без добавления антител. Показано, что бактериофаги ФАІ-Sp59b детектировались с помощью антител в присутствии посторонних вирусных частиц. Содержание бактериофагов ФАІ-Sp59b в анализируемой суспензии составляло от  $\sim 10^{10}$  до  $10^6$  фагов/мл, а время анализа не превышало 5 мин. Оптимально информативным параметром для получения достоверной информации являлось изменение реальной или мнимой частей электрического импеданса на фиксированной частоте вблизи резонанса при внесении в исследуемую суспензию специфических антител. Регистрация взаимодействия бактериофагов с антителами открывает перспективы разработки биологического датчика для идентификации и определения вирусов в жидкой фазе.

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ № 16-07-00818.

## Контроль бактерий *Escherichia coli* серогруппы O55 в молоке с помощью бактериофагов

Денисенко Е.А., Веревкин В.В., Красильникова В.М.,  
Воложанцев Н.В., Светоч Э.А.

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

*Escherichia coli* серогруппы O55 нередко являются возбудителями диареи, геморрагического колита, гемолитоко-уреического синдрома – потенциально фатальных заболеваний человека, особенно новорожденных и детей первых лет жизни. Пищевое молоко – один из важных источников шига-токсин продуцирующих *E. coli* (STEC), в том числе *E. coli* O55.

Для биоконтроля STEC штамма ED451 O55 использовали препарат из двух вирулентных бактериофагов: EcO55-1 и EcO55-74, выделенных из сточных вод. Бактериофаги размножались и лизировали STEC штаммы серогрупп O157, O103, O126 и др. В питательном бульоне смесь фагов не позволяла размножаться *E. coli* ED451 O55 при температуре 37°C в течение нескольких суток. ДНК обоих фагов гидролизовались эндонуклеазой Vspl, фермент Sall расщеплял только ДНК фага EcO55-74. Проводится полногеномное секвенирование обоих фагов.

В коммерческое молоко вносили клетки *E. coli* ED451 O55 и смесь бактериофагов с множественностью инфицирования (МИ) 0,1, 1 и 10 БОЕ/КОЕ. Образцы инкубировали в разных условиях: при 37°C и при комнатной температуре в течение 5 и 24 часов и в бытовом холодильнике – до 4 суток. После культивирования при 37°C из образцов молока при всех показателях МИ клетки *E. coli* ED451 O55 не высеивались, в то время как в контрольных образцах молока (без фагов) концентрация патогена через 24 ч достигала  $1 \times 10^8$  КОЕ/мл. При культивировании обсемененных образцов молока при комнатной температуре клетки *E. coli* ED451 O55 не обнаруживали лишь в образцах с МИ равной 10; в образцах с МИ 1 и 0,1 концентрация патогена была меньше на два порядка по сравнению с контрольными образцами. При хранении образцов контаминированного молока в холодильнике снижение концентрации *E. coli* ED451 O55 на один порядок отмечали на 4-е сутки в образцах молока с МИ 10; в контрольных образцах за этот же период концентрация патогена увеличилась в 5 раз. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности исследований по использованию литических бактериофагов EcO55-1 и EcO55-74 для контроля STEC штаммов в молоке.

## Создание новых средств профилактики и лечения инфекционных болезней на основе бактериофагов и их литических ферментов

Дятлов И.А.

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

Одним из способов решения проблемы антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней бактериальной природы является использование бактериофагов и их литических ферментов эндолизинов и деполимераз в качестве средств диагностики и профилактики.

Основными исследовательскими задачами в данной сфере являются: создание коллекций литических бактериофагов, активных против возбудителей инфекций, выявление диагностических бактериофагов, характеристика их по спектру литической активности, характеру взаимодействия с клеткой, оценка морфологии, безопасности, фармакокинетики, эффективности в экспериментах на лабораторных животных, изучение геномов литических бактериофагов, филогенетический анализ, выявление, клонирование и экспрессия генов фаговых литических ферментов, изучение взаимодействия фагов с бактериальной клеткой на уровне первичных рецепторов, разработка препаратов бактериофагов для использования в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности.

При терапевтическом использовании фагов возникают ряд проблем, связанных с иммунными реакциями, быстрым высвобождением токсинов при лизисе и трудностями в определении эффективной дозы. Возможная иммуногенность фагов и их лизинов может быть снижена с ис-

пользованием технологии «деммунизации» белков, заключающейся в модификации Т-клеточных epitопов. Избежать быстрого высвобождения токсинов при лизисе можно при конструировании рекомбинантных эндолизин-дефицитных бактериофагов, убивающих клетки, но не лизирующих их, а также при одновременном использовании холинов, перфорирующих клеточную стенку. Важным направлением исследований в этой области является конструирование рекомбинантных фагов избирательно лизирующих только резидентные штаммы.

Основой для применения фагов в области создания рекомбинантных протективных молекул при конструировании химических вакцин и новых вакцинальных штаммов служит использование специфических рекомбинантных бактериофагов, которые в состоянии профага могут направленно менять свойства микроорганизма. Рекомбинантные бактериофаги могут нести дополнительные гены, продукты которых могут менять структуру ЛПС бактерии или продуцировать генно-инженерные токсиды «заякоренные» в бактериальную мембранны.

## Фагоиндикация бактерий рода *Serratia*

Ефрейторова Е.О.<sup>1</sup>, Пульчевская Л.П.<sup>1</sup>,  
Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Павлова И.Б.<sup>2</sup>, Юдина Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Нами были проведены исследования по идентификации бактерий рода *Serratia* выделенных из речного песка (песок с пляжей), песка детских песочниц, почвы где живут дикие пчелы, смывов с бачков для временного хранения молока на фермах, гниющих комнатных растений и слизистого налета с канализационных труб квартир и других объектов – всего было исследовано 19 полевых штаммов бактерий рода *Serratia*.

Для проведения исследований были использованы бактериофаги *Serratia* с литической активностью не ниже  $2 \times 10^7$  по Грация, ранее выделенные нами из объектов окружающей среды таких как: песок детских песочниц, воды открытых водоемов, сточных вод и др.

Используя строгую специфичность использованных нами бактериофагов по отношению к бактериям рода *Serratia*, мы использовали метод «Стекающая капля». для ускоренной идентификации этих микроорганизмов.

Результат исследований считали положительным, если на месте нанесения хотя бы одного из штаммов фагов на газоне сплошного роста культуры образовывалась прозрачная зона лизиса со вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также образование негативных колоний фага. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствии лизиса в контроле. При положительном результате культуру относили к роду *Serratia*.

В результате проведенных исследований все исследуемые штаммы бактерий были отнесены к виду *Serratia marcescens*.

## Бактериофаги *Serratia marcescens* и *Serratia liquefaciens* индикаторы бактерий во внешней среде

Ефрейторова Е.О.<sup>1</sup>, Пульчевская Л.П.<sup>1</sup>,  
Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Павлова И.Б.<sup>2</sup>, Юдина Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Ценность использования бактериофагов как санитарно-показательных микроорганизмов при фекальном загрязнении заключается в следующем:

- а) бактериофаги выделяются из сточных вод с той же частотой, что многие энтеропатогенные вирусы;
- б) они имеют сходство с энтеровирусами по устойчивости к химическим веществам;
- в) методы обнаружения бактериофагов очень просты.

Целью наших исследований послужило применение бактериофагов *Serratia* как индикатора бактерий *Serratia marcescens* и *Serratia liquefaciens* в объектах окружающей среды таких воды и песка с пляжа реки Свияга.

Для исследований были отобраны пробы воды и песка и проведены исследования по обнаружению фагов бактерий видов *Serratia marcescens* и *Serratia liquefaciens*. Исследования проводили по классическим методикам.

Посевы исследуемых проб производили в бульон с индикаторными штаммами гомологичного вида *Serratia marcescens* и *Serratia liquefaciens*, а затем делали посевы на плотную питательную среду по методу Грациа. После инкубирования подсчитывают количество негативных колоний, которое соответствует количеству фаговых корпуксул в высаженном материале и пересчитывают на 1 л. Эти исследования могут быть проведены в любой бактериологической лаборатории в течение 18–24 ч при использовании простых питательных сред и несложного оборудования. В результате проведенных исследований было выделено и селекционировано 3 бактериофага: 2 на вид *Serratia marcescens* (SM-5, SM-7) из воды и песка и 1 на вид *Serratia liquefaciens* (SL-4) из песка.

Из тех же проб песка и воды также выделяли микроорганизмы, принадлежащие к роду *Serratia* культуральным методом. В результате проведенных исследований было выделено 2 штамма бактерий: 1 – *Serratia marcescens* и 1 – *Serratia liquefaciens*.

Проведенные исследования подтверждают значение бактериофагов как санитарно-показательных микроорганизмов видов бактерий *Serratia marcescens* и *Serratia liquefaciens*.

## Разработка параметров ускоренной идентификации бактерий *Y. Pseudotuberculosis* с помощью индикаторных бактериофагов

Журавская Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

С учетом строгой родовой специфиности выделенных псевдотуберкулезных бактериофагов, нами была разработана схема выделения и ускоренной идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*. В исследованиях использовали воду, пищевое сырье, комбиорм, фекалии без стерилизации, контаминированные *Y. pseudotuberculosis* в концентрации  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  м.к. в 1 мл.

Исследуемый материал подвергали бактериологическому исследованию на выделение бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* по типичной схеме (выдерживание исследуемого материала в среде накопления, посев на селективные среды и т.д.). Мазки из первичных бульонных культур, полученных после пересева характерных для иерсиний колоний, окрашивали по Граму и подвергали микроскопии. При наличии в мазках мелких грамотрицательных палочек с закругленными концами, не образующих спор и капсул, проводили идентификацию выделенных культур бактериологическим методом и с помощью псевдотуберкулезных бактериофагов методом стекающей капли.

Наличие прозрачной зоны лизиса с вторичным ростом фагорезистентных микроорганизмов или без него, а также рост негативных колоний фага на сплошном газоне роста исследуемой культуры в месте нанесения одного или обоих фагов указывает на принадлежность исследуемого штамма к виду *Y. pseudotuberculosis*. Отрицательным считали результат при отсутствии лизиса на газоне роста исследуемой культуры микроорганизмов и отсутствие лизиса в контроле.

В результате проведенных исследований установлено, что при заражающей концентрации бактериальной культуры менее  $10^3$  м.к./мл выделение бактерий из объектов внешней среды не происходит, при исследовании фекалий чувствительность бактериологического метода снижается выше  $10^5$  м.к./мл ввиду их обильной обсемененности сопутствующей микрофлорой. Результаты фагоидентификации выделенных штаммов как бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* во всех случаях подтверждены результатами исследований биохимических свойств.

Экспериментальные данные подтверждают возможность идентификации бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* с помощью индикаторных псевдотуберкулезных фагов, срок исследования по сравнению с бактериологическим методом при этом сокращается с 4 до 2 суток при меньшем расходе лабораторной посуды, питательных сред, реактивов.

## Подбор бактериофагов для индикации бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* методом РНФ

Журавская Н.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

Иерсиниозы – группа инфекций, объединяющая заболевания, вызываемые бактериями *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*.

В настоящее время лабораторная диагностика иерсиниозов включает бактериологический метод, методы генодиагностики (ПЦР, иммуноблот), иммуноферментные реакции. Бактериологический метод исследования сводится, в основном, к выделению чистой культуры возбудителя из исследуемого материала и его идентификации по общепринятым биохимическим тестам. Типичная схема выделения бактерий вида *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* включает несколько этапов: выдерживание исследуемого материала в среде накопления (холодовое обогащение), посев на плотные селективные среды, изучение ферментативных свойств выделенных культур. Эффективность данного метода ограничена сроками исследования материала от начала заболевания, что связано с биологическими особенностями возбудителей.

В диагностической практике для ускоренного обнаружения и идентификации возбудителей ряда инфекционных болезней *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в объектах санитарного надзора предложены индикаторные бактериофаги. Нами выделены фаги, активные в отношении бактерий вида *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. Установлено, что выделенные бактериофаги обладают высокой литической активностью (не ниже  $10^{-8}$  по Аппельману,  $10^9$ – $10^{10}$  по Грация), широким спектром литической активности, строго специфичны и могут использоваться для ускоренной индикации и идентификации иерсиний методом реакции нарастания титра фага (РНФ). Метод РНФ с применением специфичных индикаторных бактериофагов позволяет обнаружить в исследуемом субстрате бактерии *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* в концентрации  $10^3$  м.к./см<sup>3</sup> за 19–22 часа.

Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать метод РНФ для индикации возбудителей иерсиниозной и псевдотуберкулезной инфекций в пищевом сырье и продуктах питания.

## Определение оптимального температурного режима культивирования псевдотуберкулезных бактериофагов

Журавская Н.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

По данным литературных источников, оптимальные температурные условия роста бактерий вида *Y. pseudotuberculosis* находятся в пределах 25–28°C. Необходимым этапом подбора бактериофагов для индикации бактерий данного вида методом РНФ являлось определение оптимального температурного режима культивирования фагов. Для этого изучали литическую активность псевдотуберкулезных фагов при температурных режимах культивирования в пределах 25–28°C и 37°C.

Определение оптимальных температурных условий культивирования псевдотуберкулезных фагов проводили по следующей методике: готовили разведения испытуемых фагов от  $10^{-1}$  до  $10^{-10}$  в стерильном мясопептонном бульоне. Разведения фагов с содержанием  $10^6$ – $10^{10}$  фаговых корпускул в 1 мл засевали на чашки методом агаровых слоев. Одновременно ставили контроль роста культуры (без добавления фага). Посевы инкубировали в термостате в условиях температуры 25–28°C и 37°C в течение 12–16 ч. Учет результатов производили путем подсчета негативных колоний фага на поверхности плотной питательной среды.

В результате проведенных исследований было установлено, что культивирование фагов в пределах 25–28°C незначительно снизило литическую активность фагов (с  $10^9$  до  $10^8$ ) и существенно отразилось на морфологии негативных колоний: на поверхности плотной питательной среды наблюдался рост неясных, мутных негативных колоний, края колоний были слабо выражены. При температуре 37°C на чашках отмечался рост четких, прозрачных с ровными, хорошо выраженным краями негативных колоний фага.

Литическая активность бактериофагов по методу Аппельмана при температуре в пределах 25–28°C и 37°C составила  $10^{-9}$  и  $10^{-10}$ , по методу Грация –  $10^8$  и  $10^9$ , соответственно.

На основании полученных данных можно сделать вывод: оптимальным для культивирования фагов *Y. pseudotuberculosis* является режим при температуре 37°C.

## Фагорезистентность условно-патогенных бактерий в пейзаже кишечной микробиоты у лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника

Завгородняя Е.Ф.

Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии  
Роспотребнадзора, Хабаровск, Российская Федерация

Бактериофаги находят все более широкое применение не только для профилактики и лечения ОКИ, но также гнойно-септической патологии в хирургических, гинекологических, урологических стационарах, а в последние годы – санации кишечной микробиоты и др. Тем не менее периодически появляются работы о росте изоляции условно-патогенных бактерий (УПБ), резистентных к бактериофагам.

**Цель работы.** Изучение распространенности и оценка фагорезистентности штаммов УПБ среди лиц с дисбиотическим состоянием кишечника по отношению к отечественным бактериофагам.

**Материалы и методы.** Изучено 1197 штаммов УПБ, изолированных из содержимого толстого отдела кишечника лиц, проживающих в г. Хабаровске, в процессе изучения кишечной микробиоты (2014–2016 гг.), в том числе 382 штамма *S. aureus*, 276 – *Klebsiella pneumoniae*, 141 – *Klebsiella oxytoca*, 33 – *Proteus vulgaris*, 37 – *Proteus mirabilis*, 131 – *E. coli* гемолизированных (гем+), 197 – *E. coli* лактозонегативных (лак-). Исследования микробиоты и оценка результатов проводились по стандартной методике, идентификация штаммов – по классическим методам, отдельные штаммы идентифицированы с помощью бактериализатора Vitek-2 Compact 30. Литическая активность специфических бактериофагов изучалась методом «стерильных пятен». Использовались монофаги стафилококковый и клебсиелл пневмонии (производства «Микроген», г. Пермь), а также поливалентный коли-протейный бактериофаг (производства «Микроген», г. Н.Новгород).

**Результаты и обсуждение.** Среди изученных штаммов выявлен высокий уровень (46,2%) фагорезистентных. Наиболее высокий процент фагорезистентных выделен среди следующих штаммов: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *Klebsiella pneumoniae* (89,2; 78,0; 72,7 и 69,2% соответственно); по сравнению с прошлым годом значительно увеличилось число фагорезистентных штаммов среди *E. coli* (гем+) и *E. coli* (лак-) – 42,7 и 37,6% соответственно, и уменьшилось до 17,0% среди *S. aureus*. Изоляция фагорезистентных штаммов УПБ чаще происходит из микробных или грибково-микробных ассоциаций. Это особенно характерно для штаммов *S. aureus* и *E. coli* (гем+), у которых из ассоциаций выделялось соответственно в 4 и 2 раза больше фагорезистентных штаммов, чем из монокультур ( $p < 0,01$ ). Следует отметить также, что длительная циркуляция фагорезистентных штаммов в микробиоте, очевидно, поддерживает продолжительность дисбиотического нарушения у данного индивидуума. Одной из возможных причин высокого уровня

фагорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, которые стали регистрироваться в нашем регионе с 2014 г., – смена доминирующего штамма. Кроме того, предположительно, другой причиной этого явления может быть малое представительство дальневосточных штаммов или даже их отсутствие в соответствующих фаговых производствах.

**Заключение.** Таким образом, в нашем регионе продолжается увеличиваться выделение фагорезистентных УПБ, составляющее на сегодня 46,2%, с наибольшей циркуляцией среди протеев и клебсиелл и наименьшей – среди золотистых стафилококков. Считаем важным обратить внимание фаговых производств на необходимость при приготовлении бактериофагов обязательно использовать штаммы дальневосточного региона.

## Влияние фагорезистентности на чувствительность математической модели состояния микробиоценоза кишечника

Затевалов А.М., Селькова Е.П., Алёшкин А.В.,  
Гудова Н.В., Гусарова М.П., Затевалова Е.А.

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

**Цель работы.** Оценить чувствительность искусственных нейронных сетей состояния микробиоценоза кишечника по концентрации микроорганизмов в кале с учетом микроорганизмов чувствительных к бактериофагам и без учета. Сравнить показатели корректной классификации в группах с различными степенями микробиологических нарушений и в группах с нарушениями ферментативного пищеварения.

**Результаты.** В работе обработаны данные бактериологического и копрологического анализа кала 2357 пациентов амбулаторного приема консультативно-диагностического центра при МНИИЭМ им. Габричевского. Результаты бактериологического анализа кала были оценены врачом-экспертом по степени микробиологических нарушений от состояния норма до 3-й степени микробиологических нарушений. Показатель степени микробиологических нарушений был использован для группировки данных бактериологического анализа в двух искусственных нейронных сетях. В первой использовали округленные значения логарифмов концентрации микроорганизмов в кале. Во второй искусственной нейронной сети так же использовали округленные значения логарифмов концентраций микроорганизмов в кале, но количество микроорганизмов увеличили, за счет разделения микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам. Учитывали чувствительность кишечной палочки продуцирующей гемолизины и протея к колипротейному бактериофагу, энтерококков – к стрептококковому, клебсиелл – к клебсиеллезному, а стафилококков – к стафилококковому бактериофагу. Во второй части работы также исследовали две искусственных нейронных сети с учетом

микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам и без учета, но в качестве группировки использовали данные копрологического анализа, обработанные по алгоритму определения копрологического синдрома. Было обработано 508 результатов бактериологических анализов с признаками нормальный копрологический синдром, амилорея и стеаторея. Сравнение среднего значения корректной классификации показали, что для искусственных нейронных сетей с учетом микроорганизмов чувствительных к родственным бактериофагам увеличивается доля корректной классификации по степеням микробиологических нарушений с 97,25 до 98,05%, а по копрологическим синдромам увеличивается с 42,7 до 50,7%.

#### Выводы:

1. Учет микроорганизмов, чувствительных к родственным бактериофагам в математическом моделировании увеличивает чувствительность моделей.
2. Наибольшая эффективность в увеличении чувствительности наблюдается при группировке показателей по копрологическому синдрому.

## Оптимизация антибиотикопрофилактики нагноений ран с помощью поливалентных бактериофагов и иммуноориентированной терапии

Зубрицкий В.Ф.<sup>1</sup>, Ивашкин А.Н.<sup>1</sup>, Ковалев А.И.<sup>2</sup>,  
Кривошапов П.Г.<sup>3</sup>, Низовой А.В.<sup>3</sup>, Фоминых Е.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медицинский институт усовершенствования врачей  
Московского государственного университета пищевых производств, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация;  
<sup>3</sup>Главный клинический госпиталь им. Н.Н.Бурденко Минобороны России, Москва, Российская Федерация

Широкое распространение в хирургических стационарах полиантибиотикорезистентных бактерий является одной из главных причин послеоперационных гнойно-септических осложнений. Другой причиной такого положения дел является увеличение доли пациентов с иммуносупрессивными состояниями обусловленных как естественными причинами (возраст, экологическое состояние окружающей среды), так и вызываемых искусственно (например: при трансплантации органов, как побочный эффект химиотерапии опухолей).

В последнее время, с целью профилактики и лечения гнойных осложнений разработаны комбинированные препараты фагов, направленные на уничтожение подобных возбудителей инфекций – «Секстафаг» (производство ОАО «Микроген»). Ранее, с целью профилактики инфекций мягких тканей после хирургических вмешательств, данный препарат не использовался, однако был с успехом применен при лечении ряда гнойно-септических заболеваний.

На предыдущем этапе исследований были обследованы пациенты с развившимися гнойно-септическими осложнениями послеоперационного периода – выявлено,

что почти у 70% всех пациентов в дооперационном периоде тесты выявляли снижение числа или функциональную недостаточность лимфоцитов или их фракций. Среди препаратов, используемых для коррекции таких нарушений иммунитета, особо выделяется дрожжевой, рекомбинантный, идентичный человеческому интерлейкин-2 («Ронколейкин» произведенный ООО «Биотех»). В отличие от других препаратов, корректирующих недостаточность лимфоцитов – иммуномодулирующее действие развивается уже в течение первых суток после введения.

В данном исследовании оценивалась эффективность бактериофагов и иммуномодулирующей терапии для предупреждения инфекционных осложнений в послеоперационном периоде у больных с ампутациями нижних конечностей на уровне бедра.

Обследовано 90 пациентов, страдающих облитерирующими атеросклерозом сосудов нижних конечностей или диабетической ангио-нейропатией с декомпенсированной ишемией дистальных отделов конечностей.

Больные были распределены на три группы по 30 больных (контрольная и две основные). Всем больным проводилась предоперационная антибиотикопрофилактика цефазолином в дозе 2,0 грамма внутримышечно за 30–40 мин до операции. В основных группах, с целью профилактики нозокомиальной инфекции пациенты принимали внутрь по 20 мл «Бактериофаг Пио поливалентный» дважды: за 30–40 мин до операции и на 5-е сутки после нее. Больным второй основной группы кроме бактериофага, за 30–40 мин до операции, а также на 3-и и 5-е сутки после операции вводили 50000 ЕД «Ронколейкина» (рекомбинантного человеческого интерлейкина-2).

При развитии инфекционного воспаления в послеоперационном периоде проводили бактериологическое исследование раневого отделяемого. Посев брали в стерильных условиях, стерильным ватным тампоном в пробирку с мясопептонным агаром.

Установлено, что у 10% больных (3 пациента) контрольной группы в ране развилось воспаление с образованием гноя. Во всех посевах при этом был обнаружен золотистый стафилококк в количестве от  $10^5$  до  $10^7$  в 1 грамме ткани, который был резистентен к метициллину, цефазолину и чувствителен к ванкомицину. В первой основной группе у одного больного развилось нагноение в области операционной раны, в посевах раневого отделяемого которого выявлена ассоциация *Escherichia coli* в количестве  $10^6$  в 1 грамме ткани с резистентностью к ампициллину, линкомицину, цефазолину, ципрофлоксацину и с чувствительностью к амикацину, цефепиму, ванкомицину, цефотаксиму, цефоперазону. При одновременном использовании антибиотика, бактериофагов и ронколейкина случаев гнойно-септических осложнений в послеоперационном периоде отмечено не было.

Таким образом, инфекционных осложнений послеоперационного периода в группе, где дополнительно к антибиотикам применялись бактериофаги и использовалась иммуноориентированная терапия не было отмечено вовсе.

## Характеристика коктейля бактериофагов, эффективно продлевавшего срок годности охлажденной рыбы

Зулькарнеев Э.Р., Аleshkin A.B., Киселева И.А., Ефимова О.Г., Рубальский Е.О.

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

Использование коктейля оригинальных бактериофагов, позволило увеличить срок хранения производственной партии охлажденной рыбы на 5 суток.

**Цель исследования.** Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика бактериофагов, входящих во вспомогательное технологическое средство для деконтаминации охлажденной рыбы.

**Материалы и методы.** С помощью микробиологических (включая электронную микроскопию) и молекулярно-генетических методов исследования охарактеризовали 5 природных бактериофагов, активных в отношении прижизненной микрофлоры гидробионтов Карельского региона как *in vitro*, так и при деконтаминации производственной партии. Высокие титры бактериофагов получали на плотной среде. Минимальное содержание токсинов в коктейле обеспечивалось использованием аффинной хроматографии.

**Результаты.** Бактериофаг Ah1 из семейства *Myoviridae* лизировал 87% штаммов *Aeromonas hydrophila*, его оригинальный геном (максимальная гомология с уже известным *Bacteriophage AeH1* 77%) включал в себя линейную дЦДНК 221 т.п.н. Бактериофаг Pf1, относящийся к *Podoviridae*, лизировал около 80% штаммов *P. fluorescens*, геном включал в себя дЦДНК 39 т.п.н. и был гомологичен близкородственным фагам не более чем на 95%. Бактериофаг Cf1 с размером дЦДНК 171 т.п.н. из семейства *Myoviridae* лизировал около 64% штаммов *Citrobacter freundii*, его гомология с уже известными фагами *Citrobacter* составляла не более 89%. Бактериофаг Ro1 из семейства *Myoviridae* лизировал около 66% штаммов гистамин-продуцирующей *Raoultella ornithinolytica*, оригинальная дЦДНК фага с размером 145 тпн отличалась от ДНК родственных фагов более чем на 25%. Листериозный фаг Lm1 из семейства *Myoviridae* лизировал более 95% штаммов *L. monocytogenes*, его дЦДНК составляла 35 т.п.н. и отличалась от ДНК фагов P35 и P40 также более чем на 25%. Титр бактериофагов в процессе пилотного производства достигал  $10^{11-12}$  БОЕ/мл.

**Заключение.** Проведенный биоинформационный анализ фаговых ДНК подтвердил отсутствие локусов патогенности, а также генов, кодирующих известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи, что наряду с минимальным содержанием в фаголизатах экзо- и эндотоксинов гарантировал безопасность использования вспомогательного технологического средства для деконтаминации охлажденной рыбы. Фенотипическая характеристика фагов, а также испытания коктейля при переработке производственной партии ги-

дробионтов подтвердили его высокую эффективность в отношении широкого спектра бактерий из прижизненной микрофлоры рыб.

## Бактериофаги для имплантатов

Игнатов С.Г., Денисенко Е.А., Волошин А.Г.

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

Не смотря на значительные успехи в материаловедении при конструкции имплантатов с антибактериальными свойствами, проблема постоперационных инфекций остается весьма актуальной. Разнообразные модификации поверхности имплантатов призваны уменьшить бактериальную обсемененность поверхности. Поэтому целью наших исследований являлась оценка бактерицидной активности образцов с развитой поверхностью и наноструктурным покрытием, модифицированных бактериофагами. Бактериофагами называются вирусы, инфицирующие бактерии и размножающиеся внутри них с использованием систем биосинтеза хозяина. Неконтролируемое применение антибиотиков и ослабление иммунного статуса организма приводят к образованию мультирезистентных штаммов патогенов с которыми очень трудно бороться с помощью антибиотиков. В настоящее время бактериофаги рассматриваются как альтернатива антибиотикам. Предполагается, что бактериофаги не только лизируют часть микроорганизмов в данной системе, но и предотвращают образование биопленок. Под бактериальными биологическими пленками понимают структурно-организованную группу микроорганизмов интеркодированную в полимерный матрикс (часто являющимся продуктом жизнедеятельности данных организмов) на любой поверхности. Образование биопленок есть механизм адаптации планктонной формы бактерий к окружающей среде. Образование биопленок сопровождает до 80% бактериальных инфекций. Известно, что бактериальные биопленки показывают повышенную устойчивость к различным антимикробным агентам. Патогенные микроорганизмы, структурируемые в биопленки, приводят к росту заболеваемости и смертности. Образование биопленок патогенными микроорганизмами представляет большую опасность для любого имплантата внутри организма человека. В работе использовался бактериофаг *Escherichia coli* ECD4. Модификация поверхности бактериофагом приводит к бактерицидному эффекту для клеток *E.coli* и зависит от концентрации бактериофагов.

## Выделение фага бактерий *Acidithiobacillus ferrooxidans* методом индукции рентгеновским облучением

Карамышева Н.Н.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>,  
Семенов А.М.<sup>2</sup>, Пичугин Ю.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Целью нашей работы было выделение фага *Acidithiobacillus ferrooxidans* методом облучения рентген – лучами.

Эксперимент проводился при облучении образцов ниже режимами с фокусного расстояния 1 метр, высота столбика налитой жидкости в пробирке (предполагаемого биологического субстрата) не менее 5 см, расстояние между пробирками при одновременном облучении одной партии не более 1 см. Параметры электротехнических показателей: анодное напряжение при всех исследованиях составляло 63 кВ (киловольт) сила тока составляла 250 mA (миллиампер), а экспозиционное время изменяли в зависимости от поставленной задачи.

Полученная чистая культура, выращенная в жидкой среде, была подвергнута облучению на рентгеновской установке при различных режимах. Дозы облучения бактерий устанавливали экспериментально: 55.2.0 суммарная доза облучения составила 1,2 мЗв; 85.2.0 × 2 доза облучения 2,8 мЗв; 75.3.0 доза облучения 1,8 мЗв. Время экспозиции 1 сек, 3 сек и 2 секунды.

После облучения пробирки с 5 суточной культурой *A. ferrooxidans* в жидкой среде Сильвермана и Лундгрена 9К на 72 ч помещали для инкубирования в термостат с температурой 30°C. В первой серийной партии облучений видимых изменений культуры не происходит, во второй и третьей серийных партиях она просветлела. Для подтверждения наличия в облученной культуре фаговых частиц 1 мл предполагаемого фаголизата наносили на агаризованную среду 9 К методом агаровых слоев и на 72 ч помещали в термостат при 30°C.

При просмотре результатов было обнаружено:

1. В серии чашек Петри с облучением суммарной дозой 1,2 мЗв в течение 1 сек. – сплошной газон культуры.
2. В серии с облучением 2,8 мЗв в течение 3 сек. – наличие зон отсутствия роста.
3. В серии с облучением 1,8 мЗв в течение 2 сек. – газон культуры с разреженным ростом и наличием мелких зон лизиса.

Наиболее оптимальным является режим облучения с суммарной дозой воздействия на субстрат бактерий 1,8 мЗв. В результате данного воздействия на изучаемую бактерию произошел максимальный лизис облученных клеток. Субстрат под воздействием внешнего индуцирующего фактора продуцирует умеренный бактериофаг, о чем свидетельствуют зоны лизиса на газоне культуры *A. ferrooxidans* с добавлением облученного фаголизата.

## Изучение Са(2+) регуляции эндолизина бактериофага T5

Коваленко А.О.<sup>1,2</sup>, Чернышов С.В.<sup>1</sup>, Прохоров Д.А.<sup>3</sup>,  
Молочков Н.В.<sup>3</sup>, Микулинская Г.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Российская Федерация

Эндолизин колифага T5 (EndoT5) – компонент литической системы бактериофага, необходимый для выхода из клетки бактерии фагового потомства. По своей специфичности этот фермент – цинкодержащая металлопептидаза семейства M15, эффективно гидролизующая пептидогликан грамотрицательных бактерий. Нами было впервые показано, что активность этого фермента регулируется ионами Са<sup>2+</sup>. Консервативный сайт связывания цинка хорошо известен для подобных пептидаз, однако способ связывания регуляторного Са<sup>2+</sup> ранее не исследовался. В данной работе мы изучали Са<sup>2+</sup> регуляцию EndoT5 с помощью сайт-направленного мутагенеза.

Были получены мутантные белки, содержащие единичные замены ряда аминокислотных остатков на остаток аланина – D113A, N115A и D130A. Исследование спектров кругового диэлектризма показало, что мутации не влекут за собой значимых изменений во вторичной структуре белков. Полученные мутанты отличаются по свойствам: литическая активность N115A ниже, чем у природного белка, в 20 раз, активность D113A – в 2000 раз. Мутант D130A не обладает активностью, но сохраняет способность связывать субстрат. Интересно, что оба активных мутанта проявляют свойственную природному ферменту термостабильность – после 15-минутного прогрева при 90°C они сохраняют 80% начальной активности.

Ингибирование активности мутантов D113A и N115A с помощью хелаторов кальция показало, что для полной инактивации требуются на порядок более высокие их концентрации (1 мМ против 100 мкМ для нативного белка). Добавление Са<sup>2+</sup> в реакционную среду частично восстанавливает активность ферментов, но также требует более высоких концентраций иона.

Таким образом, аминокислотные остатки асп-113 и асн-115 координируют Са<sup>2+</sup> – мутации в этих положениях приводят к уменьшению сродства к иону и резкому падению ферментативной активности, причем ключевая роль принадлежит асп-113. Способ связывания Са<sup>2+</sup> аналогичен таковому у белков типа EF-hand. Аспарагиновая кислота в положении 130 не только координирует ион Са<sup>2+</sup>, но и является консервативным каталитическим остатком, входящим в активный сайт; мутация в этом положении полностью инактивирует фермент.

## Геномный анализ бактериофагов, лиазирующих высоковирулентные штаммы *Klebsiella pneumoniae* капсулных типов K1 и K2

Комисарова Е.В., Мякинина В.П., Красильникова В.М., Веревкин В.В., Кисличкина А.А., Воложанцев Н.В.

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

Среди 78 K-серотипов *Klebsiella pneumoniae* штаммы с гиперпродукцией капсулных полисахаридов типов K1 и K2 являются наиболее вирулентными для человека патогенами, вызывающими как госпитальные, так и внеочистильные инфекции с развитием гнойных абсцессов печени, менингитов, эндофталмитов, инфекций мягких тканей, мочевыводящих путей и легких. Наряду с высоким уровнем вирулентности, такие штаммы обладают тенденцией к приобретению детерминант резистентности к антибиотикам. Литические бактериофаги с полисахарид-деполимеразной активностью рассматриваются как одно из возможных средств контроля гипермукоидных *K. pneumoniae*.

Нами выделены семь бактериофагов, специфически инфицирующих только бактерии *K. pneumoniae* капсулного типа K1, и четыре фага, специфичные для *K. pneumoniae* K2-типа. Бактериофаги охарактеризованы по морфологии негативных колоний, спектру литического действия, параметрам инфекционного процесса (время адсорбции, единичный цикл развития). Определены полные нуклеотидные последовательности геномов шести бактериофагов. Сравнительный биоинформационный анализ позволил определить таксономическое положение фагов. Четыре K1-специфичных фага отнесены к семейству *Podoviridae*, подсемейство *Autographivirinae*, один – *Siphoviridae*, подсемейство *Tunavirinae*. Бактериофаг, лиазирующий только штаммы K2-типа, является представителем семейства *Myoviridae*. На основании гомологии с известными протеинами и их функциональными доменами определены функции фаговых белков, вовлеченных в процессы метаболизма фаговой ДНК и упаковки ДНК в капсид, структурные белки капсида и хвостового комплекса, литические ферменты. Ни в одном из фагов не выявлены гены, кодирующие известные токсины или какие-либо другие факторы вирулентности. В геномах фагов *Podoviridae* и миовириуса определены гены хвостовых структур с предполагаемым доменом полисахарид-деполимеразы.

Полученные результаты являются молекулярно-генетической основой для разработки препаратов специфичных бактериофагов и их ферментов для диагностики и лечения инфекций, вызываемых *K. pneumoniae* капсулных типов K1 и K2.

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

## Иммунологические аспекты фаготерапии бронхиальной астмы у детей с частыми интеркуррентными респираторными инфекциями

Косякова Н.И.

Больница Пущинского научного центра РАН, Пущино, Российская Федерация

Иммунологические изменения способствуют повышенной респираторной заболеваемости и сенсибилизации. С учетом спектра дисбионаза респираторного тракта, подтвержденного микробиологическим и молекулярно-генетическим методами, проведена оценка эффективности терапии комплексным жидким пиобактериофагом у 68 детей с верифицированным диагнозом бронхиальной астмой (БА) в период ремиссии и при обострении – 1 гр. Лечение проводилось на фоне противовоспалительной терапии ИГКС (флутиказона пропионата, будесонида). Контрольную группу составили 20 детей с БА, получавших только базисную терапию – 2 гр. В течение последующих 12 мес оценивалась эффективность по частоте и тяжести обострения БА, по показателям (СРБ, концентрации общ. IgE, IgA, IgM, IgG, IL-10, IL-4, IFN- $\gamma$  в сыворотке, а также sIgA, IgA1-2 и С3 компонента комплемента в носовом секрете). Важным терапевтическим эффектом фаготерапии было снижение частоты и длительности интеркуррентных острых респираторных вирусных инфекций у детей 1гр. в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и обострений БА в 1,3 раза, частота обострения хронической инфекции верхних дыхательных путей у детей с БА снизилась в 3 раза ( $p < 0,001$ ), продолжительность уменьшилась в 1,8 раза ( $p < 0,001$ ), что подтверждается динамикой иммунологических показателей. Во 2гр. Существенного снижения респираторной заболеваемости отмечено не было. Повышение эффективности гуморального иммунного ответа под действием фаготерапии подтверждается результатами оценки концентрации С3 компонента комплемента в носовом секрете. Исследование состава микрофлоры у больных БА показало, что количество патогенной флоры после фаготерапии снизилось. Уменьшилось число больных, выделявших *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, увеличилось количество выделителей сапрофитной флоры. Таким образом, фаготерапия оказывает положительный терапевтический эффект, который в значительной мере опосредуется на уровне изменений микробоценоза верхних дыхательных путей и восстановлением иммунного ответа.

## Роль бактериофагов в терапии бактериальных инфекций

Красильников И.В.

Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток ФМБА России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Число штаммов бактерий, вызывающих инфекции у людей и резистентных к большинству антибиотиков, увеличивается с каждым годом. Для успешной терапии

бактериальных инфекций необходимы дополнительные возможности. Бактериофаги представляют собой эффективное средство, дополняющее антибиотикотерапию.

Абсолютно другой механизм элиминации бактерий из организма по сравнению с антибиотиками позволяет бактериофагам разрушать бактерии даже в случае наличия образования биопленки.

Наличие современного банка бактериофагов и инструментов генной инженерии играют существенную роль в повышении эффективности воздействия на бактерии и осуществления индивидуальной бактериофаг терапии.

Важным звеном в разработке и производстве новых препаратов на основе бактериофагов является наличие высокой избирательности бактериофагов и их лизические свойства. Эти два критерия необходимо стандартизовать для каждого из выпускаемых препаратов. Современное производство с новыми стандартами, позволят создавать препараты с широким спектром действия такие как «Секстафаг» и «Интексти-бактериофаг».

Достаточно важным вопросом для фаготерапии является взаимодействие бактериофагов с антибиотиками. В этом случае следует учитывать возможность модификации рецепторов на поверхности бактерий, чувствительных к бактериофагам.

Постоянный мониторинг бактериальной среды и поиск новых штаммов бактериофагов является основой для успешной терапии бактериальных инфекций с помощью препаратов на основе бактериофагов.

## Модульные композиции из моновидовых смесей бактериофагов для терапии инфекций *P. aeruginosa*

Крылов В.Н., Шабурова О.В., Плетенева Е.А.,  
Буркалъцева М.В., Крылов В.Н., Каплан А.,  
Чеснокова Е.Н., Польгач О.А.

Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток  
им. И.И.Мечникова, Российская Федерация

Фаготерапия, введенная 100 лет назад в медицинскую практику Феликсом Д Эреллем, не выдержав конкуренции с пенициллином, практически исчезла из медицинской практики на Западе, но продолжает использоваться в России, Грузии и Польше. Быстрое возникновение устойчивости к новым антибиотикам и появление бактериальных патогенов с множественной лекарственной устойчивостью заставили вспомнить об фаготерапии как возможной альтернативе антибиотикам в лечении некоторых бактериальных инфекций (таких как раневые, кишечные, урологические инфекции, инфекции верхних дыхательных путей и легких).

Для лечения инфекции легких бактериями *Pseudomonas aeruginosa* у больных наследственным заболеванием – муковисцидозом (кистозным фиброзом) используют комбинации разных антибиотиков и ингаляции колистина. Высокая токсичность колистина не позволяет его применение до достижения ребенком 6-летнего возраста, а с возникновением плазмид, кодирующих устойчивость

к колистину он может перестать быть антибиотиком «последней надежды». Возможно, что фаготерапии станет единственным возможным подходом в длительном лечении частых легочных инфекции *P. aeruginosa* при муковисцидозе. Единичные случаи кратковременного применения бактериофагов в этом случае подтверждают возможность разового положительного эффекта. Однако быстрое возникновение устойчивости к фагам не позволяет использовать коммерческих фаговых смеси для постоянного лечения хронической инфекции. Мы предлагаем для длительной антибактериальной терапии повторных инфекции *P. aeruginosa* у детей использовать новый, «модульный», подход в фаготерапии – составление персональной лечебной смеси из группы моновидовых смесей фагов. Рассматриваются свойства видов фагов для моновидовых смесей, способы быстрого отбора новых фагов определенных видов, преимущества и возможные проблемы модульной композиции.

## Применение сальмонеллезных бактериофагов в промышленном птицеводстве

Кузьмин В.А., Фогель Л.С.

Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, Санкт-Петербург,  
Российская Федерация

Сальмонеллезы птиц являются опасной проблемой с позиции не только эпизоотологии, но и эпидемиологии, особенно это касается сальмонеллеза, вызываемого *S.enteritidis*, широкое распространение которого среди населения связано с употреблением инфицированных птицепродуктов. Сальмонеллезы, получившие название «болезнь цивилизации», распространены настолько широко, что в настоящее время ни в одной стране мира не стоит вопрос об их ликвидации, речь идет только о снижении уровня заболеваемости и ограничении распространения среди основных источников возбудителя инфекции. Цель работы – апробировать для лечения и профилактики разновидности сальмонеллезных бактериофагов при *S.enteritidis*-инфекции кур в промышленном птицеводстве Северо-Западного региона РФ.

Индикацию сальмонеллезного бактериофага осуществляли по методике Грация. В производственных условиях проводили испытания поливалентного сальмонеллезного бактериофага ABCDE Нижегородского НИИ ЭМ (в сухой и жидкой форме), бактериофага сальмонеллезного жидкого СПбНПКФ «Биотех». В контроле были испытаны применяемые в ветеринарии бактериофаг против пуллороза-тифа птиц, бактериофаг против сальмонеллеза и колибактериоза телят. Обработку цыплят аэрозолями сальмонеллезных бактериофагов в 4 крупных птицехозяйствах яичного и мясного направлений проводили однократно в выводных шкафах инкубаторов за 1,5–2 ч до выборки цыплят в дозе 4–5 мл/м<sup>3</sup>. Пероральная схема использования бактериофагов включала их применение с питьевой водой в дозе 0,1–0,3 мл на цыпленка в период первых 5 дней жизни.

Аэрозольное и пероральное применение бактериофагов в птицехозяйствах повысило сохранность цыплят 1–20-дневного возраста: в случае использования поливалентного сальмонеллезного бактериофага ABCDE на 5,4%, бактериофага сальмонеллезного жидкого на 2,25% по сравнению с контролем. Применение бактериофагов, сокращая падеж, не обеспечило ликвидации эпизоотического очага, однако уменьшило высеваемость сальмонелл от цыплят опытных групп в возрасте 1–20 дн. при использовании данных фагов: соответственно на 25,05% и на 36,7%. Учитывая экологическую безопасность использования бактериофагов и их протективный эффект уже в первые часы жизни цыплят, аэрозольно-пероральное применение бактериофагов оправдано в качестве компонента комплексной схемы профилактики *S.enteritidis*-инфекции среди птиц. Разработана система эпизоотолого-эпидемиологического надзора за сальмонеллезом, которая предусматривает сочетанный анализ эпидемического и эпизоотического процессов этой инфекции на основе взаимодействия санитарно-эпидемиологической и ветеринарной служб.

## Разработка бактериофагового биопрепарата для индикации и идентификации бактерии *Aeromonas salmonicida*

Куклина Н.Г., Васильев Д.А.,  
Викторов Д.А., Щербина А.А.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

*Aeromonas salmonicida* – патогенный микроорганизм, вызывающий опасное инфекционное заболевание рыб – фурункулез. Данное заболевание наносит весьма ощущимый экономический ущерб рыбоводческим хозяйствам. В настоящее время диагностика заболевания занимает значительное количество времени (до 7 суток).

Использование биопрепарата на основе бактериофагов позволяет провести индикацию и идентификацию бактерии вида *A. salmonicida* в течение 28 ч.

Для конструирования биопрепарата был отобран бактериофаг Asl25-УГСХА, имеющий оптимальные свойства – спектр литической активности 87,5%, титр  $10^{-9}$  по Аппельману, титр  $3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ .

Результаты исследования температурной устойчивости показали, что бактериофаг Asl25-УГСХА устойчив к температуре 53°C. При температуре 55°C бактериофаг погибал.

Экспериментальным путем выявлено, что бактериофаг не устойчив к хлороформу.

Определены оптимальные технологические параметры для изготовления биопрепарата с высокой литической активностью: диапазон оптимальных температур культивирования фага Asl25-УГСХА составляет 20–28°C, оптимальным соотношением фага и культуры является 1 : 2, т.е. 0,2 мл фага × 0,4 мл индикаторной культуры, опти-

мальное время пассажа при температуре 28°C для фага Asl25-УГСХА составляет 12 ч.

Апробация разработанного биопрепарата для идентификации и индикации показала, что из исследуемых нами 59 проб воды, в 23 – были обнаружены бактерии *A. salmonicida* штаммов, что было подтверждено бактериологическим исследованием.

## Литература

1. Викторов Д.А., Артамонов А.М., Васильев Д.А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов *Pseudomonas fluorescens*. Ветеринария и кормление. 2012;5:8-9.
2. Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб №13-4-2/1090 от 26.11.1997. Департамент ветеринарии министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации.
3. Куклина Н.Г. Индикация бактерий *Aeromonas salmonicida* в водных объектах Ульяновской области методом реакции нарастания титра фага Asl25-УГСХА.

## Опыт применения бактериофага в профилактике госпитального шигеллеза

Куракин Э.С.

Тульский государственный университет медицинский институт, Тула, Российская Федерация

Проблема ИСМП в условиях современного здравоохранения остается чрезвычайно актуальной. Несмотря на соблюдение мер инфекционного контроля в ЛПО возникают вспышки, купирование которых представляет собой трудную задачу. Проведение стандартного комплекса противоэпидемических мероприятий в значительном числе случаев не позволяет решить проблему ликвидации стойких эпидемических очагов. В таких ситуациях очень часто приходится прибегать к вынужденным мерам закрытия стационара, но и даже это действие решает далеко не все вопросы ликвидации эпидемического очага.

Широкий спектр antimикробных препаратов, применяемых в современной медицине, лишь частично уничтожает микробов и приводит к селекции наиболее устойчивых штаммов. Госпитальные штаммы, приобретая множественную резистентность к дезинфектантам, антисептикам, антибиотикам и химиопрепаратам, существенно сужают спектр борьбы с возбудителями ИСМП. Поэтому важным аспектом современного здравоохранения является поиск дополнительных средств борьбы с бактериальными инфекциями. В литературе последних лет накоплено достаточно фактов терапевтической и профилактической активности бактериофагов в отношении бактериальных инфекций.

Целью нашего исследования было оценить эпидемиологическую эффективность применения поливалентного дизентерийного бактериофага производства НПО «ИмБио» для купирования вспышки, вызванной *Sh. flexneri* в Тульском психоневрологическом стационаре, где сформиро-

вался стойкий очаг шигеллеза на фоне проводимого постоянно комплекса противоэпидемических мероприятий, что показало фактическую их несостоительность.

Отмечено высокоэффективное использование бактериофага для дезинфекции поверхностей палатных секций, проводимое методом распыления 100 мл/м<sup>2</sup>. После проведения дезинфекции предметов внешней среды заведомо контаминированных возбудителем инфекции, в контрольных смывах (465) шигеллы не выявлялись.

Описываемый и примененный способ дезинфекции в условиях хронической эпидемии позволил в течение 3 мес ликвидировать очаг длительно текущей внутрибольничной инфекции без единого дня закрытия какого-либо из отделений стационара при продолжавшейся до этого хронической эпидемии более 1,5 лет. Этот путь может и должен быть широко использован на практике, поскольку предлагает комплексное решение проблемы без значительных экономических затрат и существенных организационных перестроек функционирования стационара.

## GroEL-подобные белки, кодируемые бактериофагами

Курочкина Л.П.<sup>1,2</sup>, Семенюк П.И.<sup>2</sup>, Орлов В.Н.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина-Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Известно, что в процессе морфогенеза некоторые бактериофаги для фолдинга своих белков используют шаперонин GroEL бактерии-хозяина. Так, фаг лямбда использует GroEL вместе с его кошаперонином – GroES, а функцию кошаперонина у фагов T4 и RB49 выполняют их собственные белки (gp31 и CsoO, соответственно). Поиск шаперонинов по базам данных позволил выявить ряд белков, кодируемых бактериофагами семейств *Myoviridae* и *Podoviridae*, которые аннотированы как GroEL-подобные белки. Проведен биоинформационный анализ этих белков в сравнении с клеточными и митохондриальными шаперонинами. Несмотря на наличие высококонсервативных сайтов связывания с АТФ и Mg<sup>2+</sup>, характерных для всех известных шаперонинов, в целом фаговые GroEL-подобные белки имеют низкую степень гомологии между собой и не формируют монофилетическую группу, однако на филогенетическом древе они расположены несколько ближе к бактериальным шаперонинам. Получены и охарактеризованы два GroEL-подобных белка: gp146 и gp246, кодируемые бактериофагами EL *P. aeruginosa* и ОВР *P. Fluorescens*, соответственно. В опытах *in vitro* показано, что оба фаговых белка обладают шаперонными свойствами и препятствуют термической инактивации и агрегации фаговых эндодизинов. Фаговые шаперонины обладают слабой АТФазной активностью и, в отличие от бактериального GroEL, функционируют без кошаперонинов. Шаперонин фага EL обладает архитектурой, ха-

терной для большинства известных шаперонинов, и состоит из двух состыкованных гептамерных колец, а шаперонин фага ОВР является гептамером.

## Термостабильные пептидогликангидролазы бактериофагов как альтернатива антибиотикам

Микулинская Г.В.<sup>1</sup>, Чернышов С.В.<sup>1</sup>,  
Шаврина М.С.<sup>1</sup>, Зимин А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии им. М.М.Шемякина-Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов РАН, Пущино, Российская Федерация

Широкое применение антибиотиков – одна из причин возрастания количества антибиотикорезистентных штаммов бактерий (особенно остро проблема стоит для возбудителей нозокомиальных инфекций). В последние годы большой интерес вызывают альтернативные антибиотикам антибактериальные средства, способные эффективно их заменить или действовать с ними синергически. Одним из подходов является использование бактериолитических ферментов, чаще всего пептидогликангидролаз. К преимуществам использования пептидогликангидролаз для лизиса бактерий можно отнести относительную специфичность воздействия, высокую скорость лизиса, низкую иммуногенность, способность синергически действовать друг с другом и с другими антибактериальными средствами, часто встречающуюся термостабильность, относительную дешевизну производства (в случае рекомбинантных белков).

Нами были идентифицированы три новых фаговых пептидогликангидролазы, кодируемых бактериофагами T5, RB43 и RB49. Получены штаммы-продуценты рекомбинантных белков, ферменты очищены до электрофоретически гомогенного состояния и биохимически охарактеризованы. По своей субстратной специфичности это пептидазы семейства M15, гидролизующие связь между L-аланином и D-глутаминовой кислотой в пептидогликане грамотрицательных бактерий, относящемся к типу A1. Пептидазы этого семейства содержат цинк; кроме того, было показано, что для эндодизина бактериофага T5 характерна регуляция ионами Ca<sup>2+</sup>.

Несмотря на различия в строении и биохимических свойствах (удельной активности, pH-оптимуме, чувствительности к компонентам буфера и ионной силе), все три фермента характеризуются высокой термостабильностью: сохраняют от 25 до 70% ферментативной активности даже после 30-минутного прогрева при 90°C. Кроме того, было показано, что эти ферменты способны с высокой эффективностью лизировать извне клетки грамотрицательных бактерий в присутствии агентов, пермеабилизующих наружную мембрану. Конформационная стабильность и бактериолитическая активность позволяют с оптимизмом смотреть на перспективы фармацевтического использования этих маленьких глобуллярных пептидов.

## Бактериофаги пектолитических патогенов картофеля

Мирошников К.А.<sup>1,2</sup>, Кабанова А.П.<sup>1,2</sup>,  
Во Тхи Нгок Ха<sup>2</sup>, Шнейдер М.М.<sup>1</sup>, Сыкилинда Н.Н.<sup>1</sup>,  
Тощаков С.В.<sup>3</sup>, Игнатов А.Н.<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Исследовательский центр «ФитоИнженерия», с. Рогачево, Московская обл., Российская Федерация;

<sup>3</sup>Балтийский Федеральный университет им. Иммануила Канта, Калининград, Российская Федерация

Пектолитические энтеробактерии (*Pectobacterium* spp. и *Dickeya* spp.) – распространенные фитопатогены, причина значительных потерь при выращивании и хранении картофеля. В ходе представляемого исследования коллекция из 165 изолятов пектолитических бактерий была генетически систематизирована (RAPD-профилирование, MLST-анализ, секвенирование 16S rPHK), и разделена на 26 штаммовых групп. Выделенные и охарактеризованные пектолитические бактериофаги *Pectobacterium* и *Dickeya*, как правило, имеют инфекционную специфичность по отношению к конкретной штаммовой группе микроорганизмов. Анализ геномов бактериофагов, преимущественно относящихся к группам KP34-подобных и Vi01-подобных, предполагают первичное рецепторное взаимодействие с поверхностных полисахаридом бактериальной клетки. Обнаруженная закономерность позволяет рационализировать подбор бактериофагов для профилактики развития бактериозов путем обработки клубней при хранении.

Исследование поддержано грантом РНФ  
№16-16-00073.

## Тест система ускоренной индикации бактерий *E. Coli* 0157: H7

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

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

Целью наших исследований явилась разработка параметров временных показателей по индикации *E.coli* 0157:H7 с помощью реакции нарастания титра фагов (РНФ) при сохранении остальных параметров (температурный режим, концентрация бактериальной культуры и фаговых корпускул в 1 мл) постановки РНФ. Оптимальное время экспозиции выбирали из шести параметров: – в предварительном подращивании исследуемого материала в течение 5, 16, 24 часов при температуре 37°C, после добавления фагов смесь выдерживали в течение 5 часов при температуре 37°C; в увеличении времени контакта исследуемого материала с фагом до 10, 16 и 24 часов при температуре 37°C.

Установлено, что при подращивание материала в течение 5 часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью

РНФ в концентрации 10<sup>3</sup> м.к./мл. Подращивание исследуемого материала в течение 16 часов повышает чувствительность реакции и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10<sup>2</sup> м.к/мл. На проведение исследования затрачивается 32 ч. Бактериологическим методом это же количество эшерихии обнаружить не удавалось. При подращивании исследуемого материала в течение 24 ч чувствительность реакции не увеличивается, также позволяет обнаружить бактерии в количестве 10<sup>2</sup> м.к/мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 ч.

Во втором варианте опыта МПБ, контаминированный *E. coli* 0157:H7 штаммами: РЛ и №51659 от 10<sup>1</sup> до 10<sup>5</sup> м.к./мл не подращивали, а увеличивали время контакта материала с фагом до 10, 16, 24 часов.

По результатам изучения чувствительности РНФ в зависимости от времени инкубирования исследуемого материала с фагом установлено, что увеличение времени до 10 часов позволяет обнаружить эшерихии с помощью РНФ в концентрации 10<sup>3</sup> м.к./мл. При инкубировании исследуемого материала с фагом в течение 16 ч чувствительность реакции повышается, что позволяет обнаружить бактерии в количестве 10<sup>2</sup> м.к/мл. На проведение исследования затрачивается 32 ч. Бактериологическим методом это же количество эшерихии обнаружить не удавалось. При инкубировании с фагом исследуемого материала в течение 24 ч чувствительность реакции не увеличивается и позволяет обнаружить бактерии в количестве 10<sup>2</sup> м.к/мл. На проведение этого варианта реакции необходимо 40 часов. Бактериологическим методом *E. coli* 0157:H7 удавалось обнаружить в концентрации 104 м.к./мл, на проведение исследования затрачивается 96 часов.

На основании наших данных, считаем, что наиболее эффективными являются режимы РНФ при 5 часовой экспозиции исследуемого материала с фагом, когда удается провести индикацию бактерий в количестве 10<sup>3</sup> в миллилитре исследуемого субстрата, па исследование которого затрачивается 16–18 ч, поэтому данный режим используем в дальнейших исследованиях, хотя наиболее эффективным по чувствительности является инкубирование исследуемого материала с фагом в течение 16 ч на которое затрачивается до 32 часов.

## Литический бактериофаг РМ16, специфичный к *Proteus mirabilis*: геном, биологические свойства и некоторые аспекты взаимодействия с бактерией-хозяином

Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Шедько Е.Д.,  
Бабкин И.В., Курильщиков А.М., Юнусова А.Ю.,  
Рябчикова Е.И., Власов В.В., Тикунова Н.В.

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

*Proteus mirabilis* – грам-отрицательная бактерия, принадлежащая к роду *Proteus* сем-ва *Enterobacteriaceae*. Интересной особенностью жизненного цикла клеток *P. mirabilis* является их способность к дифференцировке

в удлиненные, очень подвижные, мульти-нуклеоидные клетки длиной до 60–80 мкм, так называемые роящиеся клетки, экспонирующие на своей поверхности сотни флагелл. *P. mirabilis* является одним из возбудителей инфекций ЖКТ, мочеполовой системы, способен инфицировать хирургические раны и является инфекционным агентом при синдроме диабетической стопы. Клинические изоляты *P. mirabilis* зачастую обладают множественной устойчивостью к антибиотикам, вследствие чего существует потребность в использовании альтернативных методов лечения протейных инфекций.

В работе были исследованы биологические свойства нового потенциально терапевтического литического бактериофага PM16 из коллекции ИХБФМ СО РАН, специфичного к патогенному штамму *P. mirabilis* КЭМТК 73; проведены полногеномные и протеомные исследования. Бактериофаг PM16 характеризуется высокой стабильностью, быстрой адсорбцией на клетках, коротким латентным периодом и высокой урожайностью. Бактериофаг PM16 был отнесен к роду phiKMV-likevirus семейства *Podoviridae* на основании организации генома, генной синтезии и сходства белковых последовательностей. Внутри рода phiKMV-likevirus бактериофаг PM16 группируется с фагами VP93, LIMElight, Petty, phiKDA1, и KP34-подобными бактериофагами.

По данным электронной микроскопии бактериофаг PM16 присоединяется к поверхности бактерий *P. mirabilis*, а не к флагеллам. При размножении в клетках *P. mirabilis* для бактериофага PM16 характерна низкая частота возникновения фагорезистентных мутантов. Фагорезистентные варианты *P. mirabilis*, полученные при заражении клеток бактерии-хозяина фагом PM16 с высокой множественностью инфицирования, обладали нероящимся фенотипом. Электронно-микроскопическое исследование фагорезистентных мутантов показало, что они отличаются от исходного штамма размером и формой клеток, отсутствием флагелл, изменениями в строении наружной клеточной мембранны и уменьшенным перiplазматическим пространством. Предположительно, устойчивость нероящихся клеток к инфицированию фагом PM16 определяется макромолекулярными изменениями в составе мембранны, ассоциированными с отсутствием флагелл и нероящимся фенотипом

## Бактериофаготерапия мочевой инфекции

Перепанова Т.С., Дарбеева О.С.

НИИ урологии Минздрава России, Москва,  
Российская Федерация

Лечебно-профилактические бактериофаги представляют собой комплексы поликлональных высоковирулентных бактериальных вирусов, вызывающих гибель гомологичных видов бактерий. Препараты бактериофагов представляют собой стерильные очищенные фильтраты фаголизатов соответствующих видов бактерий. Они освобождены от продуктов жизнедеятельности бак-

терий, эндо и экзотоксинов, продуктов фаголизиса бактериальных клеток.

Действие вирулентного бактериофага происходит поэтапно: адсорбция на поверхности гомологичной микробной клетки, проникновение внутрь клетки и последующее внутриклеточное размножение с использованием ее структурных компонентов, разрушение клетки и выход зрелых фаговых частиц, способных к заражению новых бактериальных клеток.

Благодаря строгой специфичности действия бактериофаги, в отличие от антибиотиков, не угнетают нормальную микрофлору, не подавляют иммунную защиту, а также практически не вызывают аллергии. На литическую активность бактериофагов не влияет наличие резистентности бактерий к антибиотикам.

Бактериофаги выпускают в виде монопрепараторов, содержащих вирулентные фаги бактерий одного рода или вида. В урологической практике применяются следующие препараты бактериофагов: стафилококковый; стрептококковый; протейный; синегнойный; клебсиеллезный, коли-бациллярный бактериофаг и комбинированные, состоящие из нескольких монопрепараторов: пиобактериофаг поливалентный (состав: бактериофаги стафилококковый, стрептококковый, протейный, синегнойный, клебсиеллезный, колибациллярный) и пиобактериофаг комплексный, включающий помимо перечисленных шести фагов, бактериофаг *Klebsiella oxytoca*.

При пероральном приеме бактериофаг, поступая в кровь, быстро достигает пораженные органы – почки и мочевыводящие пути, лизирует бактерии и размножаясь, выводится с мочой. При наличии бактериальной инфекции соответствующие бактериофаги активно размножаются и могут находиться в организме до 6–7 суток. У здоровых людей бактериофаги выводятся в течение 24 ч. При лечении колибациллярной, протейной и стафилококковой мочевой инфекции клинико-бактериологический эффект достигнут в 86–93% (Перепанова Т.С. «Комплексное лечение и профилактика госпитальной инфекции мочевых путей» Дисс. на соиск. доктора мед. наук. 1996 г., 226 с.). В отличие от антибиотиков возможна адаптация коммерческих препаратов бактериофагов к внутрибольничным штаммам конкретного стационара (а в перспективе – и от конкретного пациента). Возможно улучшение литической активности препаратов бактериофагов за счет включения рас бактериофагов против «местных» штаммов бактерий путем пассирования фагов через свежевыделенные культуры микроорганизмов из конкретных больниц, что позволяет повысить титр бактериофагии, стабилизировать стойкость лизиса и расширить диапазон его действия. Лечение пациентов с рецидивирующими инфекциями мочевых путей (цистит, калькулезный пиелонефрит, катетер-ассоциированная ИМП) назначается строго после определения чувствительности возбудителя к препаратуре бактериофага: по 30 мл × 3 раза в день 10–14 дней.

## Биологические свойства различных генетических видов бактериофагов *P. aeruginosa*

Полыгач О.А.<sup>1</sup>, Ворошилова Н.Н.<sup>1</sup>, Тикунова Н.В.<sup>2</sup>,  
Дабижева А.Н.<sup>1</sup>, Морозова В.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>НПО «Микроген» Минздрава России, Москва;  
<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Российская Федерация

Широкий спектр антибактериальной активности препаратов бактериофагов достигается путем постоянного обновления их состава. Цель исследования – изучение спектра антибактериальной активности и биологических свойств бактериофагов *P. aeruginosa*. Объект изучения – препарат Пиобактериофаг поливалентный очищенный и 9 штаммов вновь выделенные бактериофагов *P. aeruginosa*. Установлено, что препарат обладает 99,6% антибактериальной активностью к 778 клинических штаммов бактерий *P. aeruginosa* в разведении 10-1 по Аппельману. Метагеномным анализом показано, что в его состав входят исключительно липидные бактериофаги *P. aeruginosa* семейства *Podoviridae* видов phiKMVlikevirus и Luz24likevirus, наиболее близкими были представители этих видов – бактериофаги phiKMV [NC\_005045] и TL [NC\_023583]. Анализ геномов 9 вновь выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* при их полногеномном секвенировании и данные электронной микроскопии определили их таксономическую принадлежность к семейству *Podoviridae* – видов phiKMVlikevirus, N4likevirus и семейству *Myoviridae* – видов PB1likevirus, phikzlikevirus. Функциональная идентификация открытых рамок трансляции выявила, что 7 штаммов видов phiKMVlikevirus, N4likevirus, PB1likevirus не содержат генов рекомбинации и генов, кодирующих токсинообразование, в отличие от 2 штаммов вида phikzlikevirus, вызывающих псевдолизогению, в геноме которых присутствует ген фаговой рекомбиназы, исключающий их введение в состав препарата. Параметры одиночного цикла размножения – степень максимальной адсорбции phiKMV-фагов 90–95%, латентный период 20 мин, урожайность 60–100 фаг.част./бакт.кл.; PB1-фаг максимальная адсорбция ≥99%, латентный период 25 мин, урожайность 10–15 фаг.част./бакт. кл; N4-фаги максимальная адсорбция ≥70%, латентный период 35–40 мин, урожайность 5–10 фаг.част./бакт.кл. Из 9 штаммов бактериофагов к липидным видам с широким спектром антибактериальной активности и кандидатам для введения в состав Пиобактериофага поливалентного очищенного могут быть отнесены 7 штаммов, в том числе – 3 штамма phiKMVlikevirus – спектр антибактериальной активности – 48% – 49,9% и 51,8%, один штамм PB-1 – 24,3%, и 3 штамма N4likevirus – спектр 24,2% – 11,7% и 7,5%.

## Клиническая и микробиологическая эффективность санации влагалища гелем с бактериофагами «Фагогин» при анаэробном вагините и бактериальном вагинозе

Припутневич Т.В., Аполихина И.А., Муравьева В.В.,  
Додова Е.Г., Любасовская Л.А., Мелкумян А.Р.,  
Жиленков Е.Л., Попова В.М., Зарабов А.Ю.

Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Оппортунистические инфекции влагалища остаются актуальной проблемой акушерства и гинекологии. Рецидивирующее течение и не всегда эффективное использование антибиотикотерапии порождают необходимость использования альтернативных методов лечения. Перспективное направление – разработка комплексных фаговых препаратов.

Обследованы 42 женщины с жалобами на патологические выделения и дискомфорт в области наружных половых органов. Проведено комплексное микробиологическое исследование вагинального отделяемого (микроскопия с окраской по Граму, культуральное исследование) и ПЦР-исследование на ИППП.

У 30 женщин выявлены вагинальные инфекции, ассоциированные с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ): у 10/33,3% – кандидозный вульвовагинит (КВВ), у 2/6,7% – бактериальный вагиноз (БВ), у 11/36,7% – аэробный вагинит (АВ), у 5/16,7% – КВВ + БВ и у 2/6,7% – БВ + АВ. Всем пациенткам, колонизированным дрожжевыми грибами, назначено традиционное лечение. Остальным женщинам проведена санация влагалища гелем «Фагогин»: 10 дней дважды по 5 мл интравагинально. Все штаммы УПМ проверены на чувствительность к фагогину. АВ у 5/16,7% женщин был вызван моновозбудителем, у 8/26,7% – ассоциациями факультативно-анаэробных УПМ. Наиболее часто высевали *Escherichia coli* – 11/36,7%, реже – *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* (16,7 и по 10% соответственно) в титрах 5–7 Ig KOЕ/мл. К фагогину были чувствительны 90,9% *E. coli*, 66,7% *K. pneumoniae*, 60% *E. faecalis* и устойчивы все штаммы *S. agalactiae* и *Gardnerella vaginalis*. Клиническая и микробиологическая эффективность санации влагалища при АВ отмечена у 9/69,2% женщин. Неудачи терапии касались БВ и АВ, вызванных УПМ, устойчивыми к фагогину (*G. vaginalis*, *S. agalactiae*). Гель фагогин позиционируется потенциально активным в отношении *Streptococcus* spp., поэтому можно полагать, что неэффективность в отношении *S. agalactiae* определяется отсутствием в его составе видоспецифичного набора бактериофагов.

Таким образом, для достижения большей эффективности использование геля «Фагогин» должна предварять проверка чувствительности этиологически значимых УПМ к фаговым компонентам геля.

## Распознавание клеточной поверхности N4-подобными вирусами

Прохоров Н.С., Риччио К., Назаров С.,  
Здоровенко Э.Л., Гуэрро-Феррейра Р.,  
Шнейдер М.М., Голомидова А.К., Татарский Е.В.,  
Гурко Е.В., Книрель Ю.А., Лейман П.Г., Летаров А.В.

Институт микробиологии им. С.Н.Виноградского ФИЦ  
Биотехнологии РАН, Москва, Российская Федерация;  
École polytechnique fédérale de Lausanne, Lausanne,  
Switzerland;  
Институт органической химии им. Н.Д.Зелинского РАН,  
Москва, Российская Федерация

Сейчас, когда появились первые адекватные оценки численности и генетического разнообразия бактериофагов, вирусы бактерий стали всерьез рассматриваться в качестве потенциального средства борьбы с патогенными бактериями с множественной лекарственной устойчивостью. Рациональное применение вирусов в качестве антибактериальных средств может быть основано только на глубоком понимании механизмов взаимодействия вирусов и их хозяев, определяющих специфический характер инфекции. Вопросы о том, как именно бактериофаги находят и связывают чувствительные клетки, и каким образом происходит принятие решения о введении вирусного генома в клетку, остаются одними из самых загадочных аспектов биологии бактериофагов.

Используя комбинацию биоинформационических, биохимических, биоинженерных подходов и структурного анализа, мы изучили молекулярные механизмы распознавания клеток чувствительного штамма *E. coli* 4s (O22) близкородственными N4-подобными подовирусами G7C и Alt63. Анализ геномов позволил сформулировать гипотезы об устройстве адсорбционных аппаратов. Генетический анализ устойчивых к фаговой инфекции мутантов 4s позволил показать вовлеченность липополисахаридов (ЛПС) в процесс инфекции в качестве первичных рецепторов проникновения. Биохимические тесты с применением рекомбинантных белков-компонентов адсорбционного аппарата и ЯМР-анализ продуктов взаимодействия выявили два альтернативных механизма модификации молекул ЛПС, необходимой для успешной инфекции этими фагами, – негидролитическое расщепление и деацетилирование ЛПС. Второй механизм представляется единственной альтернативой деполимеризации ЛПС при инфекции подовирусами, описанной до сих пор. Структура вириона и адсорбционного аппарата G7C была установлена путем криоэлектронной реконструкции. Все компоненты адсорбционных аппаратов G7C и Alt63 кристаллизованы, структуры белков определены методом рентгеноструктурного анализа. Установлена связь между полученными структурами и ферментативными функциями компонентов адсорбционных аппаратов.

Биоинформационический анализ геномных последовательностей бактериофагов и опубликованных структур компонентов фаговых адсорбционных аппаратов позволил выявить консервативные элементы G7C-подобного типа адсорбционных аппаратов не только у очевидно род-

ственных подовирусов, но и таких отдаленных представителей хвостатых фагов, как крупные миовирусы *Vil*, *CBA120* и даже бактериофаг *T4*.

## Биологические свойства выделенных из песка детских песочниц цитробактерных бактериофагов

Пульчевская Л.П., Васильев Д.А.,  
Золотухин С.Н., Ефрейторова Е.О.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Коллективом кафедры были проедены исследования по индикации и идентификации бактериофагов *Citrobacter* в песке детских песочниц поселка Октябрьский. Всего было обследовано 9 песочниц в результате проведенных исследований было выделено 8 штаммов фагов *Citrobacter*. У выделенных фагов были изучены основные биологические свойства: морфология негативных колоний, литическая активность, диапазон литической активности, специфичность.

Морфологию негативных колоний изучали при посевах фагов методом агаровых слоев по Грация на МПА. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, нами были разделены на два типа: 1 тип – прозрачные негативные колонии окружной формы с ровными краями. 0,5–1,0 мм в диаметре 5 фагов и 2-й тип – круглые колонии с ровными краями, в диаметре 2,0–2,5 мм прозрачные, без вторичного роста, с зоной неполного лизиса по периферии, ширина зоны 0,5 мм – 3 фага.

Выделенные бактериофаги обладали разной литической активностью. Ее оценивали по способности фага вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и плотных питательных средах и выражалось это тем максимальным разведением, в котором исследуемый бактериофаг проявлял свое литическое действие. Изучаемые фаги проявляли активность в пределах от  $1 \times 10^5$  до  $3,2 \times 10^9$ .

Для изучения диапазона литической активности, выделенных бактериофагов использовали 7 штаммов бактерий рода *Citrobacter* (из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы). Опыты показали, что изученные фаги характеризуются различным спектром литической активности.

Видовая специфичность фагов используется широко в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий. Определение проводили на агаровых средах путем нанесения фага на газон культуры. Бактериофаги были строго специфичны.

На основании полученных данных, выделенные бактериофаги можно использовать для проведения индикации и идентификации бактерий рода *Citrobacter* в различных объектах.

## **Молекулярно-генетическое типирование бактериофагов *Klebsiella pneumoniae* для фаготерапии и фагопрофилактики**

Рубальский Е.О., Аleshkin A.B., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Афанасьев С.С., Рубальский М.О.

Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;  
Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Российская Федерация

Одним из обязательных условий безопасности применения бактериофагов для лечебных и профилактических целей является вирулентная природа штаммов, входящих в состав препаратов. Наличие, по меньшей мере, одного умеренного штамма бактериофага в коктейле может привести к таким негативным последствиям, как распространение антибиотикоустойчивости, передача факторов патогенности бактерий, формирование устойчивых к фагам бактерий. Кроме того, в геномах вирулентных штаммов бактериофагов должны отсутствовать факторы патогенности бактерий.

Источниками умеренных фагов в препаратах могут быть как неверно охарактеризованные кандидатные штаммы бактериофагов, так и лизогенные культуры бактерий, на которых культивируются бактериофаги. Классические микробиологические методы индуктирования умеренных бактериофагов (нагревание, УФО, митомицин С) по нашим данным могут зачастую давать ложноотрицательные результаты, а, следовательно, не могут быть эффективным средством производственного контроля фагосодержащих препаратов.

В качестве примера эффективного контроля отсутствия умеренных фагов на различных этапах производственного процесса нами был исследован препарат против *Klebsiella pneumoniae*. В настоящее время известны кандидатные штаммы бактериофагов против *K. pneumoniae* во всех трех семействах порядка *Caudovirales*. Поэтому целью настоящего исследования было разработать универсальный методический подход к выявлению умеренных фагов.

В качестве основы разработанной методологии мы выбрали секвенирование вирусных метагеномов. Для ускоренного и достоверного выявления умеренных бактериофагов нами был разработан биоинформационный пайплайн, включающий оригинальную базу данных нежелательных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. В ходе исследования мы обнаружили в одном из коктейлей умеренный фаг рода P2virus. К гену этого фага, кодирующему интегразу, были подобраны специфические праймеры и проведена ПЦР для выявления и исключения источника умеренного фага, а также для контроля его отсутствия на последующих производственных этапах.

## **Особенности селекции фагов активных к *Klebsiella oxytoca***

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

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

Цель исследования заключалась в освоении метода селекции бактериофагов, активных в отношении бактерии *K. oxytoca* для их дальнейшего использования при разработке биопрепарата. В исследованиях использовали бактериофаги, выделенные из объекта внешней среды и активные в отношении штамма *K. oxytoca* № 1. Селекцию и повышение литической активности выделенных бактериофагов осуществляли с помощью пассирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой негативных колоний по методике предложенной Габриловичем И.М. (1992), Золотухиным С.Н. (2007), Ляшенко Е.А (2014).

Селекцию бактериофагов и повышение их литической активности проводили 5-кратным пассированием изолятов фагов с индикаторной культурой, засеянных методом агаровых слоев, с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний до получения популяции вирусов, имеющих однородные негативные колонии и стабильно высокий титр. Для этого готовили разведение выделенного фага в мясопептонном бульоне pH ( $7,1 \pm 0,1$ ) от  $10^{-6}$ – $10^{-9}$ . После 18-часового инкубирования в термостате, отливали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других не менее чем 5–10 мм и помещали в пробирку с мясопептонным бульоном, туда же вносили 18-часовую бульонную индикаторную культуру *K. oxytoca* в количестве 0,5 мл. Одновременно ставили мясопептонный бульон с индикаторной культурой без фага (контроль). Опытные и контрольные пробирки культивировали в термостате при 37°C в течение 4 ч (с наблюдением за изменениями каждый час). В случае появления изменений (просветление опытной пробирки по сравнению с контрольной), полученный фаголизат обрабатывали хлороформом в течение 30 мин и исследовали методом агаровых слоев. Если после 4-часового наблюдения, изменений зафиксировано не было, то опытные пробирки оставляли при комнатной температуре на 20 часов. После этого пробирки также обрабатывали хлороформом (1 : 10) и исследовали методом агаровых слоев. В ходе исследования, в каждом случае отбирали идентичную исходную негативную колонию и пассировали. Проводили до пяти пассирований, после чего селекцию считали законченной.

В результате проведенных исследований из объектов окружающей среды нами селекционированы два штамма бактериофага *K. oxytoca* 1.

## Изучение лизогении штаммов бактерий вида *Klebsiella oxytoca*

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

Ульяновская государственная сельскохозяйственная  
академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

Частота перехода профага в инфекционное состояние (умеренный фаг) может быть увеличена рядом индуцирующих агентов. По результатам наших предыдущих исследований некоторые штаммы бактерии вида *K. oxytoca*, полученные из музейной коллекции кафедры, являлись лизогенными (воздействие УФ-лучами, рентгеновскими лучами). Цель исследования заключалась в освоении метода выделения вирусов бактерий, активных в отношении *K. oxytoca* методом индукции. В работе использовали 2 штамма бактерий выделенных из внешней среды и типизированных как бактерии вида *K. oxytoca*.

Суточная культура изучаемых штаммов в пробирках с МПБ (4,5 мл) была подвергнута рентгеновскому облучению – II периода, каждый период по 1,6 сек., общая доза облучения – 4,0 миллизиверта. Рентгеновское облучение является более мощным по сравнению с ультрафиолетовым, так как для индукции фага нет необходимости в прямом контакте с бактерией. После облучения в данном режиме, пробирки инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Через сутки предполагаемый фаголизат (объемом 0,5 мл) стерильными пипетками высевали на 1,5% МПА сплошным газоном. Чашки Петри с МПА (20 мл) накануне опыта хорошо подсушивали, поскольку присутствие излишней влаги (в виде конденсата) способствуют искашению результатов исследования. Оставляли чашки в покое на 30–40 мин при комнатной температуре. Засеянные чашки инкубировали при 37°C. Учет результатов вели через 4, 8, 12, 16, 20 часов. В качестве контроля проводили посевы штаммов бактерий на МПА без облучения (сплошной бактериальный рост). Образование через 20 ч на газоне культуры негативных колоний свидетельствовало о наличие фага.

В ходе проведенных исследований, связанных с изучением влияния рентгеновского облучения на выделение вирусов бактерий, выделен один фаг, активный в отношении штамма *K. oxytoca*. Таким образом, данный метод нельзя отнести к универсальным методам по выделению фагов, но можно использовать в качестве возможного варианта.

## Особенности выделения вирулентных фагов активных к трибе *Klebsielleae*

Садрдинова Г.Р.<sup>1</sup>, Пульчевская Л.П.<sup>1</sup>,  
Ефрейторова Е.О.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Ляшенко Е.А.<sup>1</sup>, Павлова И.Б.<sup>2</sup>, Юдина Т.Г.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная  
академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский государственный университет  
им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Цель исследования заключалась в освоении метода выделения и селекции бактериофагов, активных в отношении бактерий, входящих в триб *Klebsielleae*: *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Hafnia*. Объектом исследования служили 10 проб песка (детская площадка).

Селекцию бактериофагов и повышение их лизической активности проводили 4-кратным пассированием изолятов фагов с индикаторной культурой, засеянных методом агаровых слоев, с периодическим пересевом типичных для данного изолята негативных колоний до получения популяции вирусов, имеющих однородные негативные колонии и стабильно высокий титр (по методике предложенной Габриловичем И.М. (1992), Пульчевской Л.П. (2004), Золотухиным С.Н. (2007), Ляшенко Е.А (2014)).

Для этого готовили разведение выделенного фага в МПБ от  $10^{-6}$ – $10^{-9}$ . После 20-часового инкубирования, отивали бактериологической петлей одну негативную колонию, расположенную изолированно от других и помещали в пробирку с МПБ, туда же вносили 20-часовую бульонную культуру индикаторных штаммов: *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16, *E. cloaceae* 397, *E. aerogenes* 654 в количестве 0,2 мл. Одновременно ставили МПБ с индикаторной культурой без фага (контроль). Пробирки культивировали при 37°C в течение 4 ч (с наблюдением за изменениями каждый час). В случае появления изменений (пропускление опытной пробирки по сравнению с контрольной), полученный фаголизат обрабатывали хлороформом (фаги активные в отношении штаммов *S. marcescens* ATCC 13800, *S. liquefaciens* 16) и температурой (фаги активные в отношении *K. oxytoca* ATCC 8724, *K. oxytoca* 26, *E. cloaceae* 397, *E. aerogenes* 654) в течение 30 мин и исследовали методом агаровых слоев. В ходе исследования, в каждом случае отбирали идентичную исходной негативную колонию и пассировали. Проводили до четырех пассирований, после чего селекцию считали законченной.

В результате проведенных исследований из объектов окружающей среды нами были выделены вирулентные штаммы, активные в отношении различных видов, входящих в триб *Klebsielleae*.

## Чувствительность клинических штаммов бактерий рода *Staphylococcus* spp. к поливалентному бактериофагу Секстофаг®

Сверкалова Д.Г., Карамышева Н.Н., Щербина А.А.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

В последнее время все чаще используются методы фаготерапии в связи с широким распространением штаммов резистентных к химиотерапевтическим препаратам. На сегодняшний день биотехнологическая промышленность выпускает широкий спектр фаговых препаратов, примером которых может служить поливалентный бактериофаг Секстофаг® ФГУП «НПО «Микроген».

В целях проверки клинической эффективности проводилось определение чувствительности клинических штаммов к поливалентному бактериофагу Секстофаг®.

Объектами исследования послужили пять клинических штаммов бактерий рода *Staphylococcus* spp., выделенных из гнойных ран, обладающие высокой устойчивостью к широко применяемым антибактериальным препаратам. Один из штаммов устойчив к метициллину.

Штаммы были проверены на чувствительность к поливалентному бактериофагу Секстофаг® стандартным методом агаровых слоев (А.Грациа, 1936). В результате чего, лизическая активность поливалентного бактериофага Секстофаг® для четырех клинических штаммов установлена в пределах от  $2,3 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$  до  $2,3 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$  БОЕ в 1 см<sup>3</sup>. Штамм, обладающий резистентностью к метициллину, показал устойчивость и к поливалентному бактериофагу.

Исходя из полученных результатов следует, что применение поливалентного бактериофага Секстофаг® может быть эффективным против резистентных к химиотерапевтическим препаратам клинических штаммов бактерий рода *Staphylococcus* spp.

## Возрастная динамика титра бактериофагов *E. coli* пищеварительного микробиоценоза гусят первых 45 дней жизни

Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А.

Северо-Кавказский НИИ животноводства, Краснодар, Российская Федерация;  
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, Пущино, Московская обл., Российская Федерация

Проведено исследование изменения титра бактериофагов *E. coli* (coli-фагов) пищеварительного микробиоценоза у 10 гусят в возрасте от рождения до 45 дней. Пробы отбирались индивидуально у каждой птицы, 12-кратно с интервалом 3–6 дней. Общее количество исследованных проб составило 120.

После отбора пробы взвешивались, ресуспендировались в буферном растворе с добавлением ингибиторов бактериального роста, центрифугировались. Из полученного супернатанта делали серию 100-кратных разведений, из которых производили высев на культуру лабораторного штамма *E. coli* В методом агаровых слоев с использованием твердой и мягкой агаризованных сред LB. После подсчета образовавшихся бляшек титр фагов в образце рассчитывали в Ig БОЕ/мл.

В результате исследования получена картина динамики титра коли-фагов у гусят первых 45 дней жизни, что представляет собой новые данные, полезные как для общего понимания становления пищеварительного микробиоценоза птиц в онтогенезе, так и для определения критических периодов развития при применении ветеринарных препаратов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №16-44-230855-p\_a.

## Аттенуация он-ДНК бактериофага phiX174 в штамме *E. coli* с мутацией в гене топоизомеразы IV

Смелкова О.И., Алешкин Г.И.,  
Воронина О.Л., Марков А.П.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Бактериофаг phiX174 является одним из наиболее вирулентных он-ДНК фагов семейства *Microviridae*, поражающих энтеробактерии родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*. Высокая вирулентность фага сочетается с лизогенией в клетках *E. coli*, что способствует отбору лизогенов, высоко резистентных к налидиксовой кислоте (NalR). Было показано, что причиной такого отбора является способность мутаций в генах гиразы и топоизомеразы IV, белков изменяющих топологию ДНК, не только вызывать NalR фенотип, но и снижать эффективность вирулентного цикла фага, увеличивая частоты отбора лизогенов.

**Цель работы.** Выяснить возможность аттенуации бактериофага phiX174 в NalR мутантах топоизомеразы IV и охарактеризовать особенности отбираемых мутантов фага.

**Материалы и методы.** Отбирали спонтанные мутанты топоизомеразы IV, резистентные к 90–120 мкг/мл налидиксовой кислоты, определяли эффективность титрования phiX174 на культурах мутантов. Выделяли и характеризовали клоны фагов, преодолевших снижение эффективности вирулентного цикла мутантными топоизомеразами IV.

**Результаты.** Все проверенные NalR мутанты *E. coli* снижали эффективность титрования phiX174 в 2–5 раз. Максимальное 10–50-кратное снижение эффективности получено в мутанте NalR90-UVS при инкубации с налидиксовой кислотой. Особенностями мутанта NalR90-UVS топоизомеразы IV являются чувствительность к УФ-свету, дефект SOS-репликации и мутагенеза. Высокий уровень снижения

эффективности вирулентного цикла phiX174 у мутантов наблюдается только при инкубации с налидиксовой кислотой. На культуре NaIR90-UVS были выделены клоны мутантов фага phiX174VR1 и phiX174VS2, типичные для двух типов отбираемых аттенуированных мутантов. Клон phiX174VR1 сохранил скорость размножения фага дикого типа, в отличие от phiX174VS2, обладающего сниженной скоростью размножения, пятикратно сниженной величиной и измененной морфологией негативных колоний фага. Проводится секвенирование геномов аттенуированных мутантов.

**Выводы.** Мутации NaIR90-UVS в гене топоизомеразы IV приводят к аттенуации бактериофага phiX174, происходящей с высокой частотой. Аттенуированные мутанты фага делятся по свойствам на два класса, один из которых обладает сниженной скоростью размножения и измененной морфологией негативных колоний фага. Предложенная модель аттенуации фага в клетках с дефектной топоизомеразой IV, может быть использована для других он-ДНК вирусов.

## Листериозные бактериофаги – как средство индикации и идентификации *L. monocytogenes*

Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ковалева Е.Н., Щербина А.А.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация

На сегодняшний день листериоз имеет важное эпидемиологическое и эпизоотологическое значение в первую очередь как пищевая инфекция людей. Рассмотрение листериоза в данном ракурсе можно объяснить как биологическими особенностями листерий, так и появившимся в последнее время широким спектром продуктов питания человека, в том числе растительного происхождения, которые употребляются в необработанном виде.

Не смотря на это, индикация и идентификация листерий базируется, преимущественно, на бактериологических и серологических методах, что сопряжено с негативным фактором – длительностью исследования. Это вызывает необходимость разработки более эффективных и менее трудоемких методов индикации и идентификации листерий.

Применение листериозных бактериофагов, которые благодаря специфиности действия можно использовать для индикации и идентификации листерий, отчасти решает эту проблему.

С этой целью мы разработали оптимальную схему выделения листериозных бактериофагов методом индукции и изучили основные биологические свойства полученных изолятов фагов.

Оптимальная схема выделения листериозных бактериофагов – это метод индукции из лизогенных культур с помощью УФ-лучей. Нами экспериментально установлено, что для облучения наилучшим образом подходит жидкая слабощелочная среда, время экспозиции – 30 с, расстояние до источника излучения – 40 см. При помощи данной схемы нам выделено 3 бактериофага – L.m 1, L.m 2

и L.m 12 из лизогенных штаммов L.m. № 766, L.m.№ 9-130 и L.m. 1196 соответственно и изучены их основные биологические свойства. Выделенные бактериофаги обладают литической активностью в диапазоне от  $10^{-6}$  до  $10^{-7}$ , по методу Аппельмана и от  $1 \times 10^6$  до  $2 \times 10^7$  фаговых корпускул в 1 мл по методу Грациа. В результате изучения бактериофагов L.m 1 и L.m 2 по отношению к представителям других родов (*Erysipelothrix*, *Jonesia*, *Staphylococcus*) и видов рода *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. murayi*, *L. grayi*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*) установлено, что данные фаги лизировали только бактерии вида *L. monocytogenes*. Спектр литической активности фагов находится в пределах от 37,5 до 62,5% из числа исследуемых штаммов. С помощью данного набора бактериофагов мы типировали до 93% исследуемых культур, что позволяет применять данные фаги для индикации и идентификации бактерий вида *L. monocytogenes*.

## Изоляция МБфагов из объектов внешней среды и биологического материала

Сырым Н.С., Еспембетов Б.А.

НИИ проблем биологической безопасности,  
пгт. Гвардейский, Кордайский район,  
Жамбылская область, Республика Казахстан

Задачи дальнейшего развития животноводства, увеличения поголовья животных и резкого повышения их продуктивности, особенно в условиях организации крупных хозяйств на промышленной основе, требуют от научных работников разработать всех возможных способов и средств обеспечения ветеринарного благополучия хозяйств. Одним из наиболее перспективных подходов для таких случаев является использование микробактериофаги (МБфаг).

Целью данной работы является изоляция МБфагов из объектов внешней среды и биологического материала и в дальнейшем использование его в разработке противоберкулезного эффективного средства.

Для выполнения данной задачи были использованы пробы, взятые из объектов внешней среды животноводческих помещений и биологический материал. В качестве тест-культур были использованы культуры микробактерий туберкулеза. Для культивирования МБфагов были использованы питательные среды: Dubos Broth Base и Dubos Oleic Agar Base.

В начале опыта нами были выбраны и освежены тест-культуры микробактерий для обогащения и проверки специфичности литического действия при выделении МБфага.

Экспериментальные исследования, по выделению МБфагов, активных в отношении микробактерий туберкулеза было проведено из собранных из различных областей Казахстана 3360 образцов, в том числе биоматериал от крупного рогатого скота – 1682 и пробы из объектов внешней среды – 1678

Опыты по выделению МБфагов проведены двумя методами:

1 метод – исследуемый материал после соответствующей подготовки были пропущены через стерилизующие фильтры CN – 115 ml 0,2 $\mu$ ; 150 ml 0,45 $\mu$ ; 150 ml 0,8 $\mu$ .

2 метод – исследуемые материалы были инкубированы в питательной среде в течение 1,5–2 мес с еженедельным обогащением густой взвесью тест-культур микобактерий и затем полученные смеси были подвергнуты фильтрованию с использованием выше указанных фильтров, в последующем были испытаны на наличие в фильтратах МБфагов. В результате выше указанный метод позволил выделить – 24 МБфага, лизирующие атипичные микобактерии из объектов внешней среды доставленных из выше указанных областей.

### **Бактериофаги специфичные к *Stenotrophomonas maltophilia***

Тикунов А.Ю., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Кретьен С.О., Саранина И.В., Власов В.В., Тикунова Н.В.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Российская Федерация

*Stenotrophomonas maltophilia* – распространенная повсеместно свободноживущая бактерия, принадлежащая к семейству *Xanthomonadaceae*. В ряде случаев она вызывает больничные инфекции, особенно у находящихся в отделениях реанимации больных, – пневмонию, инфекции мочевых путей, раневую инфекцию, перитонит, холангит, менингит, сепсис, эндокардит. *S. maltophilia* устойчива ко многим антибиотикам за счет низкой проницаемости наружной мембранны и индуцируемого синтеза бета-лактамаз, что сильно ограничивает возможность проведения эффективной антибактериальной терапии. В качестве антибактериального средства против *S. maltophilia* могут использоваться препараты бактериофагов, которые могут быть использованы как отдельно, так и в сочетании с антибиотикотерапией. В коммерческих препаратах бактериофагов, разрешенных к применению в Российской Федерации, бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении *S. maltophilia*, отсутствуют. Цель работы – отбор и исследование бактериофагов, специфичных к *S. maltophilia*.

На первом этапе из клинических образцов, полученных от больных с парапротезной инфекцией, изолировали десять штаммов *S. maltophilia*. Таксономическая принадлежность штаммов была подтверждена секвенированием гена 16S рРНК. Все эти штаммы обладали резистентностью к карбапенемам, монобактамам, нитрофуранам, цефалоспоринам; четыре штамма также были резистентны к тикарциллину/ клавуланату и ко-тримоксазолу.

Всего из клинических образцов было изолировано семь бактериофагов, специфичных к *S. maltophilia*, и исследованы их литические свойства. Два из семи бактериофагов, SM4 и SM5, обладали широким спектром литической активности против штаммов *S. maltophilia*. Для бактериофага SM4, обладающего высокой литической активностью, проведено полногеномое секвенирование. Размер генома SM4 составил 42682 н.п., наиболее близкая к нему фаговая последовательность, депонированная в базе данных GenBank, принадлежит бактериофагу vB\_Pae\_PS9N [KM434185].

### **Бактериофаги, специфичные к бактериям рода *Acinetobacter***

Тикунова Н.В., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Власов В.В.

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

Бактерии рода *Acinetobacter* – это свободноживущие сапрофитные грамотрицательные бактерии, принадлежащие к семейству *Moraxellaceae*. Ацинетобактерии могут являться возбудителями внутрибольничных инфекций и вследствие природной множественной резистентности к антибиотикам представляют серьезную проблему в клинической практике. В качестве альтернативы антибиотикам или в сочетании с ними, против бактерий рода *Acinetobacter* могут быть использованы препараты бактериофагов. Однако, в коммерческих препаратах бактериофагов, разрешенных к применению в Российской Федерации, бактериофаги, обладающие литической активностью в отношении ацинетобактерий, отсутствуют. Цель работы – отбор и исследование бактериофагов, специфичных к бактериям рода *Acinetobacter*.

Видовую идентификацию штаммов *Acinetobacter*, изолированных из клинических образцов, проводили по результатам секвенирования гена 16S рРНК с использованием базы данных NCBI GenBank. В результате анализа клинических образцов выявлено 16 штаммов, относящихся к *A. baumannii/calcoaceticus* complex, 4 штамма *A. junii* и 2 штамма *A. pittii*. При анализе антибиотикорезистентности штаммы *A. junii* и *A. pittii* оказались чувствительны ко всем использованным антибиотикам. Семь штаммов *A. baumannii/calcoaceticus* complex были устойчивы к десяти и более антибиотикам. Кроме того, из клинических образцов были изолированы 5 бактериофагов специфичных к ацинетобактериям. Все бактериофаги оказались специфичными к только к штаммам комплекса *A. baumannii/calcoaceticus*, причем три бактериофага обладали широким спектром действия, а два бактериофага были узкоспецифичны. Определены и проанализированы полногеномные последовательности изолированных бактериофагов. Большинство антибиотикорезистентных штаммов комплекса *A. baumannii/calcoaceticus* были чувствительны к бактериофагам.

### **Влияние фаговых препаратов на процесс формирования биопленок**

Толордава Э.Р., Романова Ю.М.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф.Гамалеи, Москва, Российская Федерация

Одной из актуальных проблем современной медицины остаются хронические инфекции, одной из основных причин которых является образование бактериями биопленок. В связи с этим, лечение хронических инфекций в настоящее время уже не может основываться на традици-

онной концепции микробиологии. Новые представления о биопленках требуют изменения подходов к диагностике и лечению инфекций в самых различных областях медицины. Из-за проблем множественной резистентности возбудителей к антибиотикам в последние годы вновь возник интерес к возможностям терапевтического использования бактериофагов.

Мы изучили действие известных коммерческих фаговых препаратов «Секстафаг» и «Бактериофаг колипротейный» на процесс формирования биопленок клетками клинического изолята *Escherichia coli*, выделенного из мочевых камней. Выбранный нами клинический изолят был чувствителен к фаговому препарату «Бактериофаг колипротейный» и в то же время являлся резистентным по отношению к препарату «Секстафаг».

В результате исследований выявлена зависимость формирования биопленки от количества добавленного фага. Оказалось, что бактериофаговый препарат «Бактериофаг колипротейный» в титре ниже  $10^3$  БОЕ/мл стимулирует образование биопленки *Escherichia coli* по сравнению с контролем без добавления фага. Более того, образование биопленки стимулирует и фаговый препарат «Секстафаг», к которому исследуемый клинический изолят резистентен.

В связи с тем, что образование биопленок патогенными бактериями является одной из главных причин формирования хронических очагов инфекции, необходимо при применении фаговых препаратов обращать пристальное внимание на подбор дозировок. Нами было показано, что, несмотря на чувствительность или резистентность тестируемого микроорганизма к фаговым препаратам, применение фага в низких концентрациях, может значительно стимулировать образование биопленок.

## Выделение и селекция бактериофагов *Bacillus coagulans*

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Белова К.В.<sup>1</sup>, Шокина К.В.<sup>1</sup>, Лыдина М.А.<sup>1</sup>,  
Маслюкова К.В.<sup>1</sup>, Аleshkin A.B.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация

По литературным данным плоско-кислую порчу вызывают термоустойчивые бактерии *Bacillus coagulans*, иногда в ассоциации мезофильными и термофильными микроорганизмами *B. cereus*, *B. subtilis*. Однако, термическое воздействие и низкий водородный показатель во время варки приводит к значительному снижению уровня бактериальной обсемененности томатной заливки. На этапе выходного (приемочного) контроля возникает проблема индикации и идентификации *B. coagulans*. С этой целью можно использовать специфичные бакте-

риофаги, позволяющие достоверно идентифицировать пищевые контаминанты и проводить их дифференциацию на биотипы и фаговары внутри вида.

В результате проведенных исследований было выделено 7 бактериофагов *B. coagulans* из объектов окружающей среды. Метод индукции показал отрицательные результаты эксперимента – профаг у бактерий *B. coagulans* 566, *B. coagulans* 10473, *B. coagulans* 10468 не был выявлен.

Селекцию бактериофагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясо-пептонном агаре с перевиванием на мясо-пептонный бульон. Оптимальное соотношение – 1 : 1, т.е. 0,2 мл фага на 0,2 мл индикаторной культуры. Время пассажа – 7 часов инкубирования при температуре  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . Для очистки фагов от бактериальных клеток применяли три метода: обработка хлороформом (трихлорметаном), прогревание и фильтрация с применением мембранных фильтров. Установлено, выделенные и селекционированные авторами бактериофаги устойчивы к воздействию температуры в диапазоне  $57\text{--}90^\circ\text{C}$  в течение 30 мин, поэтому данный способ невозможно применять для очистки фагов. Фаги *B. coagulans* показали различную чувствительность к воздействию хлороформа: В.с. – 1 УГСХА и В.с. – 2 УГСХА не устойчивы к его воздействию, остальные фаги устойчивы в течение 15 мин. Но применять данный способ очистки не совсем целесообразно, так как он длителен и материальноемок. Эмпирическим путем установлено, что применение фильтров фирмы Millipore с диаметром 0,1  $\mu\text{m}$  GV наиболее предпочтительно. Полученные результаты свидетельствуют, что изучаемые бактериофаги, строго специфичны в пределах вида *B. coagulans* и, в перспективе, могут входить в состав биопрепарата для его индикации и идентификации.

## Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага для сибиреязвенного бактериофага

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Белова К.В.<sup>1</sup>, Климушкин Е.И.<sup>1</sup>, Калдыркаев А.И.<sup>1</sup>,  
Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация

В специальной литературе описано несколько методов по индикации *Bacillus anthracis*, основанных на применении специфических бактериофагов. Для выявления возбудителя сибирской язвы используют следующие методы фагоиндикации: реакция нарастания титра фага (РНФ), реакция адсорбции фага (РАФ), фаготетразоловый метод (ФТМ) и люминесцентно-серологический метод (ЛЮМ).

Все вышеописанные методики, кроме РНФ, требуют определенных материальных затрат (химические реактивы, дополнительное оборудование), поэтому с целью фагоиндикации возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды, мы планируем разработать параметры постановки именно этой реакции (количественный показатель реакции, имеющий диагностическое значение, и оптимальное время, обеспечивающее полноценное взаимодействие фага с бактериями).

Опытным путем нами было установлено, что предварительное подращивание материала во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре ( $36 \pm 1$ ) $^{\circ}$ С в промежутке времени (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить бактерий *B. anthracis* при постановке РНФ в концентрации  $10^3$  м.к./мл. Аналогичную концентрацию бактерий возможно выявить при постановке РНФ без предварительного подращивания исследуемого материала при временной экспозиции культивирования (фаг + индикаторная культура) равной 5 часам. Таким образом, временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ составляет: 30 мин (закладка опыта) + 5 ч (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 ч (время культивирования посевов) = 24 ч. Подращивание исследуемого материала не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется.

Полученные экспериментальным путем данные позволяют утверждать, что при заданных параметрах происходит увеличение количества бляшкообразующих единиц в 5 раз, что имеет диагностическое значение при индикации возбудителя сибирской язвы методом постановки реакции нарастания титра фага.

## Биологические свойства сибириязвенного бактериофага

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>,  
Золотухин С.Н.<sup>1</sup>, Белова К.В.<sup>1</sup>, Климушкин Е.И.<sup>1</sup>,  
Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация

Проведенные исследования по изучению основных показателей биологических свойств сибириязвенного бактериофага, выделенного коллективом авторов в 2015 г., позволили установить, что изучаемый бактериофаг при культивировании на различных штаммах *B. anthracis* имеет литическую активность, которая не изменяется при хранении в условиях бытового холодильника (2–4 $^{\circ}$ С) без добавления консерванта в течение 9 мес.

Установлено, что выделенный и селекционированный бактериофаг строго специчен в пределах вида

*B. anthracis* (опыт демонстрирует, что спектр литического действия изучаемого сибириязвенного бактериофага на четырех штаммах – вакциные штаммы *B. anthracis*-СТИ и *B. anthracis* 55-ВНИИВВиМ, авирulentные штаммы *B. anthracis* – Шuya-15 и *B. anthracis* 34 F2 составляет 100%) и не лизирует культуры *B. subtilis* – 6 штаммов, *B. mycoides* – 12 штаммов, *B. megaterium* – 5 штаммов, *B. cereus* и *B. thuringiensis* – 52 штамма, *B. pumilus* – 8 штаммов, *B. coagulans* – 3 штамма. Выше названные характеристики сибириязвенного бактериофага свидетельствуют, что он может быть использован для конструирования биопрепарата по фагоиндикации и фагоидентификации бактерий *B. anthracis*.

На основании полученных данных установлено, что в качестве перспективного производственного штамма рекомендуется применять штамм *B. anthracis* Шuya-15, на котором при высеве на МПА образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром, что чрезвычайно важно при визуальном подсчете колоний в случае постановки реакции нарастания титра фага. Культивирование изучаемого бактериофага на вышеназванном штамме дает литическую активность –  $1,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$  БОЕ в 1 мл фаголизата. При аналогичных исследованиях показатель на штамме *B. anthracis* 34 F2 составляет  $3,0 \times 10^8 \pm 0,1 \times 10^8$  БОЕ в 1 мл фаголизата. Однако, визуальная характеристика негативных колоний фага, полученных на индикаторной культуре, возможно, затруднит оценку результатов в реакции нарастания титра фага. Поэтому применение штамма *B. anthracis* 34 F2 в качестве перспективного и производственного возможно при условии сравнения показателей в случае постановки реакции нарастания титра фага на обоих штаммах.

## Схема идентификации *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Макеев В.А.<sup>1</sup>, Калдыркаев А.И.<sup>1</sup>, Маслюкова К.В.,  
Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация

Используя систему биохимических тестов, предложенных для типирования в ГОСТ 1044.8-88 и схемах дифференциации бактерий рода *Bacillus* (Смирнов, 1982), мы столкнулись с рядом недостатков: с проблемой вариабельности биохимических признаков бактерий *B. cereus* и *B. mycoides* и, соответственно, с высокой вероятностью недостоверного результата.

В результате анализа литературных данных, а также собственных исследований, нами была сформирована

схема с идентификационными тестами, позволяющими с наибольшей достоверностью идентифицировать бактерии до вида. Первоначально оригинальную схему тестировали на искусственно контаминированных объектах санитарного надзора для выявления оптимальных временных и температурных параметров. Разработанная нами схема выделения и идентификации бактерий *B. cereus* и *B. mycoides* включает несколько этапов. Исследуемый материал делится на 2 группы в зависимости от того, в какой форме (споровой или вегетативной) находятся бактерии рода *Bacillus*:

- первая группа – почва, продукты питания с явными признаками порчи, пищевые продукты с пониженным содержанием влаги (содержат в основном споровую форму бактерий рода *Bacillus*);
- вторая группа – свежие пищевые продукты, патологический материал, раневой экссудат, экскременты (содержат в основном вегетативную форму бактерий рода *Bacillus*).

Затем исследования проводили на объектах санитарного надзора. Анализируя полученные данные, необходимо отметить, что наибольшее количество штаммов бактерий *B. cereus* и *B. mycoides* выделено из проб почвы со слабо протекающими процессами минерализации органических веществ, для которых необходим органический азот. В этом проявляется коррелирующая связь физиологии микроорганизмов со свойствами среды их обитания.

Применяя предложенную нами схему выделения и идентификации бактерий *B. cereus* и *B. mycoides*, включающую 30 биохимических тестов и метод фагоидентификации, характеристику по культуральным свойствам, мы за пятилетний период работы исследовали 536 проб объектов санитарного надзора, полученных в Приволжском и Южном федеральном округах Российской Федерации.

## Фагоиндикация *Bacillus anthracis* в мясном сырье

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>,  
Золотухин С.Н.<sup>1</sup>, Белова К.В.<sup>1</sup>, Шокина К.В.<sup>1</sup>,  
Лыдина М.А.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>,  
Павлова И.Б.<sup>4</sup>, Юдина Т.Г.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация;

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Проведены исследования по подбору параметров постановки реакции нарастания титра (РНФ) фага с сибиреязвенным бактериофагом, выделенным коллективом авторов в 2015 г. в мясном сырье. Использовали мясной фарш (соотношение 1 : 1 свинины и говядины). Титр фага

для постановки реакции  $10^2$  и  $10^3$  БОЕ/мл. Пробоподготовка: соотношение фарша и стерильного-мясопептонного бульона 1 : 10, количество индикаторной культуры для искусственной контаминации фарша – 5 мл).

Экспериментальным методом определено, что предварительное подращивание исследуемого материала с искусственно внесенной индикаторной культурой (концентрация бактерий  $10^5$ – $10^3$  КОЕ/мл) во временной экспозиции (5, 16, 24 ч) и культивирование посевов в условиях термостата при температуре ( $36 \pm 1$ )°С в течение (5, 10, 15, 24 ч) позволяет обнаружить индикаторные бактерии *B. anthracis* при постановке реакции нарастания титра фага в концентрации  $10^5$ – $10^3$  КОЕ/мл. Аналогичная концентрация индикаторной культуры была выявлена при постановке РНФ, не применяя этапа «подращивания исследуемого материала», при временной экспозиции культивирования (фаг + индикаторная культура) равной 5 часам. Подращивание исследуемого материала (мясного сырья) не повышает чувствительность реакции, поэтому использовать его не рекомендуется. Установлено, затраты времени на фагоиндикацию *B. anthracis* при постановке РНФ составляет 24 ч (30 мин (закладка опыта) + 5 часов (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 ч (время культивирования посевов).

Данные эксперимента позволяют утверждать, что при установленных параметрах происходит увеличение количества бляшкообразующих единиц в 5 раз и более при исходной концентрации бактерий  $10^5$ – $10^3$  КОЕ/мл в мясном сырье, что имеет диагностическое значение при индикации возбудителя сибирской язвы методом постановки реакции нарастания титра фага.

## Методы идентификации *Bacillus coagulans*, включая фагоидентификацию

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>,  
Золотухин С.Н.<sup>1</sup>, Белова К.В.<sup>1</sup>, Шокина К.В.<sup>1</sup>,  
Лыдина М.А.<sup>1</sup>, Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>,  
Павлова И.Б.<sup>4</sup>, Юдина Т.Г.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация;

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

На наличие бактерий *Bacillus coagulans* было проанализировано 17 проб продуктов питания с явно выраженными признаками плоско-кислой порчи.

Для типирования выделенных культур мы применяли ключ R.A.Slepecky, H.T.Nemphill, разработанный для первичной дифференциации бактерий родов *Bacillus* и *Paenibacillus*. Алгоритм применения ключа: при положи-

тельном или результате определения какого-либо биохимического свойства следующий этап, рекомендованный авторами, обозначен арабской цифрой по горизонтали и отражен буквенным обозначением по вертикали. Заключительным этапом дифференциации по ключу служит название вида микроорганизма.

Параллельно мы проводили исследования по дифференциации выделенных бактерий по схеме выделения и дифференциации бацилл первой морфологической группы по классической методике, составляющей основу идентификационных тестов для бактерий рода *Bacillus* в «Определителе бактерий Берджи».

В результате исследований нами было выделено 5 штаммов бактерий, которые были отнесены к виду *Bacillus coagulans*. С целью оптимизации процесса идентификации бацилл, выделенных из продуктов питания, мы использовали специфические бактериофаги *Bacillus coagulans*, выделенных и селекционированных нами ранее по отработанной методике фагоидентификации методом «стекающая капля». В исследованиях применяли 7 бактериофагов *Bacillus coagulans*, выделенных из объектов внешней среды в 2016 г. Установлено, что выделенные культуры, отнесенные на основании изучения их биохимических свойств к виду *Bacillus coagulans*, были лизированы специфическими бактериофагами.

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности применения специфических бактериофаговых препаратов с целью типирования бактерий *Bacillus coagulans*, так как сокращение время исследования и снижение трудозатрат на фоне экономии дорогостоящих питательных сред и реагентов, не снижает качества исследования, что было продемонстрировано нами в данном эксперименте.

## Фагоиндикация *Bacillus anthracis* методом реакции нарастания титра фага

Феоктистова Н.А.<sup>1</sup>, Васильев Д.А.<sup>1</sup>, Золотухин С.Н.<sup>1</sup>,  
Белова К.В.<sup>1</sup>, Климушкин Е.И.<sup>1</sup>, Лыдина М.А.<sup>1</sup>,  
Алешкин А.В.<sup>2</sup>, Шморгун Б.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Российская Федерация

На практике методы детекции патогенов сложны в исполнении. Это связано с относительно низкой концентрацией обнаруживаемых бактерий в анализируемой пробе. Вторым фактором, затрудняющим детекцию инфекционных агентов, является наличие посторонней микрофлоры, в том числе и близкородственной, обладающей значительным уровнем антигенного родства. Например, межвидовые антигенные различия *B. anthracis* и других представителей этого рода (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*) минимальны.

Усовершенствование многократно апробированных и разработка новых методов индикации *B. anthracis* в пробах почвы являются актуальной темой исследований.

С учетом вышеуказанных трудностей индикации патогенов в объектах санитарного надзора был предложен метод (реакция нарастания титра фага).

Экспериментальным образом нами была доказана эффективность применения реакции нарастания титра фага с целью индикации возбудителя сибирской язвы в пробах почв, принадлежащих к различным типам, которые имеют соответственно разные водородные показатели. Нами определено, что пробы Оренбургской области относятся к черноземам – pH 6,3; пробы почвы из Астраханской области – это светло-каштановые почвы с pH -7,4; пробы почвы Ульяновской области – это серые лесные почвы, водородный показатель которых составил 5,2. Установлено, что сибириязвенный бактериофаг способен к циклу внутриклеточного развития в ранее определенных авторским коллективом параметрах при изменении водородного показателя в довольно широком диапазоне – pH 3,4–8,2. Эмпирически нами была доказана возможность постановки реакции нарастания титра фага с целью индикации 10<sup>3</sup> м.к./г возбудителя сибирской язвы в пробах почв, принадлежащих к различным типам, без выделения чистой культуры возбудителя. Временной интервал, затрачиваемый на постановку РНФ, составляет 24 ч = 30 мин (закладка опыта) + 5 ч (время культивирования посевов) + 30 мин (посев методом Грациа) + 18 ч (время культивирования посевов).

## Разработка схемы фаготипирования штаммов *Bacillus anthracis*

Цыганкова О.И., Головинская Т.М.

Ставропольский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Чувствительность культур *B. anthracis* к литическому действию различных специфических сибириязвенных бактериофагов лежит в основе одного из основных тестов идентификации и зависит как от биологических свойств фагов, так и от индивидуальных особенностей штаммов *B. anthracis*. Схема фаготипирования не разработана для изучения штаммов *B. anthracis*.

Целью работы явился выбор минимального набора специфических бактериофагов для одновременной идентификации сибириязвенных штаммов и выявления различий по фагочувствительности.

С этой целью изучали спектр литической активности сибириязвенных бактериофагов Fah – ВНИИВВим, R/D-Ph-6, Гамма А-26, ВА-9, Саратов, К ВИЭВ и 186 по отношению к 114 штаммам *B. anthracis*.

Анализ полученных результатов позволил по широте литического спектра разделить перечисленные бактериофаги на две группы: 1 – бактериофаги Гамма А-26, ВА-9, R/D-Ph-6, лизирующие 99,1% штаммов *B. anthracis*; 2 – 186, Fah-ВНИИВВим, К ВИЭВ, Саратов, лизирующие 59,6–65,8% этих же штаммов.

Исходя из этого, оптимальным представляется подбор и одновременное применение бактериофагов с различной широтой литического спектра, один из которых лизирует все культуры *B. anthracis* и обеспечивает надежность теста идентификации сибириязвенных штаммов, а второй, проявляя избирательность в литическом действии по отношению к части культур, имеющих сходные свойства, способен эффективно выявлять эти различия. Предпочтение в применении для фаготипирования штаммов сибириязвенного микробы было отдано наиболее характерным представителям двух групп бактериофагов Гамма А-26 и 186. Чувствительность изучаемой культуры хотя бы к одному из них следует считать как положительный идентификационный тест. В зависимости от наличия чувствительности к литическому действию обоих бактериофагов или одного из них определяется один из 3 фаготипов:

- фаготип 1 – культура чувствительна к обоим бактериофагам;
- фаготип 2 – культура чувствительна только к бактериофагу Гамма А-26;
- фаготип 3 – культура чувствительна только к бактериофагу 186.

При фаготипировании предлагаемым методом 114 штаммов *B. anthracis* идентификационный тест был положителен у всех штаммов, к фаготипу 1 принадлежали 74,6%, к фаготипу 2 – 24,5% и к фаготипу 3 – 0,9% исследованных штаммов. Наиболее типичными являются штаммы, относящиеся к фаготипу 1. Штаммы фаготипов 2 и 3 представляют интерес для всестороннего изучения фенотипических свойств.

---

## Биологические особенности фагорезистентных вариантов штамма *Bacillus anthracis* 44/1 с нарушениями простания спор в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub>

Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Головинская Т.М.

Ставропольский противочумный институт  
Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Чувствительность *B. anthracis* к специфическим сибириязвенным бактериофагам, как и все фенотипические свойства, подвержена вариабельности. При изучении вариантов штамма *B. anthracis* 44/1, выделенных по признаку резистентности к бактериофагам Гамма А-26, ВА-9, К ВИЭВ среди 11 вариантов штамма *B. anthracis* 44/1, резистентных к бактериофагу К ВИЭВ, у 9 споры были не способны прорастать в атмосфере повышенного содержания CO<sub>2</sub> на сывороточно-содовом агаре.

Дозой 10<sup>3</sup> спор вариантов *B. anthracis* 44/1 RK1 и RK4 заражали по 3 белых мыши подкожно. От варианта *B. anthracis* 44/1 RK4 не погибла ни одна мышь, а из забитых животных культуры выделено не было. Вариант *B. anthracis* 44/1 RK1 также не вызвал гибели мышей, но от одной из них, забитой через 10 сут, из места введения была выделена культура, которую после получения спор

использовали для последующего заражения. В двух следующих пассажах заражающая доза была увеличена до 5 × 10<sup>7</sup> спор. Животные погибали через 2–6 сут, а одно из них на третьем пассаже было забито через 10 сут после заражения. От всех животных были выделены культуры, в основном из места введения. Все полученные варианты культуры *B. anthracis* 44/1 RK1 при посеве в виде спор не давали роста на сывороточно-бикарбонатном агаре при содержании 50 % CO<sub>2</sub> в атмосфере инкубирования. Посевы вегетативной культуры в этих условиях давали скучный рост, за исключением 2 вариантов, полученных на третьем пассаже, которые хорошо росли в капсульной форме. При внутрибрюшинном заражении белых мышей дозой 2 × 10<sup>7</sup> спор варианта *B. anthracis* 44/1 RK1 в мазках из брюшной полости животных, забитых через 2,3,6 и 24 ч после заражения, не было обнаружено вегетативной культуры ни внутри фагоцитов, ни вне клеток.

Учитывая, что все такого типа варианты штамма *B. anthracis* 44/1 были выделены по признаку устойчивости к действию бактериофага К ВИЭВ, мы изучили способность к росту в условиях повышенного содержания CO<sub>2</sub> вариантов других 6 штаммов *B. anthracis*: 71/12, 228, 1035/51, 81/1, 14/41, 1173, 1174, 12/16, выделенных по этому же признаку. Среди них не было обнаружено культур с аналогичными свойствами. Вероятно, в исследованной популяции штамма *B. anthracis* 44/1 особи с указанными свойствами находились в значительной концентрации, что позволило параллельно выделить 9 таких культур, а сочетание чувствительности к повышенным концентрациям CO<sub>2</sub> с резистентностью к фагу К ВИЭВ было случайным.

---

## Второй активный центр в эндолитической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ

Чертков О.В.<sup>1</sup>, Армееев Г.А.<sup>2</sup>, Легоцкий С.А.<sup>3</sup>,  
Шайтан А.К.<sup>2</sup>, Клячко Н.Л.<sup>3</sup>, Мирошников К.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского  
государственного университета им. М.В.Ломоносова,  
Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Химический факультет Московского государственного  
университета им. М.В.Ломоносова, Москва,  
Российская Федерация

Литические трансгликозилазы – распространенный тип пептидогликан-лизирующих ферментов, расщепляющих гетерополимеры клеточных стенок бактерий в процессе клеточного метаболизма или инфекции бактериофагом. Общепринятый молекулярный механизм действия трансгликозилаз предполагает участие в активном центре фермента лишь одного аминокислотного остатка Glu или Asp.

Эндолизин gp144 бактериофага phiKZ *Pseudomonas aeruginosa* принадлежит к группе грамотрицательных трансгликозилаз с модульным строением и С-концевым

расположением каталитического домена. Предсказанную роль каталитического аминокислотного остатка в его структуре выполняет Glu115. Однако замена этого остатка не приводит к полной деактивации фермента, активность мутантного белка составляет около 50% от активности фермента дикого типа.

В данной работе мы предположили, что в полипептидной цепи трансгликозилазы phiKZ gp144 существует два активных центра: основной E115/Y197 и дублирующий E178/Y147. Участок молекулы пептидогликана может связаться с бороздкой на глобуле фермента двумя способами и направление субстрата определяет какой из активных центров проведет реакцию деградации. Направленный мутагенез выявил участие в каталитическом механизме остатка Tyr197. Были получены одиночные и двойные точечные мутанты E115A, E178A, E115A/E178A, E115A/Y197F. Одиночные, точечные мутанты сохраняли активность на уровне 50% активности дикого типа. Двойной мутант E115A/E178A не проявляет активности, так как произведена замена атакующих остатков глутамата в обоих реакционных центрах. Мутант E115A/Y197F не обладает активностью, хотя один из реакционных центров остался в нативном состоянии. Двойная мутация близкорасположенных аминокислот привела к сильному изменению конформации связывающей субстрат поверхности, а также смене заряда в этой области бороздки, что вероятно, не позволяет ферменту связывать субстрат. Наличие дублирующего активного центра, а также изменение заряда поверхности и структуры одиночных и двойных точечных мутантов было подтверждено методами компьютерного моделирования и молекулярной динамики конформационных изменений.

Полученные в этой работе данные подтверждают гипотезу о наличии двух активных центров у фермента phiKZ gp144 и проясняют механизм действия данного фермента. Дополнительный активный центр, вероятно, появился в ходе эволюционного развития, на что указывает высокая гомология структур активных центров.

---

## Литическая активность бактериофага *Pseudomonas aeruginosa* в биопленке

Шестаков А.Г., Васильев Д.А., Малинов Е.С.

Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А.Столыпина, Ульяновск,  
Российская Федерация

Биопленка бактерий *Pseudomonas aeruginosa* формируется непосредственно при участии сигнальной молекулы вторичного мессенджера c-di-GMP (циклический дигуанидин монофосфат). Одним из факторов повышения

уровня c-di-GMP служит сигнальная молекула NO. Ранее нами был смоделирован путь, при котором формируется зрелая биопленка, имеющая характерную стадийность. Посредством направленного катаболизма L-аргинина в синтетической среде нами получены зрелые биопленки (основной признак экзополимерный альгинатный матрикс) бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Основными признаками зрелой биопленки мы считали динамичное изменение, а затем статичное количество КОЕ, увеличение вязкости при стандартном атмосферном давлении и качественную реакцию альгинатного матрикса с CaCl<sub>2</sub>.

В работе использовали литический бактериофаг Pa04 и штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa* полученные из музея кафедры микробиологии. Литическую активность бактериофага исследовали по методу Аппельмана, она составила 10<sup>-8</sup>. Далее для каждого штамма бактерий готовили три пробирки с 9 мл ГРМ бульона (Оболенск) и 9 мл разработанной нами синтетической средой с L-аргинином. В каждую пробирку вносили 0,1 мл бактериофага с указанной выше активностью и 1 мл суточной культуры бактерий *Pseudomonas aeruginosa*. Полученные системы фаг-бактерия культивировали при оптимальных условиях в течении 12 часов. Установлено, что увеличение титра фага и снижение КОЕ бактерий произошло одинаково (с учетом допустимой погрешности) во всех пробирках. Далее мы повторили эксперимент, но вносили бактериофаг в количестве 0,1 мл непосредственно в 10 мл 24-часовых культур выращенных на ГРМ бульоне (Оболенск) и разработанной нами синтетической средой с L-аргинином. Параметры культивирования систем фаг-бактерия прежние. Результаты эксперимента показали снижение («не увеличение») активности бактериофага Pa04 в пробирках с синтетической средой по сравнению с ГРМ бульоном на три порядка по Аппельману 10<sup>-5</sup>. При этом наблюдалось снижение вязкости биопленки и увеличение КОЕ бактерий до 10<sup>7</sup> кл/мл в сравнении с контрольной пробиркой с синтетической средой, в которой культивировали бактерии без бактериофага 10<sup>5</sup> кл/мл. В пробирке с ГРМ бульоном титр фага составил 10<sup>-8</sup> по Аппельману и КОЕ 10<sup>3</sup> кл/мл. В пробирке с ГРМ бульоном без бактериофага КОЕ составило 109 кл/мл. Результаты экспериментов позволили сделать ряд предположений.

1. Бактериофаг может влиять на уровень c-di-GMP;
2. Активируется фаг-опосредованная ферментная система;
3. Стимулируется или супрессируется CRISP иммунитет;
4. Альгинатный матрикс тормозит развитие продуктивной фаговой инфекции;
5. Мессенджер c-di-GMP изменяет рецепторный аппарат бактериальной клетки.

## Contents

<b>Genome analysis of ETA-converting staphylococcus aureus phiB-7772 and phiB-7774 bacteriophages</b>	5
Abaev I.V., Skryabin J.P., Dyatlov I.A. ....	5
<b>Bacteriophages: history of investigation and application</b>	5
Akimkin V.G. ....	5
<b>Complex use of bacteriophages for prevention and treatment of healthcare-associated infections</b>	6
Akimkin V.G. ....	6
<b>Assessment of the epidemiological effectiveness of bacteriophages in prevention of streptococcal and other bacterial respiratory infections in organized groups</b>	6
Akimkin V.G., Alimov A.V., Polyakov V.S. ....	6
<b>Experience of use of immune lactoglobulin and bacteriophage mixture for treatment of experimental salmonellosis</b>	7
Aleksanina N.V., Moiseyeva O.V., Yagovkin E.A. ....	7
<b>Analysis of genome of bacteriophage propionibacterium acnes A1-14</b>	7
Alekseeva A.E., Alkhovsky S.V., Brusnigina N.F. ....	7
<b>Innovative application of bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation</b>	7
Aleshkin A.V., Svetoch E.A., Volozantsev N.V., Kiseleva I.A., Rubalsky E.O., Ershova O.N., Novikova L.I. ....	7
<b>Role of topology and replicative structures of DNA of <i>E.coli</i> cells in lysogeny and virulent cycle of ssDNA of PHIX174 and LΦ7 bacteriophages</b>	8
Aleshkin G.I., Smelkova O.I., Markov A.P., Rusina O.Yu., Voronina O.L., Dobrynina O.Yu., Bolshakova T.N. ....	8
<b>Antibody response to bacteriophages in evaluation of efficiency of enteral phage therapy</b>	8
Aleshkin V.A., Novikova L.I., Bochkareva S.S., Aleshkin A.V., Ershova O.N., Kiseleva I.A., Zulkarneev E.R. ....	8
<b>Development of a visco-plastic formulations of bacteriophages</b>	9
Anurova M.N., Aleshkin A.V., Bakhrushina E.O., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S., Zulkarneev E.R. ....	9
<b>Bacteriophages for prevention of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation</b>	9
Aslanov B.I., Konev S.D., Ilyina M.N., Grishko T.A. ....	9
<b>Complex evaluation of pathogenicity of clinical staphylococcal strains that are different in antibiotic resistance and sensitivity to bacteriophages</b>	9
Bairakova A.L., Lakhtin V.M., Afanasiev S.S., Lakhtin M.V., Aleshkin V.A. ....	9
<b>Use of bacteriophages in veterinary</b>	10
Barth N.G., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Pavlova I.B., Judina T.G. ....	10
<b>Specificity of action of bacteriophages infecting <i>Providencia</i> genus</b>	10
Barth N.G., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Pavlova I.B., Judina T.G. ....	10
<b>Thermophilic bacteriophage aeribacillus pallidus ap45: biological properties, analysis of genome, interaction with the host microorganism</b>	10
Bokovaya O.V., Kozlova J.N., Morozova V.V., Babkin I.V., Yunusova A.J., Tikunova N.V. ....	10
<b>Pseudolysogeny of T7 phage and its application</b>	11
Bolshakova T.N., Dobrinina O.N., Karataev G.I., Sivov I.G. ....	11
<b>Using of molecular genetic technologies for indication of phages in the blood of patients with healthcare-associated infections (HAIs)</b>	11
Borisova O.J., Rubalsky E.O., Aleshkin A.V., Gadua N.T., Ershova O.N., Kurdymova N.V., Savin I.A., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S. ....	11
<b>The effectiveness of T5-like phages to control <i>Salmonella enterica</i></b>	12
Yannick Born, Lars Fieseler ....	12
<b>Study of lytic cycle of staphylococcal bacteriophage SA20 by flow cytometry method</b>	12
Bronnikov K.A., Morozova V.V., Kozlova J.N., Matveev A.L., Tikunova N.V. ....	12
<b>T4 infection of stationary phase <i>E. coli</i>: the hibernation mode</b>	13
Daniel Bryan, Elizabeth Kutter ....	13
<b>A phage-based assay for detection of pathogens</b>	13
Carvalho C., Costa S., Melo L., Santos S., Freitas F., Azeredo J. ....	13
<b>Experimental phage therapy to treat a persistent <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infection associated with an aortic Dacron graft</b>	13
Benjamin Chan PhD, Paul E. Turner PhD, Samuel Kim, Hamid R. Mojibian MD, John Elefteriades MD, Deepak Narayan MD ....	13
<b>Dual active site in the endolytic transglycosilase gp144 of bacteriophage phiKZ</b>	14
Chertkov O.V., Armeev G.A., Legotsky S.A., Shaytan A.K., Klyachko N.L., Miroshnikov K.A. ....	14
<b>Developing bacteriophages to make <i>Clostridium difficile</i> less difficult to treat and diagnose</b>	14
Martha R.J. Clokie, Janet Nale, Kate R. Hargreaves, Jinyu Shan. ....	14
<b>Exploitation of phage-host interactions for rapid bacterial identification and antibiotic resistance determination</b>	15
Chris Cox ....	15
<b>Immunological reactions to bacteriophage applied in vivo</b>	15
Krystyna Dąbrowska ....	15
<b>Bacteriophage control of <i>Escherichia coli</i> serogroup O55 in milk</b>	15
Denisenko E.A., Verevkin V.V., Krasilnikova V.M., Volozhantzev N.V., Svetoch E.A. ....	15
<b>Comparison of the lytic effect of staphylococcal polyvalent bacteriophages</b>	16
Doskar J., Varga M., Kolackova I., Karpiskova R., Maslanova I. ....	16
<b>Creation of new drugs for prevention and treatment of infectious diseases on the basis of bacteriophages and their lytic enzymes</b>	16
Dyatlov I.A. ....	16
<b>Serratia marcescens and <i>Serratia liquefaciens</i> bacteriophages indicators of bacteria in external environment</b>	17
Efreytorova E.O., Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Pavlova I.B., Yudina T.G. ....	17
<b>Phage indication of <i>Serratia</i> genus bacteria</b>	17
Efreytorova E.O., Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin C.H., Pavlova I.B., Yudina T.G. ....	17
<b>Phage indication of <i>Bacillus anthracis</i> by reaction of phage titer increase</b>	17
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Klimushkin E.I., Lydina M.A., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I. ....	17
<b>Isolation and selection of <i>Bacillus coagulans</i> bacteriophages</b>	18
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Shokina K.V., Lydina M.A., Maslyukova K.V., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I. ....	18
<b>Selection of parameters for reaction of increase of phage titre for the bacteriophage infecting <i>Bacillus anthracis</i></b>	18
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Klimushkin E.I., Kaldyrkayev A.I., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I. ....	18

<b>Biological properties of anthrax bacteriophage</b>	
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Klimushkin E.I., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I.....	19
<b>The scheme of identification of <i>Bacillus cereus</i> and <i>Bacillus mycoides</i> in objects of sanitary inspection</b>	
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Makeev V.A., Kaldyrkayev A.I., Maslyukova K.V., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I.....	19
<b>The phage indication of <i>Bacillus anthracis</i> in raw meat</b>	
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Shokina K.V., Lydina M.A., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I., Pavlova I.B., Judina T.G.....	20
<b>Methods of identification of <i>Bacillus coagulans</i> including the phage identification</b>	
Feoktistova N.A., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Belova K.V., Shokina K.V., Lydina M.A., Aleshkin A.V., Shmorgun B.I., Pavlova I.B., Judina T.G.....	20
<b>Resolving diabetic foot infections: compassionate use of staph phage SB-1</b>	
Randy Fish, Elizabeth Kutter, Gordon Wheat, Mzia Kutatelandze, Sarah Kuhl .....	21
<b>Experimental bacteriophages for diagnostics of cholera</b>	
Gaevskaya N.E., Kochetkova A.O. ....	21
<b>Mycobacteriophage Ms6 LysB: role on the mycobacteria lysis process</b>	
Gigante A., Hampton C., Dillard R., Moniz-Pereira J., Wright E., Pimentel M. ....	21
<b>Phage vB_BcyT_E283: a novel tectivirus infecting <i>Bacillus cytotoxicus</i></b>	
Gillis A., Michaux C. and Mahillon J.....	22
<b>Sensitivity of <i>Bacillus anthracis</i> strains with different types of capsule formation to bacteriophages</b>	
Golovinskaya T.M., Tsygankova O.I. ....	22
<b>Determination of the minimal gene set needed for the antiphage activity of <i>E. coli</i> BREX system</b>	
Julia Gordeeva, Ksenia Tsvetkova, Konstantin Severinov .....	23
<b>Bacteriophages in treatment of severe abdominal pathology</b>	
Gostishchev V.K., Gorbacheva I.V., Staneovich U.S.....	23
<b>Artilysin® – moving from topical to systemic applications in the clinic</b>	
Markus Matuschka v. Greiffenclau .....	23
<b>Immunodetection of bacteriophages by the electroacoustic analysis method</b>	
Gulyi O.I., Zaitsev B.D., Shikhabudinov A.M., Teplykh A.A., Borodina I.A., Fomin A.S., Staroverov S.A., Dykman L.A., Ignatov O.V. ....	24
<b>Temperate phage-encoded CRISPR-Cas as a genetically compact bet hedging strategy</b>	
Katherine R. Hargreaves, Stephen T. Abedon .....	24
<b>The phage approach to control emetic <i>Bacillus cereus</i></b>	
Hock L., Mahillon J.....	25
<b>Bacteriophages for implants</b>	
Ignatov S.G., Voloshin A.G., Denisenko E.A. ....	25
<b>Some insights from the study of BREX – a novel phage resistant system</b>	
Isaev A.B., Matlashow M.E., Tsvetkova K.M., Pechenov P.Y., Severinov K.V. ....	25
<b>Characterization of bacteriophage PP16 infecting <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>Carotovorum</i> phytopathogen</b>	
Kabanova A.P., Vo Thi Ngoc Ha, Schneider M.M., Kulikov E.E., Samarov N.I., Miroshnikov K.K., Korzhenkov A.A., Toschakov S.V., Ignatov A.N., Miroshnikov K.A.....	26
<b>Potential therapeutic applications of <i>Staphylococcus aureus</i> bacteriophage Stab8</b>	
Ermir Kadija, Zack Hobbs .....	26
<b>Isolation of the phage of <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> by X-ray induction</b>	
Karamysheva N.N., Vasilyev D.A., Semenov A.M., Pichugin Yu.V. ....	26
<b>Genome analysis of bacteriophages lytic for hypervirulent <i>Klebsiella pneumoniae</i> K1 and K2 capsular type</b>	
Komisarova E.V., Myakinina V.P., Krasilnikova V.M., Verevkina V.V., Kislichkina A.A., Volozhantsev N.V. ....	27
<b>Immunological aspects of phage therapy of bronchial asthma in children with regular intercurrent respiratory infections</b>	
Kosyakova N.I. ....	27
<b>The study of Ca<sup>2+</sup> regulation of bacteriophage T5 endolysin</b>	
Kovalenko A.O., Chernyishov S.V., Prokhorov D.A., Molochkov N.V., Mikoulinskaya G.V. ....	28
<b>The role of bacteriophages in the treatment of bacterial infections</b>	
Krasilnikov I.V. ....	28
<b>The modular compositions of monospecific bacteriophage mixtures for therapy of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections</b>	
Krylov V.N., Shaburova O.V., Pleteneva E.A., Bourkaltseva M.V., Krylov S.V., Kaplan A.M., Chesnokova E.N., Polygach O.A. ....	28
<b>Development of the bacteriophage product for indication and identification of <i>Aeromonas salmonicida</i></b>	
Kuklina N.G., Vasilev D.A., Victorov D.A., Shcherbina A.A. ....	29
<b>Experience of bacteriophage application in prevention of healthcare-associated shigellosis</b>	
Kurakin E.S. ....	29
<b>GroEL-like proteins encoded by bacteriophages</b>	
Kurochkina L.P., Semenjuk P., Orlov V.N. ....	30
<b>Hot tales of T4's transition from host to phage metabolism</b>	
Elizabeth Kutter, Georgia Ray, Daniel Bryan .....	30
<b>Application of <i>Salmonella</i> bacteriophages in industrial poultry farming</b>	
Kuzmin V.A., Fogel L.S. ....	30
<b>Hijacking <i>Pseudomonas</i> – Phage-encoded mechanisms impacting the infected bacterium</b>	
Rob Lavigne.....	31
<b>Structure and function of bacteriophage T4 baseplate in atomic detail</b>	
Leiman P.G., Taylor N.M.I., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Schneider M.M., Browning C., Goldie K.N., Stahlberg H. ....	31
<b>The mechanisms of microevolutionary adaptation of the intestinal N4-related phages as revealed by the comparative genomics</b>	
Letarov A.V., Golomidova A.K., Babenko V.V., Ivanov P.A., Letarova M.A., Kostrukova E.S., Prokhorov N.S., Knirel Y.K., Zdorovenko E.L., Kulikov, Nazarov S., Riccio R., Leiman P.G. ....	32
<b>Application of eukaryotic model system for therapeutic efficacy assessment of phages against clinical bacterial infections</b>	
Marusich E.I., Volozhancev N.V., Musatov I., Leonov S.V. ....	32
<b>Characterization of a new twortlikevirus infecting <i>Staphylococcus epidermidis</i> that exhibits activity against biofilm and stationary bacterial populations</b>	
Melo L.D.R., Pinto G., Oliveira F., França A., Ackermann H-W., Kropinski A.M., Sillankorva S., Azeredo J., Cerca N. ....	33
<b>Thermostable bacteriophage peptidoglycan hydrolases as alternative to antibiotics</b>	
Mikoulinskaya G.V., Chernyishov S.V., Shavrina M.S., Zimin A.A. ....	33

<b>Bacteriophages of pectolytic potato pathogens</b>	
Miroshnikov K.A., Kabanova A.P., Vo Thi Ngoc Ha, Shneider M.M., Sykilinda N.N., Toschakov S.V., Ignatov A.N.....	33
<b>Molecular characterization of the activity and requirements of a novel and promiscuous bacteriophage integrase</b>	
Mohammed R. Mohaisen, Alan J. McCarthy, Heather E. Allison .....	34
<b>The test system for the accelerated indication <i>E. coli</i> 0157: H7</b>	
Molofeeva N.I., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Merchina S.V., Shestakov A.G. ....	34
<b>Lytic bacteriophage pm16 specific to <i>Proteus mirabilis</i>: its genome, biological properties and some aspects of interaction with host bacterium</b>	
Morozova V.V., Kozlova J.N., Shed'ko E.D., Babkin I.V., Kuril'scikov A.M., Junusova A.J., Ryabchikova E.I., Vlasov V.V., Tikunova N.V. ....	34
<b>Structure and tail contraction-controlling mechanism of Staphylococcal twort-like phage 812 determined by cryo-electron microscopy</b>	
Novacek I., Siborova M., Pantucek R., Benesik M., Doskar J., Plevka P. ....	35
<b>A new phage endolysis as a powerful tool to detect and kill Paenibacillus larvae</b>	
Oliveira A., Santos S.B., Melo D.R.L., Azeredo J. ....	35
<b>Capsule depolymerase activity of phages infecting the <i>Acinetobacter baumannii-calcoaceticus</i> complex</b>	
Oliveira H., Costa A.R., Konstantinidis N., Nemec A., Shneider M., Dötsch A., Sillankorva S., Azeredo J. ....	35
<b>Phage therapy of urinary infection</b>	
Perepanova T.S., Darbeeva O.S. ....	36
<b>Biological properties of different genetic types of <i>P. aeruginosa</i> bacteriophages</b>	
Polygach O.A., Voroshilova N.N., Tikunova N.V., Dabizheva A.N., Morozova V.V. ....	36
<b>Endolysins of staphylococcal temperate phages with novel substrate-binding domain</b>	
Prijma A.D., Shneider M.M., Legotsky S.A., Klyachko N.L., Miroshnikov K.A. ....	37
<b>Clinical and microbiological efficiency of vaginal sanation by bacteriophage gel «Phagogin» in treatment of anaerobic vaginitis and bacterial vaginosis</b>	
Priputnevich T.V., Apolikhina I.A., Muravyeva V.V., Dodova E.G., Lyubasovskaya L.A., Melkumyan A.R., Zhilenkov E.L., Popova V.M., Zurabov A.J. ....	37
<b>Recognition of cellular surface by n4-like viruses</b>	
Prokhorov N.S., Riccio K., Nazarov S., Zdrovenko E.L., Guerrero-Ferreira R., Shneider M.M., Golomidova A.K., Tatarskiy E.V., Gurko E.V., Knirel J.A., Leiman P.G., Letarov A.V. ....	38
<b>Biological properties of <i>Citrobacter</i> bacteriophages isolated from the sand of children sandboxes</b>	
Pulcherovskaya L.P., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Efreytova E.O. ....	38
<b>In vitro optimization of a phage cocktail</b>	
Richter M., Honaker R. ....	38
<b>Molecular-genetic typing of <i>Klebsiella pneumoniae</i> bacteriophages for phage therapy and phage prophylaxis</b>	
Rubalskii E.O., Aleshkin A.V., Borisova O.Yu., Gadua N.T., Kiseleva I.A., Bochkareva S.S., Afanasiev S.S., Rubalsky M.O. ....	39
<b>Features of selection of phages active to <i>Klebsiella oxytoca</i></b>	
Sadrtdinova G.R., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Liashengko E.A. ....	39
<b>Lysogeny studies of strains of <i>Klebsiella oxytoca</i> species</b>	
Sadrtdinova G.R., Vasilyev D.A., Zolotukhin S.N., Liashengko E.A. ....	40
<b>Features of isolation of virulent phages active to the tribe of <i>Klebsielleae</i></b>	
Sadrtdinova G.R., Pulcherovskaya L.P., Efreytova E.O., Vasilev D.A., Zolotukhin S.N., Lyashenko E.A., Pavlova I.B., Judina T.G. ....	40
<b>Characterization and cryo-em reconstruction of <i>Tectiviridae thermus</i> spp. bacteriophage PhiKo</b>	
Sedov A.S., Lopatina A.V., Pechnikova E.V., Severinov K.V., Miroshnikov K.A., Sokolova O.S. ....	40
<b>Host range expansion of bacteriophage Sb-1 correlates with significant changes of bacteriophage genome</b>	
Sergueev K.V., Filippov A.A., Farlow J., Reddy A., Kvachadze L., Balarjishvili N., Kutateladze M., Nikolich M.P. ....	41
<b>Lytic activity of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bacteriophage in biofilm</b>	
Shestakov A.G., Vasilyev D.A., Malinov E.S. ....	41
<b>Age dynamics of the titre of <i>E. coli</i> bacteriophage in digestive microbiocenosis of goslings of the first 45 days of life</b>	
Skoblikov N.E., Osepchuk D.V., Moskalenko E.A., Avdienko V.V., Zimin A.A. ....	42
<b>Attenuation of the SS-DNA bacteriophage PHIX174 in <i>E. coli</i> topoisomerase IV mutant</b>	
Smelkova O.I., Aleshkin G.I., Voronina O.L., Markov A.P. ....	42
<b>Delusion by dilution: the novel mechanism modulating the adsorption of the bacteriophage in response to the lysing cells density</b>	
Strelkova D.M., Kulikov E.E., Tatarski E.V., Prokhorov N.S., Kostrukova E.S., Letarov A.V. ....	42
<b>Use of <i>Listeria</i> bacteriophages for indication and identification of <i>L. monocytogenes</i></b>	
Suldina E.V., Vasilyev D. A., Zolotukhin S.N., Kovalyova E.N., Shcherbina A.A. ....	43
<b>The sensitivity of clinical strains of <i>Staphylococcus</i> spp. to the polyclonal bacteriophage Sekstafag®</b>	
Sverkalova D.G., Karamysheva N.N., Shcherbina A.A. ....	43
<b>Isolation of MB-phages from environmental objects and biological material</b>	
Syrym N.S., Espembetov B.A. ....	44
<b>Bacteriophages specific to <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	
Tikunov A.J., Kozlova J.N., Morozova V.V., Kretien S.O., Saranina I.V., Vlasov V.V., Tikunova N.V. ....	44
<b>Bacteriophages specific to <i>Acinetobacter</i> spp.</b>	
Tikunova N.V., Kozlova J.N., Morozova V.V., Vlasov V.V. ....	44
<b>Influence of phage preparations on formation of biofilms</b>	
Tolordava E.R., Romanova Yu.M. ....	45
<b>Development of a scheme for phagotyping of <i>Bacillus anthracis</i> strains</b>	
Tsygankova O.I., Golovinskaya T.M. ....	45
<b>Biological properties of phagoresistant variants of <i>Bacillus anthracis</i> 44/1 strain with disturbance in spore germination in an atmosphere with a high content of CO<sub>2</sub></b>	
Tsygankova O.I., Koteneva E.A., Golovinskaya T.M. ....	45
<b>Microbiological monitoring of the <i>Staphylococcus</i> sensitivity to bacteriophages</b>	
Vasilieva E.I., Kostyuk E.A. ....	46
<b>Isolation of <i>Bordetella bronchiseptica</i> bacteriophages</b>	
Vasilyeva Yu.B., Vasilyev D. A., Mastilenko A.V., Semanina E.N., Lomakin A.A., Pronin K.N., Zolotukhin S.N., Shcherbina A.A. ....	46
<b>Personalised phagotherapy of infected trophic ulcers on the background of diabetes</b>	
Vlasov V.V., Ganichev D.A., Kozlova J.N., Morozova V.V., Saranina I.V., Tikunova N.V. ....	47

<b>Genomics and properties of bacteriophage PP90 infecting potato pathogen <i>Pectobacterium atrosepticum</i></b>	
Vo Thi Ngoc Ha, Kabanova A.P., Shneider M.M., Sykilinda N.N., Kulikov E.E. <sup>3</sup> , Karandashov V.E., Toschakov S.V., Ignatov A.N. <sup>1</sup> , Miroshnikov K.A. ....	.47
<b>Podoviruses with polysaccharide depolymerase activity that infect hypervirulent hypermucoviscous <i>Klebsiella pneumoniae</i>: isolation, comparative genome analysis and effectiveness in mouse models</b>	
Volozhantsev N.V., Borzilov A. I., Myakinina V.P., Korobova O.V., Kombarova T.I., Krasilnikova V.M., Verevkin V.V., Svetoch E.A. ....	.48
<b>Prophages as a part of genomes of microorganisms infecting mammals, as a sign of the bacterial adaptation to the host organism</b>	
Voronina O.L., Kunda M.S., Sharapova N.E., Aksanova E.I., Ryzhova N.N., Semenov A.N., Gintsburg A.L. ....	.48
<b>New preparations of bacteriophages – highly effective and safe agents of antibacterial therapy and prophylaxis</b>	
Voroshilova N.N., Kazakova T.B., Bogovazova G.G., Alferova E.V., Usmanova S.S., Polygach O.A. ....	.49
<b>The impact of phage resistance on the sensitivity of the mathematical model of the intestinal biocenosis state</b>	
Zatevalov A.M., Selkova E.P., Aleshkin A.V., Gudova N.V., Gusarova M.P., Zatevalova E.A. ....	.49
<b>Phage-resistance of opportunistic bacteria in the microbial landscape of individuals suffering from intestinal dysbiosis</b>	
Zavgorodnyaya E.F. ....	.49
<b>Application of bacteriophages in veterinary medicine</b>	
Zolotukhin S. ....	.50
<b>Development of parameters of the accelerated identification of <i>Y. pseudotuberculosis</i> bacteria by means of indicator bacteriophages</b>	
Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. ....	.51
<b>Selection of bacteriophages for indication of <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> by phage amplification assay (PAA)</b>	
Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. ....	.51
<b>Determination of the optimal temperature for <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> bacteriophages cultivation</b>	
Zhuravskaya N.P., Zolotukhin S.N., Vasilyev D.A. ....	.51
<b>Optimisation of antibiotic prophylaxis of wound suppuration using the polyvalent bacteriophages and immune-directed therapy</b>	
Zubritsky V.F., Ivashkin A.N., Kovalev A.I., Krivoshchapov P.G., Nizovoy A.V., Fominykh E.M. ....	.52
<b>Characterisation of bacteriophage cocktail effectively prolonging the shelf life of chilled fish</b>	
Zul'karneev E.R., Aleshkin A.V., Kiseleva I.A., Efimova O.G., Rubalskii E.O. ....	.52

## Содержание

<b>Геномный анализ ЕТА-конвертирующих бактериофагов <i>Staphylococcus aureus</i> phiB-7772 и phiB-7774</b>	Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Дятлов И.А. ....	54
<b>Бактериофаги: история изучения и применения</b>	Акимкин В.Г.....	54
<b>Оценка эпидемиологической эффективности бактериофагов для профилактики стрептококковых и других бактериальных инфекций дыхательных путей в организованных коллективах</b>	Акимкин В.Г., Алимов А.В., Поляков В.С.....	55
<b>Опыт совместного применения иммунного лактоглобулина и бактериофага для лечения экспериментального сальмонеллеза</b>	Александрина Н.В., Моисеева О.В., Яговкин Э.А. ....	55
<b>Анализ генома бактериофага <i>Propionibacterium acnes</i> a1-14</b>	Алексеева А.Е., Альховский С.В., Бруснигина Н.Ф.....	56
<b>Иновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации</b>	Алешкин А.В., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Киселева И.А., Рубальский Е.О., Ершова О.Н., Новикова Л.И. ....	56
<b>Гуморальный иммунный ответ на бактериофаги в оценке эффективности энтеральной фаготерапии</b>	Алешкин В.А., Новикова Л.И., Бочкарева С.С., Алешкин А.В., Ершова О.Н., Киселева И.А., Зулькарнеев Э.Р. ....	56
<b>Роль топологии и репликонной структуры ДНК у клеток <i>E. coli</i> в лизогенении и вирулентном цикле он-ДНК бактериофагов phiX174 и lf7</b>	Алешкин Г.И., Смелкова О.И., Марков А.П., Русина О.Ю., Воронина О.Л., Добринина О.Ю., Большакова Т.Н. ....	57
<b>Разработка вязко-пластичных лекарственных форм бактериофагов</b>	Анурова М.Н., Алешкин А.В., Бахрушина Е.О., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Зулькарнеев Э.Р. ....	57
<b>Бактериофаги для предотвращения формирования биопленок <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	Асланов Б.И., Конев С.Д., Ильина М.Н., Гришко Т.А. ....	58
<b>Комплексная оценка патогенности клинических штаммов стафилококков, различающихся резистентностью к антибиотикам и чувствительностью к бактериофагам</b>	Байракова А.Л., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Лахтин М.В., Алешкин В.А. ....	58
<b>Бактериофаги <i>Providencia</i> и их роль в патологии животных</b>	Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. ....	59
<b>Специфичность действия бактериофагов рода <i>Providencia</i></b>	Барт Н.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	59
<b>Термофильный бактериофаг <i>Aeribacillus pallidus</i> ap45: биологические свойства, анализ генома, взаимодействие с микроорганизмом-хозяином</b>	Боковая О.В., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Бабкин И.В., Юнусова А.Ю., Тикунова Н.В. ....	60
<b>Псевдолизогения у фага T7 и ее использование</b>	Большакова Т.Н., Добринина О.Н., Каратаев Г.И., Сивов И.Г. ....	60
<b>Применение молекулярно-генетических технологий для индикации фагов в крови пациентов с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи</b>	Борисова О.Ю., Рубальский Е.О., Алешкин А.В., Гадуя Н.Т., Ершова О.Н., Курдюмова Н.В., Савин И.А., Киселева И.А., Бочкарева С.С. ....	60
<b>Исследование липического цикла стафилококкового бактериофага SA20 методом проточной цитометрии</b>	Бронников К.А., Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Матвеев А.Л., Тикунова Н.В. ....	61
<b>Микробиологический мониторинг чувствительности стафилококков к бактериофагам</b>	Васильева Е.И., Костюк Е.А. ....	62
<b>Выделение бактериофагов <i>Bordetella bronchiseptica</i></b>	Васильева Ю.Б., Васильев Д.А., Мастиленко А.В., Семанина Е.Н., Ломакин А.А., Пронин К.Н., Золотухин С.Н., Щербина А.А. ....	62
<b>Персонализированная фаготерапия инфицированных трофических язв на фоне сахарного диабета</b>	Власов В.В., Ганичев Д.А., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Саранина И.В., Тикунова Н.В. ....	62
<b>Оценка эффективности бактериофагов при лечении экспериментального сепсиса, острой пневмонии и инфекции бедра, вызванных <i>Klebsiella pneumoniae</i> у мышей</b>	Воложанцев Н.В., Борзилов А.И., Мякинина В.П., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Красильникова В.М., Веревкин В.В., Светоч Э.А. ....	63
<b>Профаги в составе геномов микроорганизмов, инфицирующих млекопитающих, как признак адаптации бактерии к организму-хозяину</b>	Воронина О.Л., Кунда М.С., Шарапова Н.Е., Аксенова Е.И., Рыжова Н.Н., Семенов А.Н., Гинцбург А.Л. ....	64
<b>Новые препараты бактериофагов – высокоеффективные и безопасные средства антибактериальной терапии и профилактики</b>	Ворошилова Н.Н., Казакова Т.Б., Боговазова Г.Г., Алферова Э.В., Усманова С.С., Полягач О.А. ....	64
<b>Экспериментальные бактериофаги для диагностики холеры</b>	Гаевская Н.Е., Кочеткова А.О. ....	64
<b>Чувствительность к бактериофагам штаммов <i>Bacillus anthracis</i> с различным типом капсулообразования</b>	Головинская Т.М., Цыганкова О.И. ....	65
<b>Применение бактериофагов в программе лечения больных с тяжелой абдоминальной патологией</b>	Гостищев В.К., Горбачева И.В., Станоевич У.С. ....	65
<b>Иммунодетекция бактериофагов методом электроакустического анализа</b>	Гулий О.И., Зайцев Б.Д., Шихабдинов А.М., Теплыkh А.А., Бородина И.А., Фомин, Староверов С.А., Дыкман Л.А., Игнатов О.В. ....	66
<b>Контроль бактерий <i>Escherichia coli</i> серогруппы O55 в молоке с помощью бактериофагов</b>	Денисенко Е.А., Веревкин В.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В., Светоч Э.А. ....	66
<b>Создание новых средств профилактики и лечения инфекционных болезней на основе бактериофагов и их липических ферментов</b>	Дятлов И.А. ....	67
<b>Фагоиндикация бактерий рода <i>Serratia</i></b>	Ефрейторова Е.О., Пульчевская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	67
<b>Бактериофаги <i>Serratia marcescens</i> и <i>Serratia liquefaciens</i> индикаторы бактерий во внешней среде</b>	Ефрейторова Е.О., Пульчевская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	68
<b>Разработка параметров ускоренной идентификации бактерий <i>Y. Pseudotuberculosis</i> с помощью индикаторных бактериофагов</b>	Журавская Н.П., Золотухин С.Н., Васильев Д.А. ....	68

<b>Подбор бактериофагов для индикации бактерий <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> и <i>Yersinia enterocolitica</i> методом РНФ</b>	78
Журавская Н.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. ....	69
<b>Определение оптимального температурного режима культивирования псевдотуберкулезных бактериофагов</b>	78
Журавская Н.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. ....	69
<b>Фагорезистентность условно-патогенных бактерий в пейзаже кишечной микробиоты у лиц с дисбиотическими нарушениями кишечника</b>	78
Завгородняя Е.Ф. ....	70
<b>Влияние фагорезистентности на чувствительность математической модели состояния микробиоценоза кишечника</b>	79
Затевалов А.М., Селькова Е.П., Алёшкин А.В., Гудова Н.В., Гусарова М.П., Затевалова Е.А. ....	70
<b>Оптимизация антибиотикопрофилактики нагноений ран с помощью поливалентных бактериофагов и иммунориентированной терапии</b>	79
Зубрицкий В.Ф., Ивашин А.Н., Ковалев А.И., Кривошапов П.Г., Низовой А.В., Фоминых Е.М. ....	71
<b>Характеристика коктейля бактериофагов, эффективно продлевавшего срок годности охлажденной рыбы</b>	80
Зулькарнеев Э.Р., Алешик А.В., Киселева И.А., Ефимова О.Г., Рубальский Е.О. ....	72
<b>Бактериофаги для имплантатов</b>	80
Игнатов С.Г., Денисенко Е.А., Волошин А.Г. ....	72
<b>Выделение фага бактерий <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> методом индукции рентгеновским облучением</b>	80
Карамышева Н.Н., Васильев Д.А., Семенов А.М., Пичугин Ю.В. ....	73
<b>Изучение Ca(2+) регуляции эндодизина бактериофага T5</b>	81
Коваленко А.О., Чернышов С.В., Прохоров Д.А., Молочков Н.В., Микулинская Г.В. ....	73
<b>Геномный анализ бактериофагов, лизирующих высоковирулентные штаммы <i>Klebsiella pneumoniae</i> капсульных типов K1 и K2</b>	81
Комисарова Е.В., Мякинина В.П., Красильникова В.М., Веревкин В.В., Кисличкина А.А., Воложанцев Н.В. ....	74
<b>Иммунологические аспекты фаготерапии бронхиальной астмы у детей с частыми интеркуррентными респираторными инфекциями</b>	82
Косякова Н.И. ....	74
<b>Роль бактериофагов в терапии бактериальных инфекций</b>	82
Красильников И.В. ....	74
<b>Модульные композиции из моновидовых смесей бактериофагов для терапии инфекций <i>P. aeruginosa</i></b>	82
Крылов В.Н., Шабурова О.В., Плетенева Е.А., Буркальцева М.В., Крылов В.Н., Каплан А., Чеснокова Е.Н., Полягач О.А. ....	75
<b>Применение сальмонеллезных бактериофагов в промышленном птицеводстве</b>	83
Кузьмин В.А., Фогель Л.С. ....	75
<b>Разработка бактериофагового биопрепарата для индикации и идентификации бактерии <i>Aeromonas salmonicida</i></b>	83
Куклина Н.Г., Васильев Д.А., Викторов Д.А., Щербина А.А. ....	76
<b>Опыт применения бактериофага в профилактике госпитального шигеллеза</b>	83
Куракин Э.С. ....	76
<b>GroEL-подобные белки, кодируемые бактериофагами</b>	84
Курочкина Л.П., Семенюк П.И., Орлов В.Н. ....	77
<b>Термостабильные пептидогликангидролазы бактериофагов как альтернатива антибиотикам</b>	84
Микулинская Г.В., Чернышов С.В., Шаврина М.С., Зимин А.А. ....	77
<b>Бактериофаги пектолитических патогенов картофеля</b>	84
Мирошников К.А., Кабанова А.П., Во Тхи Нгок Ха, Шнейдер М.М., Сыклинда Н.Н., Тощаков С.В., Игнатов А.Н. ....	78
<b>Тест система ускоренной индикации бактерий <i>E. coli</i> 0157: H7</b>	84
Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Мерчина С.В., Шестаков А.Г. ....	78
<b>Литический бактериофаг PM16, специфичный к <i>Proteus mirabilis</i>: геном, биологические свойства и некоторые аспекты взаимодействия с бактерией-хозяином</b>	84
Морозова В.В., Козлова Ю.Н., Шедько Е.Д., Бабкин И.В., Курильщиков А.М., Юнусова А.Ю., Рябчикова Е.И., Власов В.В., Тикунова Н.В. ....	78
<b>Бактериофаготерапия мочевой инфекции</b>	84
Перепанова Т.С., Дарбеева О.С. ....	79
<b>Биологические свойства различных генетических видов бактериофагов <i>P. aeruginosa</i></b>	84
Полыгач О.А., Ворошилова Н.Н., Тикунова Н.В., Дабижева А.Н., Морозова В.В. ....	80
<b>Клиническая и микробиологическая эффективность санации влагалища гелем с бактериофагами «Фагогин» при анаэробном вагините и бактериальном вагинозе</b>	84
Припутневич Т.В., Аполихина И.А., Муравьева В.В., Додова Е.Г., Любасовская Л.А., Мелкумян А.Р., Жиленков Е.Л., Попова В.М., Зурабов А.Ю., Лейман П.Г., Летаров А.В. ....	80
<b>Распознавание клеточной поверхности N4-подобными вирусами</b>	84
Прохоров Н.С., Риччио К., Назаров С., Здоровенко Э.Л., Гуэреро-Феррейра Р., Шнейдер М.М., Голомидова А.К., Татарский Е.В., Гурко Е.В., Книрель Ю.А., Лейман П.Г., Летаров А.В. ....	81
<b>Биологические свойства выделенных из песка детских песочниц цитробактерных бактериофагов</b>	84
Пульчевская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ефрейторова Е.О. ....	81
<b>Молекулярно-генетическое типирование бактериофагов <i>Klebsiella pneumoniae</i> для фаготерапии и фагопрофилактики</b>	84
Рубальский Е.О., Алешик А.В., Борисова О.Ю., Гадуя Н.Т., Киселева И.А., Бочкарева С.С., Афанасьев С.С., Рубальский М.О. ....	82
<b>Особенности селекции фагов активных к <i>Klebsiella oxytoca</i></b>	84
Садрдинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ляшенко Е.А. ....	82
<b>Изучение лизогении штаммов бактерий вида <i>Klebsiella oxytoca</i></b>	84
Садрдинова Г.Р., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ляшенко Е.А. ....	83
<b>Особенности выделения вирулентных фагов активных к трибе <i>Klebsielleae</i></b>	84
Садрдинова Г.Р., Пульчевская Л.П., Ефрейторова Е.О., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ляшенко Е.А., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	83
<b>Чувствительность клинических штаммов бактерий рода <i>Staphylococcus</i> spp. к поливалентному бактериофагу Секстофаг®</b>	84
Сверкалова Д.Г., Карамышева Н.Н., Щербина А.А. ....	84
<b>Возрастная динамика титра бактериофагов <i>E. coli</i> пищеварительного микробиоценоза гусят первых 45 дней жизни</b>	84
Скобликов Н.Э., Осепчук Д.В., Москаленко Е.А., Авдиенко В.В., Зимин А.А. ....	84
<b>Аттенуация он-ДНК бактериофага phiX174 в штамме <i>E. coli</i> с мутацией в гене топоизомеразы IV</b>	84
Смелкова О.И., Алешик Г.И., Воронина О.Л., Марков А.П. ....	84

<b>Листериозные бактериофаги – как средство индикации и идентификации <i>L. monocytogenes</i></b>	
Сульдина Е.В., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Ковалева Е.Н., Щербина А.А. ....	85
<b>Изоляция МБфагов из объектов внешней среды и биологического материала</b>	
Сырым Н.С., Еспембетов Б.А. ....	85
<b>Бактериофаги специфичные к <i>Stenotrophomonas maltophilia</i></b>	
Тикунов А.Ю., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Кретъен С.О., Саранина И.В., Власов В.В., Тикунова Н.В. ....	86
<b>Бактериофаги, специфичные к бактериям рода <i>Acinetobacter</i></b>	
Тикунова Н.В., Козлова Ю.Н., Морозова В.В., Власов В.В. ....	86
<b>Влияние фаговых препаратов на процесс формирования биопленок</b>	
Толордава Э.Р., Романова Ю.М. ....	86
<b>Выделение и селекция бактериофагов <i>Bacillus coagulans</i></b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Шокина К.В., Лыдина М.А., Маслюкова К.В., Алешик А.В., Шморгун Б.И. ....	87
<b>Подбор параметров постановки реакции нарастания титра фага для сибирайзвенного бактериофага</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Климушкин Е.И., Калдыркаев А.И., Алешик А.В., Шморгун Б.И. ....	87
<b>Биологические свойства сибирайзвенного бактериофага</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Климушкин Е.И., Алешик А.В., Шморгун Б.И. ....	88
<b>Схема идентификации <i>Bacillus cereus</i> и <i>Bacillus mycoides</i> в объектах санитарного надзора</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Макеев В.А., Калдыркаев А.И., Маслюкова К.В., Алешик А.В., Шморгун Б.И. ....	88
<b>Фагоиндикация <i>Bacillus anthracis</i> в мясном сырье</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Шокина К.В., Лыдина М.А., Алешик А.В., Шморгун Б.И., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	89
<b>Методы идентификации <i>Bacillus coagulans</i>, включая фагоидентификацию</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Шокина К.В., Лыдина М.А., Алешик А.В., Шморгун Б.И., Павлова И.Б., Юдина Т.Г. ....	89
<b>Фагоиндикация <i>Bacillus anthracis</i> методом реакции нарастания титра фага</b>	
Феоктистова Н.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Белова К.В., Климушкин Е.И., Лыдина М.А., Алешик А.В., Шморгун Б.И. ....	90
<b>Разработка схемы фаготипирования штаммов <i>Bacillus anthracis</i></b>	
Цыганкова О.И., Головинская Т.М. ....	90
<b>Биологические особенности фагорезистентных вариантов штамма <i>Bacillus anthracis</i> 44/1 с нарушениями пространения спор в атмосфере с повышенным содержанием CO<sub>2</sub></b>	
Цыганкова О.И., Котенева Е.А., Головинская Т.М. ....	91
<b>Второй активный центр в эндоплазматической трансгликозилазе gp144 бактериофага phiKZ</b>	
Чертков О.В., Армев Г.А., Легоцкий С.А., Шайтан А.К., Клячко Н.Л., Мирошников К.А. ....	91
<b>Литическая активность бактериофага <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в биопленке</b>	
Шестаков А.Г., Васильев Д.А., Малинов Е.С. ....	92

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

Материалы Третьей научно-практической конференции с международным участием  
к 100-летию открытия бактериофагов

Компьютерная верстка – Николаева И.А.  
Подписано в печать 27.09.2016  
Формат издания 60x90/8  
Усл. печ. л. 12,5  
Печать офсетная  
Тираж 250 экз.

Отпечатано в ООО «КЛУБ ПЕЧАТИ»  
127018, Москва, Марьиной Рощи 3-й проезд, д.40, строение 1