

МРНТИ 34.25.37, 34.27.49

<https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.09>

П.Г. Алексюк*, А.П. Богоявленский, М.С. Алексюк,
К.С. Аканова, Е.С. Молдаханов, Э.С. Омиртаева,
В.Э. Березин

ТОО «Научно-производственный центр микробиологии
и вирусологии», Казахстан, г. Алматы
*e-mail: pagenal@bk.ru

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА БАКТЕРИОФАГОВ, ЛИЗИРУЮЩИХ КЛИНИЧЕСКИЕ ШТАММЫ *E. COLI*

Нозокомиальные инфекции представляют собой огромную проблему для современного здравоохранения. По данным ВОЗ ежегодно, около десяти миллионов госпитализированных больных погибают или приобретают инвалидность из-за поражения внутрибольничными инфекциями. Одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций являются патогенные штаммы *E. coli*, которые представляют смертельную опасность для пациентов с ослабленным иммунитетом. Кроме того, у большого количества штаммов *E. coli* развилась устойчивость практически ко всем известным классам антибиотиков, что резко снижает эффективность антибиотикотерапии при борьбе с подобными патогенами. В сложившихся условиях, всё большую актуальность получают исследования по поиску альтернативных методов лечения бактериальных инфекций. К наиболее актуальным и перспективным относят метод фаготерапии.

Целью данных исследований являлось выделение из объектов окружающей среды бактериофагов способных лизировать клинические штаммы *E. coli*, и изучение их биологических свойств.

В результате проведённых исследований было установлено, что объекты окружающей среды, расположенные в санитарно-неблагополучных районах, являются наиболее предпочтительными объектами для выделения литических бактериофагов *E. coli*. Из образцов, отобранных в подобных районах было выделено 6 бактериофагов способных лизировать клинический штамм *E. coli*. Выделенные бактериофаги являлись строго видоспецифичными и обладали максимальной литической активностью в концентрациях 10^5 вирусных частиц в мл и более, что является стандартом для коммерческих фаговых препаратов и показывает их высокую антибактериальную активность достаточную для эффективной борьбы с патогенными штаммами бактерий *E. coli*.

Ключевые слова: Бактериофаг, *Escherichia coli*, нозокомиальная инфекция, антибиотикостойчивость, литическая активность.

P.G. Alexyuk*, A.P. Bogoyavlenskiy, M.S. Alexyuk,
K.S. Akanova, Y.S. Moldakhanov, E.S. Omirtaeva, V.E. Berezin
LLC "Research and Production Center for Microbiology and Virology", Kazakhstan, Almaty
*e-mail: pagenal@bk.ru

Isolation and characterization of bacteriophages lysing clinical strains of *E. coli*

Nosocomial infections are an important problem in modern healthcare. According to the WHO, annually, about ten million hospitalized patients die or become disabled due to nosocomial infections. One of the main causative agents of nosocomial infections are pathogenic strains of *E. coli*, which pose a danger to immunocompromised patients. In addition, a large number of *E. coli* strains have developed resistance to almost all known classes of antibiotics, which dramatically reduces the effectiveness of antibiotic therapy in the fight against such pathogens. Under these conditions, research on development of alternative approaches to combatting bacterial infections is becoming increasingly important. The most relevant and promising method is phage therapy.

The purpose of these studies was to isolate bacteriophages from environmental objects capable of lysing clinical strains of *E. coli*, and to study their biological properties.

As a result of the conducted studies, it was found that environmental objects located in sanitary-unfavorable areas are the most preferable objects for the isolation of *E. coli* lytic bacteriophages. Six bacteriophages able to lyse the clinical strain of *E. coli* were isolated from samples collected in similar areas. The isolated bacteriophages were strictly species-specific and possessed maximum lytic activity at concentrations of 10^5 viral particles per ml or more, which is the standard for commercial phage prepa-

rations. The investigated phages showed their high antibacterial activity sufficient to effectively combat against pathogenic of *E. coli* strains.

Key words: Bacteriophage, *Escherichia coli*, nosocomial infection, antibiotic resistance, lytic activity.

П.Г. Алексюк*, А.П. Богоявленский, М.С. Алексюк,
К.С. Аканова, Е.С. Молдаханов, Э.С. Омиртаева, В.Э. Березин

«Микробиология және вирусология ғылыми-өндірістік орталығы» ЖШС, Қазақстан, Алматық.

*e-mail: pagenal@bk.ru

***E. coli* клиникалық штаммдарын лизидейтін бактериофагтардың бөліп алу және сипаттау**

Нозокомиалды инфекциялар – қазіргі заманғы денсаулық сақтау саласындағы үлкен проблема. ДДҰ мәліметтері бойынша, жыл сайын ауруханаға жатқызылған он миллионға жуық науқас нозокомиалды инфекциялардың салдарынан қайтыс болады немесе мүгедек болып қалады. Нозокомиалды инфекциялардың негізгі қоздырғыштарының бірі *E. coli*, патогенді штамдары – иммунитеті төмен науқастарға өлім қаупін тудыруы мүмкін. Сонымен қатар, көптеген ішек таяқшалары штамдарының антибиотиктердің барлық дерлік кластарына төзімділігі дамыды, бұл осындай патогендермен күресте антибиотикалық терапияның тиімділігін күрт төмендетеді. Бұл жағдайда бактериялық инфекцияны емдеудің баламалы әдістерін іздеу бойынша зерттеулер өзектілігін арттыруда. Ең өзекті және перспективалы әдіс – фаготерапия.

Бұл зерттеулердің мақсаты қоршаған орта объектілерінен *E. coli* клиникалық штаммдарын лизиске қабілетті бактериофагтарды бөліп алу және олардың биологиялық қасиеттерін зерттеу болды.

Жүргізілген зерттеулердің нәтижесінде санитарлық-қолайсыз жерлерде орналасқан қоршаған орта нысандары *E. coli* литикалық бактериофагтарын оқшаулау үшін ең қолайлы объектілер болып табылатындығы анықталды. Ұқсас аймақтардан алынған үлгілерден *E. coli* клиникалық штаммын лизиске қабілетті 6 бактериофаг бөлініп алынды. Оқшауланған бактериофагтар қатаң түрде түр-спецификалық болды және бір мл-ге 10^5 немесе одан да көп вирустық бөлшектер концентрацияларында максималды литикалық белсенділікке ие болды, бұл коммерциялық фаг препараттары үшін стандарт болып табылады және олардың *E. coli* патогенді штаммдарымен тиімді күресуге жеткілікті жоғары бактерияға қарсы белсенділігін көрсетеді.

Түйін сөздер: Бактериофаг, *Escherichia coli*, нозокомиалды инфекция, антибиотикке төзімділік, литикалық белсенділік.

Сокращения и обозначения

МПБ – мясопептонный бульон;

МПА – мясопептонный агар;

БОЕ – бляшкообразующие единицы;

ФСБ – фосфатно-солевой буферный раствор.

Введение

Нозокомиальные инфекции являются одной из основных проблем современного здравоохранения. Они присутствуют почти во всех стационарах, наносят значительный вред здоровью пациентов и сотрудников медицинских учреждений, причиняют большой экономический ущерб. По данным ВОЗ ежегодно, во всём мире около десяти миллионов госпитализированных больных погибают или приобретают инвалидность из-за ненадлежащей медицинской практики и поражения внутрибольничными инфекциями. По приблизительным оценкам в развитых странах,

от внутрибольничных инфекций страдает от 5 до 10 % пациентов медицинских учреждений, в развивающихся странах их количество может достигать 25% [1]. Поражение госпитализированных пациентов нозокомиальными инфекциями увеличивает срок их нахождения в стационаре в 2-3 раза, что приводит к повышению стоимости лечения в 3-4 раза и риску летального исхода в 5–7 раз [2]. Прямые финансовые потери от нозокомиальных инфекций, согласно данным ВОЗ, ежегодно составляют примерно 7 миллиардов евро в Европе и 6,5 миллиардов долларов в США [3].

Обострение проблемы нозокомиальных инфекций обусловлено глобальным распространением антибиотикоустойчивости среди микроорганизмов. По заявлению Всемирной организации здравоохранения, многие достижения современной медицины и эпидемиологии в борьбе с инфекционными заболеваниями, сделанные в XX в., могут потерять свою зна-

чимость из-за роста устойчивости бактерий к антибиотикам.

Одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций являются патогенные штаммы *E. coli*.

E. coli представляет собой широко распространённые комменсальные грамотрицательные бактерии, обитающие в желудочно-кишечном тракте человека и многих теплокровных животных. Однако среди общей массы безопасных штаммов *E. coli* встречаются патогенные серотипы, которые могут стать причиной развития кишечных инфекций, инфекций мочевыводящих путей, мягких тканей, центральной нервной системы [4]. Ежегодно, по всему миру сотни миллионов людей страдают от заболеваний, вызванных патогенными штаммами *E. coli* [5]. Особую опасность патогенные штаммы *E. coli* представляют для госпитализированных пациентов с ослабленным иммунитетом. Нозокомиальные инфекции кишечной палочки могут привести к развитию острой бактериемии и сепсиса с последующим летальным исходом [6].

Кроме того, в условиях постоянного контакта с человеком, у большого количества штаммов *E. coli* развилась устойчивость практически ко всем известным классам антибиотиков. Повсеместное лечение кишечных инфекций антибиотиками первой линии, такими как котримоксазол, амоксициллин, амоксициллин в комплексе с клавулановой кислотой, выработали у *E. coli* резистентность к данным препаратам [7]. Использование относительно новых классов антибиотиков широкого спектра действия, фторхинолонов и цефалоспоринов, привело к развитию у *E. coli* β -лактамазной активности, что также позволяет ей успешно противостоять данным классам антибиотиков [8].

Ситуацию осложняет то, что на современном этапе развития науки, в направлении поиска и разработки новых антибиотиков, наблюдается снижение активности и сокращение финансирования подобных исследований. Сохранение такой тенденции, в конечном итоге, приведёт к исчерпанию средств для борьбы с устойчивыми бактериальными инфекциями [9].

В подобных условиях, опасность устойчивых нозокомиальных инфекций приобретает угрожающие масштабы и всё большую актуальность получают исследования по поиску альтернативных путей борьбы с ними. Наиболее перспективной альтернативой антибиотикам считаются бактериофаги.

Бактериофаги – это вирусы, поражающие бактерии. Учитывая природу бактериофагов как естественных врагов бактерий, их применение в качестве терапевтических агентов для борьбы с бактериальными инфекциями началось уже через пару лет после их открытия самим Феликсом Д’Эреллем [10]. Но после открытия и внедрения в клинику антибиотиков, интерес к бактериофагам как к средству борьбы с патогенными бактериями резко сократился. Клиническое использование бактериофагов практиковалось в основном только в России, Грузии и Польше [11].

На данный момент, из-за распространения антибиотикорезистентности, интерес к бактериофагам и фаготерапии значительно вырос. Современной науке уже известно большое количество примеров успешного использования бактериофагов для лечения антибиотикорезистентных бактериальных инфекций [12-15]. Но учитывая развития устойчивости у бактерий к фаговым инфекциям и высокую специфичность бактериофагов к своим хозяевам, необходимо проводить постоянный поиск и выделение новых, наиболее эффективных в каждом конкретном случае штаммов бактериофагов.

Целью данных исследований являлось выделение из объектов окружающей среды бактериофагов способных лизировать клинические штаммы *E. coli*, и изучение их биологических свойств.

Материалы и методы

Отбор образцов окружающей среды. Для выделения бактериофагов *E. coli* было отобрано 5 образцов почвы и 5 образцов воды. Образцы почвы были отобраны: 1) на территории пункта сбора товарно-бытовых отходов в микрорайоне Тастак 2, г. Алматы, 2) на территории мусорного полигона находящейся на 36 км автомагистрали Алматы – Капшагай, 3) на территории мусорного полигона г. Капшагай, 4) на берегу озера расположенного в районе аэропорта г. Алматы, 5) на берегу реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы; образцы воды были отобраны: 1) из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак, 5) из озера, расположенное в районе аэропорта г. Алматы.

Отбор образцов почвы и воды проводили в стерильную посуду объёмом 500 мл, отбор проб воды вели на глубине 15-20 см, отбор проб почвы осуществляли с поверхностного слоя глубиной до 10 см. Образцы транспортировали и хранили при температуре 4...8°C в непрозрачной и защищённой от прямых солнечных лучей упаковке.

Штаммы бактерий. Для выделения, пассажа бактериофагов и описания их свойств использовали клинический штамм *E. coli* 753, предоставленный АО «Центральная клиническая больница» г. Алматы. Данный штамм *E. coli* обладает лекарственной устойчивостью к пенициллинам, фторхинолонам I-III поколения, триметоприму.

Для изучения специфичности выделенных бактериофагов использовали *Ps. aeruginosa* 153 – штамм, выделенный с поверхности испорченных мясных продуктов и *Bacillus subtilis* – стандартный образец сенной палочки. Данные штаммы были предоставлены коллекцией микроорганизмов «НПЦ микробиологии и вирусологии».

Питательные среды. Для культивирования бактерий и пассажей бактериофагов использовали мясопептонный бульон (МПБ) (Nutrient Broth, «Himedia», India). Для хранения бактерий, выделения бактериофагов, определения титра по Грациа и описания морфологии бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали 2% питательный агар (МПА) (Nutrient Agar «Himedia», India).

Для фильтрации отобранных образцов и фаголизатов использовали бумажный фильтр «Красная лента» и мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм Agilent Captiva (Agilent Technologies, USA).

Получение фильтратов почвенных образцов. 50 г образца почвы заливали 500 мл стерильного фосфатно-солевого буфера pH 7,4 (ФСБ), далее комки почвы тщательно измельчали до получения как можно более однородной суспензии и ставили на качалку на 6 часов. Через 6 часов суспензию почвы фильтровали через бумажный фильтр «Красная лента», затем, для инактивации патогенных микроорганизмов в полученный фильтрат добавляли хлороформ до концентрации 0,1% и выдерживали в течении 24 часов при температуре 4...8°C. Далее образцы фильтровали через бумажный фильтр и через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Образцы хранили стерильно в тёмном месте при температуре 4...8°C [16].

Получение фильтратов водных образцов. Для инактивации патогенных микроорганизмов

в водные образцы добавляли хлороформ до концентрации 0,1% и выдерживали в течении 24 часов при температуре 4...8°C. Водный образец фильтровали через бумажный фильтр и через бактериальный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Образцы хранили стерильно в тёмном месте при температуре 4...8°C [17].

ДНК из полученных фильтратов выделяли с помощью набора для экстракции PureLinkViralDNA/RNAMiniKit («Invitrogen», USA) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию выделенной ДНК определяли при помощи набора Qubit dsDNA HS (High Sensitivity) согласно инструкции, для флуориметра Qubit 2,0. Анализ качества геномных библиотек проводили на приборе Agilent 2100, при использовании прилагаемых чипов согласно инструкции производителя [18].

Метагеномный анализ отобранных образцов проводили методом множественного параллельного секвенирования при использовании прибора Illumina MiSeq [19]. Контроль качества полученных ридов был выполнен с помощью программы Fast QC. Затем полученные данные были обработаны в Trimmomatic v. 0.36, последовательности короче 50 нуклеотидов были исключены из анализа; адаптеры были удалены. После удаления некачественных считываний и обрезки адаптеров последовательности были проанализированы программой Kaiju с использованием базы данных не избыточных белков: бактерий, архей, вирусов, грибов и микробных эукариот (NCBI BLAST nr + euk) с параметрами по умолчанию [20]. Графическое представление полученных результатов проводилось с помощью программы «Krona». Анализ предсказанных генов проведен с помощью онлайн – сервера «MG-RAST» [21].

Культивирование используемых штаммов бактерий проводили в МПБ в течении 24 часов при 37°C. МПБ готовили в соответствии с инструкцией производителя [22].

Проверка бактериальных культур на наличие лизогенных бактериофагов. Чашки Петри с подготовленным 2% питательным агаром засеивали сплошным газоном 24 часовой бактериальной культурой. Через 18 часов инкубации при 37°C фиксировали рост сплошного газона бактерий с отсутствием каких-либо зон лизиса, после чего открытые чашки Петри облучали ультрафиолетом в течении 10 минут на расстоянии 10 см. Облучённые бактерии смывали 10 мл питательного бульона и культивировали 2 часа при 37°C, за-

тем в бактериальную суспензию добавляли 500 мкл хлороформа (50 мкл на 1 мл суспензии), встряхивали, после чего откручивали 10 минут при 6000 об/мин [23]. Наличие бактериофагов в полученном надосадке определяли методом Отто.

Определение наличия бактериофагов методом Отто. Расплавленный 2 % питательный агар разливали по стерильным чашкам Петри, охлаждали, подсушивали в термостате 10-15 мин. Сплошным газонем засеивали на чашки 24 ч культуру бактерий. Наносили каплю образца ближе к одной из сторон чашки, затем чашку наклоняли и давали капле стечь до противоположного края чашки. Чашки инкубировали при 37°C в течение 12 ч после чего фиксировали результат. Если в образце содержался бактериофаг, то по пути стекания капли образца формировалась зона лизиса [24].

Обогащение бактериофагами фильтратов, полученных от образцов окружающей среды. К 45 мкл подготовленного фильтрата добавляли 5 мл 10-кратного МПБ, 5 мл суспензии индикаторных бактерий находящихся в лаг-фазе роста и 100 мкл $MgSO_4$. Для обеспечения инфицированности бактерий вирусами и репродукции новых дочерних вирусных частиц смесь культивировали в течении 18 – 24 ч при 37°C с аэрацией. Далее полученный фаголизат центрифугировали в течение 30 мин при 3000 об/мин. Супернатант отфильтровывали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Очищенные фаголизаты, хранили в стерильных условиях при 4...8°C [25]. Наличие фага в фильтрате определяют методом Отто [24].

Выделение бактериофагов на твердой питательной среде. Очищенный от бактерий фаголизат 10-кратно титровали до получения девяти разведений. Каждое разведение объёмом 1 мл смешивали с 14 мл 2% питательного агара и добавляли 1 мл 24 часовой культуры индикаторных бактерий. Полученную смесь заливали в чашки Петри и инкубировали в течении 18 часов при 37°C. В качестве контроля использовали ту же смесь, но вместо водного образца добавляли 1 мл стерильного фосфатного буфера. По истечению срока инкубации визуально фиксировали формирование отдельных БОЕ на сплошном газоне бактериальной культуры.

Выделение чистых линий бактериофагов. После обнаружения БОЕ на сплошном газоне бактериальной культуры выбирали отдельно стоящую зону лизиса при максимальном разведе-

нии фаголизата, вырезали её стерильным шпателем или микробиологической петлёй и помещали в стерильную пробирку. В ту же пробирку добавляли 5 мл стерильного питательного бульона, и инкубировали в шейкер-термостате при 37°C и 100 об/мин. Через 2 часа инкубации весь питательный бульон из пробирки, в стерильных условиях пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и добавляли 100 мкл 24 часовой культуры индикаторных бактерий. Полученную смесь культивировали 18 часов при 37°C, после чего центрифугировали 10 минут при 6000 об/мин и пропускали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Далее из полученной фаголизата отбирали 100 мкл и проводили девять 10-кратных разведений в 900 мкл стерильного ФСБ. Каждое разведение смешивали с 14 мл 2% питательного агара и 1 мл 24 часовой культуры индикаторных бактерий, заливали в чашки Петри и культивировали 18 часов при 37°C. После культивирования фиксировали БОЕ при максимальном разведении, вырезали отдельно стоящую зону лизиса и повторно проводили посев фага по вышеописанной методике. Для получения чистой линии бактериофага последовательно проводили три пассажа каждый раз вырезая отдельно стоящую зону лизиса при максимальном разведении.

Накопительный пассаж бактериофагов. В стерильные 50-ти мл пробирки разливали по 40 мл стерильного МПБ, далее добавляли 500 мкл фаголизата пассируемого бактериофага и 5 мл суточной культуры бактерий-хозяев. Культивирование проводили в течении 24 часа при 37°C. После культивирования, полученные фаголизаты последовательно очищали центрифугированием в течении 30 минут при 6000 об/мин и фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Фаголизаты хранили в стерильных условиях при температуре 4...8°C [26].

Определение литической активности полученных фаголизатов проводили методом Апфельмана [27].

Титр бактериофага в суспензии определяли методом Грация [28].

Результаты исследований и их обсуждение

Метагеномный анализ образцов окружающей среды на наличие бактериофагов

По классификации, бактериофаги, поражающие *E. coli* в основном относятся к трём семействам порядка *Caudovirales*: *Myoviridae*, *Podoviridae*

viridae и *Siphoviridae*. Для оценки возможности выделения литических бактериофагов *E. coli* из объектов окружающей среды был проведён метагеномный анализ на наличие вирусов порядка *Caudovirales* в двух модельных образцах: образец почвы – почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы; образец воды – вода, отобранная с канализационных полей фильтрации города Капшагай. Данные объекты были выбраны в следствии их неблагоприятного санитарного состояния, что значительно повышает вероятность выделения литических бактериофагов *E. coli*.

После секвенирования тотальной нуклеиновой кислоты, выделенной из почвы с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы и последующего метагеномного ана-

лиза было установлено, что в данном образце порядок *Caudovirales* на 50% был представлен семейством *Podoviridae*, на 45% – семейством *Siphoviridae*, на 3% – семейством *Myoviridae* и 2% – не классифицируемые вирусы порядка *Caudovirales* (Рисунок 1).

Метагеномный анализ каждого семейства бактериофагов из почвенного образца позволил идентифицировать нуклеотидные последовательности 10 бактериофагов *Podoviridae*, 15 бактериофагов *Siphoviridae* и 18 бактериофагов *Myoviridae*. При этом 49% всех нуклеотидных последовательностей семейства *Podoviridae*, 29% нуклеотидных последовательностей семейства *Siphoviridae* и 10% нуклеотидных последовательностей семейства *Myoviridae* были не классифицированы.

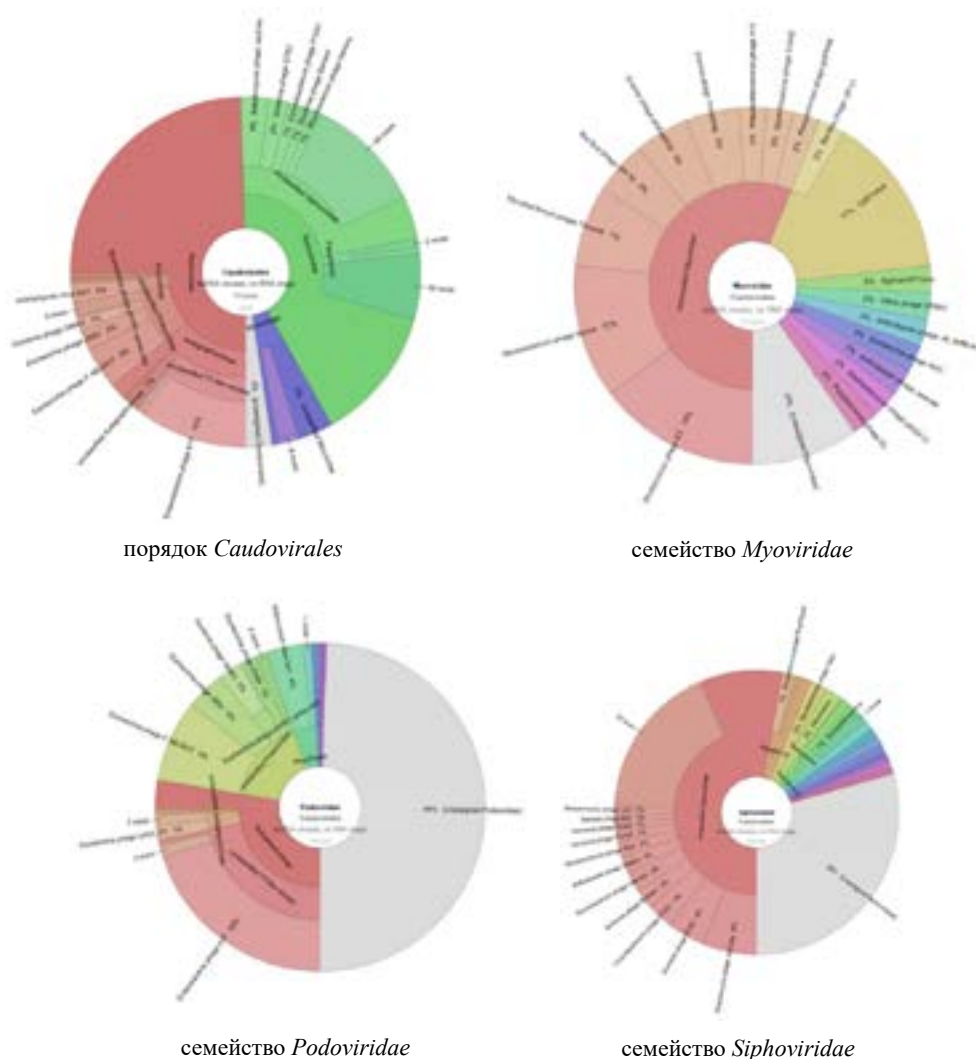


Рисунок 1 – Метагеномный анализ образца почвы на наличие бактериофагов порядка *Caudovirales*, семейств *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*

Секвенирование и метагеномный анализ тотальной нуклеиновой кислоты водного образца с канализационных полей фильтрации города Капшагай, показал, что порядок *Caudovirales*, в данном случае, на 55% представлен семейством *Myoviridae*, на 25% – семейством *Siphoviridae*, на 18% – семейством *Podoviridae* и 2% – не классифицируемые вирусы порядка *Caudovirales*

(Рисунок 2). Анализ нуклеотидных последовательностей каждого из представленных семейств позволил идентифицировать 16 бактериофагов семейства *Myoviridae*, 9 бактериофагов семейства *Siphoviridae* и 9 бактериофагов семейства *Podoviridae*. Не удалось классифицировать 2% нуклеотидных последовательностей семейства *Podoviridae*, 8% – *Siphoviridae* и 6% – *Myoviridae*.

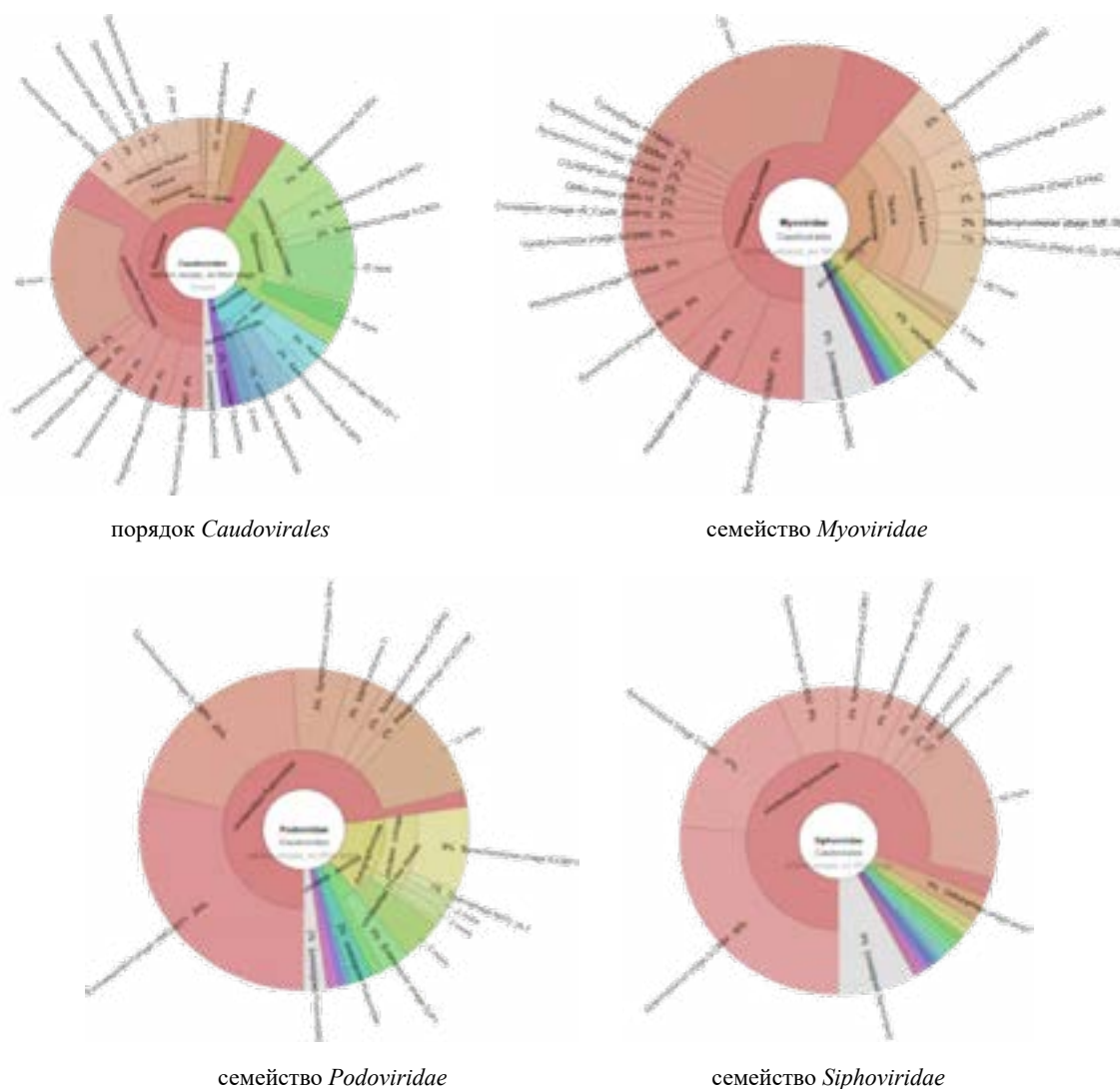


Рисунок 2 – Метагеномный анализ образца воды на наличие бактериофагов порядка *Caudovirales*, семейств *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*

Таким образом, в результате проведенных исследований было установлено, что в отобранных образцах содержится широкое разнообразие бактериофагов порядка *Caudovirales* относящихся к семействам *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Siphoviridae*. В почвенном образце с берега реки

Правый Есентай и водном образце с канализационных полей фильтрации г. Капшагай в общем удалось идентифицировать наличие нуклеотидных последовательностей 43 и 34 штаммов бактериофагов порядка *Caudovirales*, соответственно. При этом во всех случаях есть доля (от 2% до

49%) неклассифицированных последовательно-стей, относящихся ко всем трём семействам порядка *Caudovirales*, что может дать возможность по выделению и определению новых штаммов бактериофагов.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой вероятности выделения литических бактериофагов *E. coli* из образцов окружающей среды отобранных в санитарно-неблагополучных районах.

Выделение литических бактериофагов E. coli

Для выделения литических бактериофагов *E. coli* было отобрано 10 образцов из санитарно-неблагополучных объектов окружающей среды. 5 образцов почвы: 1) на территории пункта сбора товарно-бытовых отходов в микрорайоне Тастак 2, г. Алматы, 2) на территории мусорного полигона находящейся на 36 км автомагистрали Алматы – Капшагай, 3) на территории мусорного полигона г. Капшагай, 4) на берегу озера расположенного в районе аэропорта г. Алматы, 5) на берегу реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы. 5 образцов воды: 1) из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак, 5) из озера, расположенное в районе аэропорта г. Алматы.

Из отобранных образцов были получены фильтраты. Методом капельного теста (метод Отто) все полученные фильтраты были проверены на наличие в них бактериофагов способных лизировать *E. coli*.

Литические бактериофаги *E. coli* были обнаружены в 1 почвенном образце – почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Кемел, г. Алматы, и 4 водных образцах: 1) образец из реки Правый Есентай в районе микрорайона Кемел, г. Алматы, 2) образец из сбросного коллектора канализационных вод города Шымкент, 3) образец из накопителей канализационных полей фильтрации города Капшагай, 4) образец из сточного канал, впадающий в озеро Сорбулак.

Методом последовательных селективных пассажей было выделено 6 чистых линий бактериофагов способных лизировать *E. coli*. В соответствии с источником выделения и бактерией хозяином фаги получили название ECPS-1, ECPR-1, ECS-1, ECFFK-1, ECScS-1, ECScS-2.

Характеристика выделенных бактериофагов

Выделенные фаги исследовали по свойствам, имеющим таксономическое значение: 1) морфологии БОЕ; 2) литической активности и 3) специфичности.

Морфологию БОЕ изучали при посеве на питательный агар совместно с индикаторными бактериями *E. coli* (Таблица 1, Рисунок 3).

Таблица 1 – Описание выделенных бактериофагов

Условное наименование бактериофага	Описание морфотипа негативной колонии	Место выделения бактериофага	Индикаторная культура бактерий
ECPS-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 2,4$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 7 мм.	Почва с берега реки Правый Есентай в районе мкр. Первомайский, г. Алматы	<i>E. coli</i>
ECPR-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 2,1$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 6 мм.	Вода из реки Правый Есентай в районе мкр. Первомайский, г. Алматы	<i>E. coli</i>
ECS-1	Прозрачная колония диаметром ≈ 4 мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 8 мм.	Канализационные воды г. Шымкент	<i>E. coli</i>
ECFFK-1	Прозрачная колония диаметром ≈ 3 мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 7 мм.	Вода с канализационных полей фильтрации г. Капшагай	<i>E. coli</i>
ECScS-1	Прозрачная колония диаметром $\approx 1,5$ мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 5 мм.	Вода из сточного канала, впадающего в озеро Сорбулак	<i>E. coli</i>
ECScS-2	Прозрачная колония диаметром ≈ 2 мм со слабовыраженной зоной неполного лизиса диаметром до 6 мм.	Вода из сточного канала, впадающего в озеро Сорбулак	<i>E. coli</i>

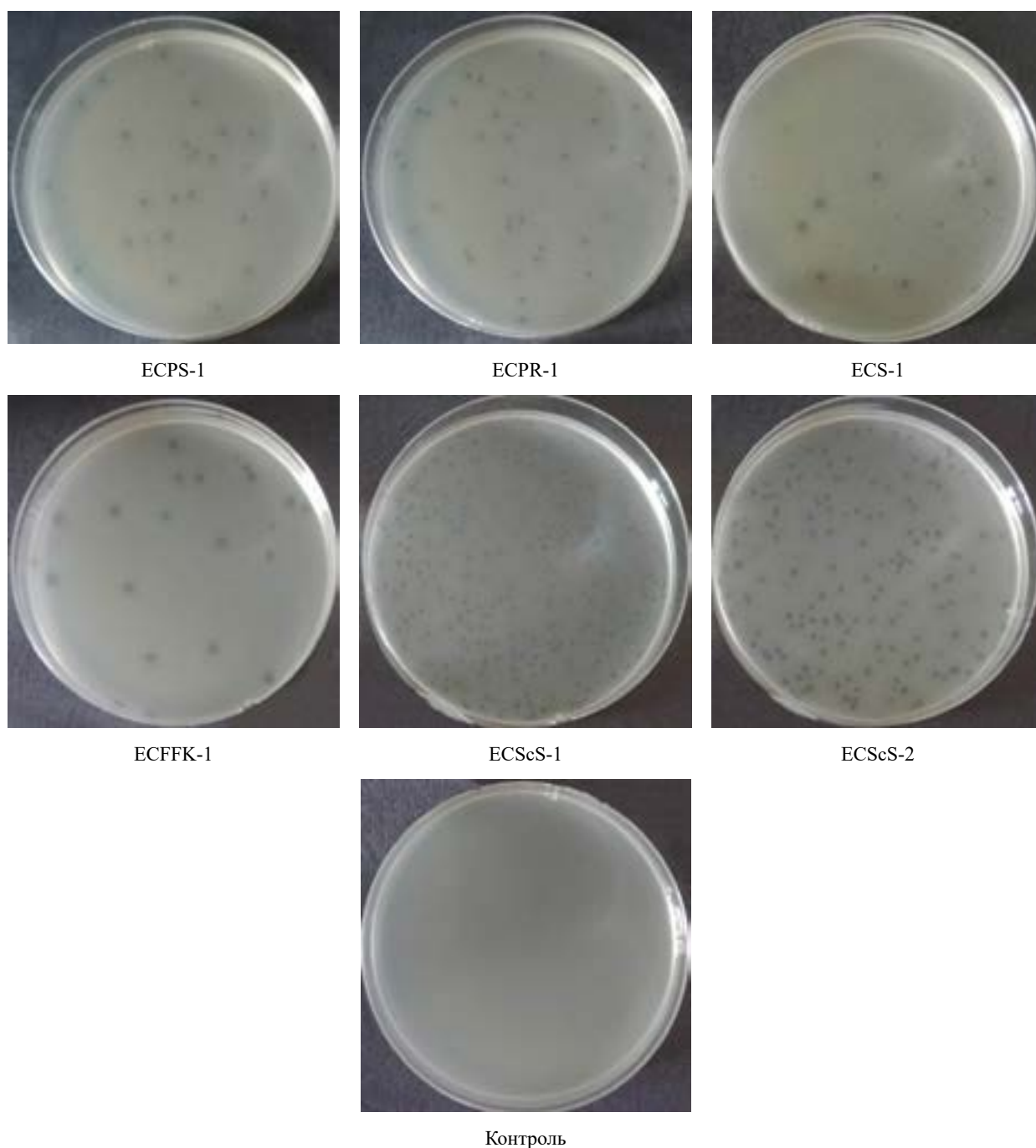


Рисунок 3 – Зоны лизиса, сформированные выделенными бактериофагами *E. coli*

Было установлено, что все выделенные бактериофаги формируют БОЕ ровной округлой формы диаметром от 1,5 до 4 мм и с зоной неполного лизиса от 5 до 8 мм. Так же было показано, что каждый выделенный бактериофаг формирует скопление БОЕ одинакового морфотипа, в среднем с одинаковым диаметром и зоной не-

полного лизиса, что подтверждает чистоту линии выделенных фагов.

Уровень литической активности выделенных бактериофагов определяли по методу Аппельмана, титр определяли по методу Грациа.

Было показано (Таблица 2), что все выделенные бактериофаги обладали уровнем литиче-

ской активности от 10^{-6} до 10^{-8} и имели высокий титр вирусных частиц – 10^8 – 10^9 на 1 мл.

При производстве коммерческих фаговых препаратов стандартной дозой считается 10^5 вирусных частиц на 1 мл с литической активностью по Аппельману от 10^{-5} . Концентрация и литическая активность, выделенных в данной работе бактериофагов, на порядок и более превышает стандартную, поэтому выделенные бак-

териофаги могут быть использованы при разработке новых, эффективных антибактериальных препаратов, предназначенных для борьбы с нозокомиальными инфекциями.

Специфичность выделенных бактериофагов определяли при их совместном посеве на питательный агар с бактериями *E. coli* 753, *Ps. aeruginosa* 153 и *Bacillus subtilis*, после чего визуально фиксировали формирование зон лизиса (Таблица 3).

Таблица 2 – Титр и литическая активность выделенных бактериофагов

Штамм бактериофага	Титр по Грациа	Литическая активность по Аппельману
ECPS-1	$2,7 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-6}
ECPR-1	$4,2 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-7}
ECS-1	$9 \pm 0,3 \times 10^9$	10^{-8}
ECFFK-1	$2,2 \pm 0,1 \times 10^6$	10^{-6}
ECScS-1	$3,4 \pm 0,1 \times 10^8$	10^{-8}
ECScS-2	$1,7 \pm 0,08 \times 10^8$	10^{-7}

Таблица 3 – Литическая активность бактериофагов

Фаг	Литическая активность		
	<i>E. coli</i> 753	<i>Ps. aeruginosa</i> 153	<i>Bacillus subtilis</i>
ECPS-1	+	-	-
ECPR-1	+	-	-
ECS-1	+	-	-
ECFFK-1	+	-	-
ECScS-1	+	-	-
ECScS-2	+	-	-

*- + – наличие зон лизиса; -

В результате было показано, что выделенные бактериофаги обладали литической активностью только по отношению к клиническому штамму *E. coli* 753. Следовательно, данные бактериофаги представляют собой чистые линии узкоспецифические штаммы колифагов и при лечении инфекций вызванных патогенными *E. coli* полезная микрофлора страдать не будет.

Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что объекты окружающей

среды, расположенные в санитарно-неблагополучных районах, обладают широким разнообразием бактериофагов порядка *Caudovirales* и являются наиболее предпочтительными объектами для выделения литических бактериофагов *E. coli*.

На основании полученных данных было отобрано по 5 образцов почвы и воды из санитарно-неблагополучных районов. Из отобранных образцов было выделено 6 бактериофагов способных лизировать клинический штамм *E. coli*.

При изучении литической активности и специфичности было установлено, что все вы-

деленные бактериофаги являлись строго видоспецифичными и обладали максимальной литической активностью в концентрациях 10^5 вирусных частиц в мл и более, что является стандартом для коммерческих фаговых препаратов и показывает их высокую антибактериальную активность достаточную для эффективной борьбы с патогенными штаммами бактерий *E. coli*.

Полученные результаты дают все основания для возможного использования выделенных бактериофагов *E. coli* в разработке новых высокоэффективных антибактериальных препаратов против антибиотикоустойчивых нозокомиальных инфекций *E. coli*.

Конфликт интересов

Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

Источник финансирования

Работа выполнена по теме проекта АР08855753 «Изучение фагоспецифической индукции иммунного ответа как фактора антимикробной терапии» выполняемому в рамках Договора от 12 ноября 2020 года №214 на реализацию научных, научно-технических проектов по грантовому финансированию (2020–2022 гг.).

Литература

- 1 World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – Geneva: WHO, 2018. – 86 p. <https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/6-june-18108-world-health-statistics-2018.pdf>
- 2 Madden G.R., Weinstein R.A., Sifri C.D. Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections: Opportunities and Challenges to Safely Reduce Test Use // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* – 2018. – Vol. 39, N 2. – P. 214–218. doi: 10.1017/ice.2017.278.
- 3 Divatia J.V., Pulinilkunnathil J.G., Myatra S.N. Nosocomial Infections and Ventilator-Associated Pneumonia in Cancer Patients // *Oncologic Critical Care.* – 2019. – Vol. 9. – P. 1419–39. doi: 10.1007/978-3-319-74588-6_125.
- 4 Croxen M.A., Finlay B.B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity // *Nat Rev Microbiol.* – 2010. – Vol. 8(1). – P. 26–38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- 5 Nicolas-Chanoine M. H., Bertrand X., Madec, J. Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group // *Clinical microbiology reviews.* – 2014. – Vol. 27(3). – P. 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13
- 6 Russo T.A., Johnson J.R. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlook epidemic // *Microbes Infect.* – 2003. – Vol. 5. – P. 449–456. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00049-2
- 7 Gupta K., Scholes D., Stamm W.E. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women // *JAMA.* – 1999. – Vol. 281. – P. 736–738. doi: 10.1001/jama.281.8.736
- 8 Coque T.M., Baquero F., Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe // *Euro Surveill.* – 2008. – Vol. 13(47). – pii=19044.
- 9 Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization. Volume XXII. – Geneva: WHO, 2014. – 232 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
- 10 Chanishvili N. Phage therapy-history from Twort and d’Herelle through Soviet experience to current approaches // *Adv. Virus Res.* – 2012. – Vol. 83. – P. 3–40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- 11 Salmond G.P., Fineran P.C. A century of the phage: Past, present and future // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2015. – Vol. 13. – P. 777–786. doi: 10.1038/nrmicro3564.
- 12 Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Sothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* // *Nat Med.* – 2019. – Vol. 25(5). – P. 730–733. doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
- 13 Gordillo Altamirano F. L., Barr, J. J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era // *Clinical microbiology reviews.* – 2019. – Vol. 32(2). – e00066-18. doi: /10.1128/CMR.00066-18.
- 14 Chang R., Wallin M., Lin Y., Leung S., Wang H., Morales S., Chan H. K. Phage therapy for respiratory infections // *Advanced drug delivery reviews.* – 2018. – Vol. 133. – P. 76–86. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
- 15 Zhvania P., Hoyle N. S., Nadareishvili L., Nizharadze D., Kutateladze M. Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome // *Frontiers in medicine.* – 2017. – Vol. 4. – P. 94. doi: 10.3389/fmed.2017.00094.
- 16 Cross T., Schoff C., Chudoff D., Graves L., Broomell H., Terry K., Farina J., Correa A., Shade D., Dunbar D. An optimized enrichment technique for the isolation of *Arthrobacter* bacteriophage species from soil sample isolates // *J. Vis. Exp.* – 2015. – Vol 9, N98. –e52781. doi: 10.3791/52781.
- 17 Zaczek-Moczydłowska M.A., Young G.K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C.C., Campbell K., O’Hanlon R. Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions // *PLoS One.* – 2020. – Vol. 15, N4. – e0230842. doi: 10.1371/journal.pone.0230842.

- 18 Radpour R., Sikora M., Grussenmeyer T., Kohler C., Barekati Z., Holzgreve W., Lefkovits I., Zhong X.Y. Simultaneous isolation of DNA, RNA, and proteins for genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic analysis // *J. Proteome. Res.* – 2009. – Vol. 8, N11. – P. 5264 – 5274. doi: 10.1021/pr900591w.
- 19 Tucker T., Marra M., Friedman, J. M. Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine // *Am. J. Hum. Genet.* – 2009. – Vol. 85, N2. – P. 142–154. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022.
- 20 Breitwieser F.P., Lu J., Salzberg S.L. A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly // *Briefings in Bioinformatics.* – 2017. – Vol. 20. – P. 1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120.
- 21 Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes // *BMC Bioinformatics.* – 2008. – Vol. 9. – P. 386. doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- 22 Mokszycki M.E., Leatham-Jensen M., Steffensen J.L., Zhang Y., Krogfelt K.A., Caldwell M.E., Conway T., Cohen P.S. A Simple In Vitro Gut Model for Studying the Interaction between *Escherichia coli* and the Intestinal Commensal Microbiota in Cecal Mucus // *Appl. Environ Microbiol.* – 2018. – Vol. 84, N24. – e02166-18. doi: 10.1128/AEM.02166-18.
- 23 Berenstein D. Prophage induction by ultraviolet light in *Acinetobacter calcoaceticus* // *J. Gen. Microbiol.* – 1986. – Vol. 132, N9. – P. 2633-2636. doi: 10.1099/00221287-132-9-2633. PMID: 3794658.
- 24 Chhibber S., Kaur P., Gondil V.S. Simple drop cast method for enumeration of bacteriophages // *J Virol Methods.* – 2018. – Vol. 262. – P. 1-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.001.
- 25 Van Twert R, Kropinski A.M. Bacteriophage enrichment from water and soil // *Methods Mol Biol.* – 2009. – Vol. 501. P. 15-21. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_2.
- 26 Tan C.W., Rukayadi Y., Hasan H., Abdul-Mutalib N.A., Jambari N.N., Hara H., Thung T.Y., Lee E., Radu S. Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples // *Front. Microbiol.* – 2021. – Vol. 10. – e616548. doi: 10.3389/fmicb.2021.616548.
- 27 Burrowes B.H., Molineux I.J., Fralick, J.A. Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol // *Viruses.* – 2019. – Vol. 11. 241. doi: 10.3390/v11030241
- 28 Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 501. – P. 69 – 76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7.

References

- 1 Breitwieser F.P., Lu J., Salzberg S.L. (2017) A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics.*, vol. 20., pp. 1125-1136. doi: 10.1093/bib/bbx120.
- 2 Berenstein D. (1986) Prophage induction by ultraviolet light in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.*, vol. 132, no 9, pp. 2633-2636. doi: 10.1099/00221287-132-9-2633. PMID: 3794658.
- 3 Burrowes B.H., Molineux I.J., Fralick, J.A. (2019) Directed in vitro evolution of therapeutic bacteriophages: the Appelmans protocol. *Viruses*, vol. 11, pp. 241. doi: 10.3390/v11030241
- 4 Chang R., Wallin M., Lin Y., Leung S., Wang H., Morales S., Chan H. K. (2018) Phage therapy for respiratory infections. *Advanced drug delivery reviews*, vol. 133, pp. 76–86. doi: 10.1016/j.addr.2018.08.001.
- 5 Chanishvili N. (2012) Phage therapy-history from Twort and d'Herelle through Soviet experience to current approaches. *Adv. Virus Res.*, vol. 83, pp. 3-40. doi: 10.1016/B978-0-12-394438-2.00001-3.
- 6 Chhibber S., Kaur P., Gondil V.S. (2018) Simple drop cast method for enumeration of bacteriophages. *J. Virol. Methods*, vol. 262, pp. 1-5. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.09.001.
- 7 Coque T.M., Baquero F., Canton R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.*, vol. 13, no47, pii. 19044.
- 8 Cross T., Schoff C., Chudoff D., Graves L., Broomell H., Terry K., Farina J., Correa A., Shade D., Dunbar D. (2015) An optimized enrichment technique for the isolation of *Arthrobacter* bacteriophage species from soil sample isolates. *J. Vis. Exp.* vol 9, no 98, e52781. doi: 10.3791/52781.
- 9 Croxen M.A., Finlay B.B. (2010) Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 8, no 1, pp. 26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265
- 10 Dedrick R.M., Guerrero-Bustamante C.A., Garlena R.A., Russell D.A., Ford K., Harris K., Gilmour K.C., Sothill J., Jacobs-Sera D., Schooley R.T., Hatfull G.F., Spencer H. (2019) Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat. Med.*, vol. 25, no 5, pp. 730-733. doi: 10.1038/s41591-019-0437-z.
- 11 Divatia J.V., Pulinilkunnathil J.G., Myatra S.N. (2019) Nosocomial Infections and Ventilator-Associated Pneumonia in Cancer Patients. *Oncologic Critical Care*, vol. 9, pp. 1419–39. doi: 10.1007/978-3-319-74588-6_125.
- 12 Gordillo Altamirano F. L., Barr, J. J. (2019) Phage Therapy in the Postantibiotic Era. *Clinical microbiology reviews*, vol. 32, no 2, e00066-18. doi: /10.1128/CMR.00066-18.
- 13 Gupta K., Scholes D., Stamm W.E. (1999) Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA*, vol. 281, pp. 736–738. doi: 10.1001/jama.281.8.736.
- 14 Kropinski A.M., Mazzocco A., Waddell T.E., Lingohr E., Johnson R.P. (2009) Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *Methods Mol. Biol.*, vol. 501, pp. 69 – 76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_7.
- 15 Madden G.R., Weinstein R.A., Sifri C.D. (2018) Diagnostic Stewardship for Healthcare-Associated Infections: Opportunities and Challenges to Safely Reduce Test Use. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.*, vol. 39, no. 2, pp. 214-218. doi: 10.1017/ice.2017.278.

- 16 Meyer F., Paarmann D., D'Souza M., Olson R., Glass E.M., Kubal M., Paczian T., Rodriguez A., Stevens R., Wilke A., Wilkening J., Edwards R.A. (2008) The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics*, vol. 9, pp. 386. doi: 10.1186/1471-2105-9-386.
- 17 Mokszycki M.E., Leatham-Jensen M., Steffensen J.L., Zhang Y., Krogfelt K.A., Caldwell M.E., Conway T., Cohen P.S. (2018) A Simple In Vitro Gut Model for Studying the Interaction between *Escherichia coli* and the Intestinal Commensal Microbiota in Cecal Mucus. *Appl. Environ Microbiol.*, vol. 84, no. 24, e02166-18. doi: 10.1128/AEM.02166-18.
- 18 Nicolas-Chanoine M. H., Bertrand X., Madec, J. Y. (2014) *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, vol. 27, no 3, pp. 543–574. doi: 10.1128/CMR.00125-13.
- 19 Radpour R., Sikora M., Grussenmeyer T., Kohler C., Berekati Z., Holzgreve W., Lefkovits I., Zhong X.Y. (2009) Simultaneous isolation of DNA, RNA, and proteins for genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic analysis. *J. Proteome Res.*, vol. 8, no.11. pp. 5264 – 5274. doi: 10.1021/pr900591w.
- 20 Russo T.A., Johnson J.R. (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: an overlook epidemic. *Microbes Infect.*, vol. 5, pp. 449–456. doi: 10.1016/S1286-4579(03)00049-2.
- 21 Salmond G.P., Fineran P.C. (2015) A century of the phage: Past, present and future. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 13, pp. 777–786. doi: 10.1038/nrmicro3564.
- 22 Tan C.W., Rukayadi Y., Hasan H., Abdul-Mutalib N.A., Jambari N.N., Hara H., Thung T.Y., Lee E., Radu S. (2021) Isolation and Characterization of Six *Vibrio parahaemolyticus* Lytic Bacteriophages From Seafood Samples. *Front. Microbiol.*, vol. 10, e616548. doi: 10.3389/fmicb.2021.616548.
- 23 Tucker T., Marra M., Friedman, J. M. (2009) Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 85, no. 2, pp. 142–154. doi: 10.1016/j.ajhg.2009.06.022.
- 24 Van Twest R, Kropinski A.M. (2009) Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol. Biol.*, vol. 501, pp. 15-21. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6_2.
- 25 World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Volume XXII. – Geneva: WHO, 2014. – 232 p. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>.
- 26 World Health Organization. World health statistics 2018: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. – Geneva: WHO, 2018. – 86 p. <https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/world-health-statistic-reports/6-june-18108-world-health-statistics-2018.pdf>
- 27 Zaczek-Moczydlowska M.A., Young G.K., Trudgett J., Plahe C., Fleming C.C., Campbell K., O' Hanlon R. (2020) Phage cocktail containing Podoviridae and Myoviridae bacteriophages inhibits the growth of *Pectobacterium* spp. under in vitro and in vivo conditions. *PLoS One*, vol. 15, no. 4, e0230842. doi: 10.1371/journal.pone.0230842.
- 28 Zhvania P., Hoyle N. S., Nadareishvili L., Nizharadze D., Kutateladze M. (2017) Phage Therapy in a 16-Year-Old Boy with Netherton Syndrome. *Frontiers in medicine*, vol. 4, pp. 94. doi: 10.3389/fmed.2017.00094.