

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

На правах рукописи

Тимошина Ольга Юрьевна

**БАКТЕРИОФАГИ *ACINETOBACTER BAUMANNII*
СЕМЕЙСТВА *AUTOGRAPHIVIRIDAE*:
ФЕРМЕНТАТИВНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПОЛИСАХАРИДАМИ**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Член-корр. РАН, доктор химических наук
Мирошников Константин Анатольевич

Москва - 2023

Оглавление

Список использованных сокращений	5
1. Введение.....	6
1.1 Актуальность темы исследования и степень её разработанности	6
1.2 Объект исследования. Цель и задачи работы.....	8
1.3 Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы	9
1.4 Методология и методы исследования. Личный вклад автора.....	9
1.5 Положения, выносимые на защиту	11
1.6 Степень достоверности и апробация результатов	11
1.7 Благодарности	12
1.8 Структура работы.....	12
1.9 Публикации.....	13
2. Обзор литературы.....	15
2.1. Краткая характеристика рода <i>Acinetobacter</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.2. Современная таксономия рода <i>Acinetobacter</i>	19
2.3. Антимикробная устойчивость штаммов <i>A. baumannii</i> и распространённость инфекций, вызванных <i>A. baumannii</i>	24
2.4. Факторы, ассоциированные с патогенностью и вирулентностью <i>A. baumannii</i>	29
2.5. Роль капсулы в патогенезе инфекций, вызванных штаммами <i>A. baumannii</i>	35
2.6. Общая характеристика бактериофагов класса <i>Caudoviricetes</i>	41
2.7. Характеристика бактериофагов, специфически инфицирующих <i>A. baumannii</i>	43
2.7.1 Вирусы с коротким несократимым хвостом	45
2.7.2 Вирусы с длинным сократимым хвостом.....	51

2.7.3 Вирусы с длинным несократимым хвостом.....	58
2.8. Деполимеразы фагов <i>A. baumannii</i>	59
2.9. Практическое применение бактериофагов и фаговых ферментов для контроля бактериальных инфекций	61
2.10. Заключение к обзору литературных данных.....	64
3. Материалы и методы.....	67
3.1. Штаммы <i>A. baumannii</i>	67
3.2. Выделение, культивирование и очистка бактериофагов	70
3.3. Электронная микроскопия бактериофагов.....	72
3.4. Определение специфичности бактериофагов	72
3.5. Определение параметров инфекционного процесса	73
3.6. Очистка ДНК бактериофагов. Секвенирование и анализ фаговых геномов	74
3.7. Номера геномов бактериофагов в базе данных GenBank	75
3.8. Определение филогении и таксономии бактериофагов.....	75
3.9. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинатных ферментов.....	76
3.10. Изоляция капсульных полисахаридов штаммов <i>A. baumannii</i> и их обработка рекомбинантными ферментами.....	78
3.11. Определение строения капсульных полисахаридов штаммов <i>A. baumannii</i> методом ЯМР.....	78
4. Результаты и обсуждение	80
4.1. Изоляция бактериофагов <i>A. baumannii</i> и определение их специфичности... 80	
4.2. Характеристики инфекционного процесса бактериофагов	81
4.3. Организация геномов выделенных бактериофагов	82
4.4. Сравнение геномов выделенных бактериофагов.....	85
4.5. Филогенетический анализ	87

4.6. Ферментативное взаимодействие рекомбинантных белков хвостовых шипов исследуемых бактериофагов с капсульными полисахаридами.....	89
5. Заключение	100
6. Выводы	102
Список литературы:	103

Список использованных сокращений

СС - clonal complex – клональный комплекс

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control - Европейский центр профилактики и контроля заболеваний

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители рода *Enterobacter*

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - Европейский комитет по тестированию на чувствительность к противомикробным препаратам

ICL - international clonal lineage – международная клональная линия

MOI - multiplicity of infection – множественность инфекции

SNP – single nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

ST – sequence type – сиквенс-тип

БЛРС – бета-лактамаза расширенного спектра

ИСМП – инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи

ЛОС –липоолигосахарид

ЛПС – липополисахарид

МБЛ – металло-бета-лактамаза

МЛСТ – мультилокусное сиквенс-типирование

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

1. Введение

1.1 Актуальность темы исследования и степень её разработанности

Бактериофаги, как антибактериальные агенты были известны с начала XX века (различные авторы приписывают открытие вирусов бактерий Фредерику Творту или Феликсу д`Эрреллю), однако, исследования в области фаготерапии проводились, в основном, в Советском Союзе. В западном мире бактериофаги как компоненты антимикробной терапии уступили своё место открытым в конце 1920-х годов антибиотикам, но широко использовались в качестве модельных объектов в фундаментальных научных работах в области молекулярной биологии. Наиболее яркий пример – классический эксперимент Херши и Чейз с использованием бактериофага T2, позволивший в 1952-м году установить роль ДНК как переносчика генетической информации. На сегодняшний день в англоязычной научной литературе можно наблюдать увеличение количества публикаций, посвящённых использованию бактериофагов в медицине, что свидетельствует о возрождении интереса к фаготерапии во всём мире.

В настоящее время получили широкое распространение инфекции, вызванные патогенами группы ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и представители рода *Enterobacter*). Наиболее важной характеристикой данной группы инфекций является высокая вероятность летального исхода, связанная с трудностью подбора эффективной антимикробной терапии в следствие экспансии устойчивых к различным антибиотикам штаммов бактерий группы ESKAPE. В 2017 году Всемирной организацией здравоохранения был предложен расширенный список наиболее значимых групп антибиотикорезистентных бактерий, в отношении которых необходима разработка новых антибиотиков [1]. Первое место в группе критического приоритета занял устойчивый к карбапенемам *Acinetobacter baumannii* [1]. Препаратами выбора для терапии инфекций, вызванных *A. baumannii*, традиционно считались карбапенемы, однако на данный момент наблюдается взрывной рост распространённости нозокомиальных штаммов

A. baumannii, устойчивых к данному классу антибиотиков. По результатам многоцентрового исследования МАРАФОН, проводившегося в 2015-2016 годах на территории Российской Федерации, доля карбапенем-резистентных нозокомиальных штаммов *A. baumannii* приблизилась к отметке в 80%; 20,5% всех исследованных изолятов были устойчивы ко всем антибиотикам, кроме колистина [2]. Возможным компонентом антимикробной терапии инфекций, вызванных экстремально лекарственно резистентными штаммами *A. baumannii*, могут служить литические бактериофаги, активные в отношении таких штаммов, в особенности в форме персонифицированных препаратов (коктейлей).

Бактериофаги широко распространены в окружающей среде, что обуславливает простоту изоляции терапевтических штаммов для каждого клинического случая. Важным свойством бактериофагов как антибактериальных агентов является их высокая специфичность, что, с одной стороны, может расцениваться как преимущество перед использованием антибиотиков, а с другой, - как недостаток: антимикробная терапия бактериальной инфекции не может быть проведена с использованием лишь одного набора литических бактериофагов, а каждый раз требует подбора комбинации штаммов фагов, специфичных к конкретным субтипам и вариантам патогена.

Первичными рецепторами для значительного числа типов бактериофагов, лизирующих клетки патогенов группы ESKAPE, являются бактериальные экзополисахариды, а именно капсульные полисахариды и/или O-антиген поверхностные полисахариды. На данный момент установлено, что патогены группы ESKAPE характеризуются широким разнообразием структур экзополисахаридов, что обусловлено высокой вариабельностью генетических кластеров, ответственных за их синтез. Понимание молекулярных основ фаговой инфекции, а также биологии бактериофагов, инфицирующих экстремально лекарственно устойчивые штаммы основных бактериальных патогенов, позволяет рационализировать подбор терапевтических бактериофагов и оптимизировать методы антимикробной химиотерапии.

На данный момент в научной литературе можно найти сведения о более чем восьмидесяти различных бактериофагах, специфически инфицирующих *A. baumannii*, продолжают выявляться новые. Однако далеко не все из них достаточно хорошо охарактеризованы и имеют потенциал применения в качестве антимикробных агентов в медицине. Рациональным подходом к применению бактериофагов в клинической практике представляется использование персонализированных коктейлей бактериофагов, специфичных в отношении конкретного штамма *A. baumannii*, выделяемого от пациента в процессе активной инфекции. Создание локальных коллекций литических бактериофагов, специфичных к штаммам различных капсульных типов *A. baumannii*, способно значительно упростить подбор компонентов для персонализированных коктейлей для фаготерапии инфекций, вызванных широко и экстремально устойчивыми к антибиотикам штаммами данного патогена.

1.2 Объект исследования. Цель и задачи работы

Объектом исследования являются капсулоспецифичные бактериофаги семейства *Autographiviridae*, инфицирующие различные штаммы возбудителя нозокомиальных инфекций *A. baumannii*, и их полисахарид-деградирующие ферменты. Представленная работа станет частью работ по поиску альтернативных методов борьбы с данным патогеном, основанных на использовании природных вирусов бактерий – бактериофагов и закодированных в их геномах литических и экзополисахарид-деполимеризующих ферментов.

Целью данного исследования являлось создание коллекции исчерпывающе охарактеризованных литических бактериофагов семейства *Autographiviridae*, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* различных капсульных типов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Поиск и выделение из объектов окружающей среды ранее неизвестных литических бактериофагов, инфицирующих штаммы *A. baumannii* различных капсульных типов.

- 2) Изучение биологических и молекулярно-генетических свойств выделенных капсулоспецифичных бактериофагов, определение их таксономического положения.
- 3) Выявление генов, кодирующих белок хвостового шипа, в геномах выделенных капсулоспецифичных бактериофагов, получение рекомбинантных препаратов полисахарид-деполимеризующих ферментов, изучение их субстратной специфичности и механизма действия.

1.3 Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

По итогам работы была сформирована коллекция из 9 ранее неизвестных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* девяти различных капсульных типов. Восемь из девяти выделенных и описанных бактериофагов имеют потенциал использования в качестве компонентов препаратов для фаготерапии, а ещё один бактериофаг является первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*.

Бактериофаги, входящие в сформированную в ходе исследования коллекцию, охарактеризованы с точки зрения новых биологических объектов, а именно определены: полная нуклеотидная последовательность и структура фаговых геномов; таксономическое положение на основе анализа геномов и данных электронной микроскопии; параметры инфекционного процесса; определены механизмы, лежащие в основе ферментативной активности полисахарид-деполимеризующих ферментов исследуемых бактериофагов. Полученные данные по характеристике бактериофагов вносят вклад в формирование общей картины, касающейся классификации, систематизации и изучения геномного разнообразия вирусов, инфицирующих *A. baumannii*.

1.4 Методология и методы исследования. Личный вклад автора

Для достижения цели и выполнения поставленных задач был использован широкий спектр методов, включая микробиологические (выделение бактериофагов

из объектов окружающей среды методом обогащения, культивирование и очистка препаратов бактериофагов, определение параметров фаговой инфекции, определение специфичности бактериофагов), молекулярные (очистка фаговой ДНК, секвенирование генома бактериофагов, подбор праймеров, клонирование выбранного участка генома фага в плазмидный вектор, наработка и очистка рекомбинантного белка), биофизические (метод ядерного магнитного резонанса) и биоинформатические методы (анализ последовательности генома бактериофагов, построение филогенетического дерева).

Разработка концепции исследования проводилась автором совместно с научным руководителем данной работы член-корр. РАН, д.х.н. Мирошниковым К.А. Автором были выполнены следующие этапы исследования: анализ научной литературы по теме исследования; выделение бактериофагов из речной и сточной воды; получение очищенных препаратов бактериофагов; получение очищенных препаратов рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимеризующих ферментов; обобщение полученных результатов.

В рамках научной коллаборации отдельные разделы работы выполнены совместно с сотрудниками Лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора к.б.н. Михайловой Ю.В. и к.ф.-м.н. Шеленковым А.А (секвенирование геномов бактериофагов); сотрудниками Лаборатории углеводов и биоцидов им. академика Н.К. Кочеткова (№ 21) Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН Касимовой А.А., к.х.н. Арбатским Н.П. и д.х.н., проф. Книрелем Ю.А. (определение структуры капсульных полисахаридов *A. baumannii* и фрагментов ферментативного расщепления полисахаридов); доцентом Кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, д.б.н. Соколовой О.С. (электронная микроскопия фагов); сотрудником отдела молекулярной микробиологии ФБУН ГНЦ ПМБ к.б.н. Поповой А.В. и аспирантом МФТИ Щуровой А. С. (участие в характеристике бактериофагов).

1.5 Положения, выносимые на защиту

1) Выделенные в ходе проведенных исследований бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127 и АРК128 высоко специфичны в отношении штаммов *A. baumannii* капсульных типов К09, К14, К16, К37/К3- ν 1, К26, К86, К127 и К128, соответственно.

2) Очищенные рекомбинантные деполимеразы расщепляют О-гликозидные связи капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз.

3) Впервые показано использование механизма О-деацетилирования капсульного полисахарида бактериофагом, специфически инфицирующим *A. baumannii*.

1.6 Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена в Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта №19-34-90034 «Молекулярно-биологические основы рецепции бактериофагов, инфицирующих *Acinetobacter baumannii*» а также при поддержке Российского научного фонда (проекты № 18-15-00403, 19-14-00273, 20-75-10113). Результаты данной работы получены с помощью современных методов, рекомендуемых международным научным сообществом.

Достоверность результатов работы подтверждена публикациями в международных высокоимпактных научных рецензируемых журналах. Результаты работы также были представлены на XXXIV Зимней молодежной научной школе «Современные тенденции в физико-химической биологии и биотехнологии» ИБХ РАН (Москва, 8-11 февраля 2022г), а также в рамках англоязычного доклада на международной онлайн-конференции «The Future Applications of Bacteriophages: First Annual Phage International Conference» (12-13 марта 2021 г).

1.7 Благодарности

Автор выражает глубокую признательность член-корр. РАН д.х.н. Мирошникову Константину Анатольевичу и искреннюю благодарность к.б.н. Шнейдеру Михаилу Марковичу за руководство данной работой, методологическую и моральную поддержку на каждом из этапов выполнения данной работы.

Автор благодарит к.б.н. Попову Анастасию Владимировну за неоценимую помощь в подготовке публикаций по теме диссертации, а также профессиональные советы и наставничество.

Автор выражает благодарность всем сотрудникам Лаборатории молекулярной инженерии ИБХ РАН, в первую очередь Евсееву Петру Владимировичу за помощь в выполнении биоинформатической части данной работы, а также Сыкилинде Нине Николаевне и Ландышеву Николаю Николаевичу за моральную и эмоциональную поддержку.

За помощь в выполнении экспериментальной части работы автор благодарит сотрудницу Лаборатории регуляции клеточной сигнализации аспирантку МФТИ Щурову А. С., сотрудников Лаборатории молекулярных механизмов антибиотикорезистентности ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора к.б.н. Михайлову Ю.В. и к.ф.-м.н. Шеленкова А.А., доцента Кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова д.б.н. Соколову О.С., а также сотрудников Лаборатории химии углеводов ИОХ РАН, в первую очередь Касимову А.А., к.х.н. Арбатского Н.П. и отдельно – зав. лаб. д.х.н. Книреля Ю.А.

Автор выражает искреннюю благодарность своей матери Тимошиной Светлане Леонидовне за ежедневную моральную поддержку и напутствия, которые сопровождали меня во время подготовки данной работы.

1.8 Структура работы

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы»,.

Работа изложена на 122 страницах, содержит 33 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 197 источников на русском и на английском языках.

1.9 Публикации

По теме работы опубликовано 6 полноразмерных научных статей в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах РИНЦ, Scopus и Web of Science, а также 2 тезисов докладов на конференциях.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Ландышев Н.Н., Воронько Я.Г., Тимошина О.Ю., Суслина С.Н., Акимкин В.Г., Мирошников К.А. Обзор законодательства в области обращения персонализированных препаратов бактериофагов. // Вопросы вирусологии. 2020 –т.65, №5, с. 259–266.
2. Popova A. V., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Kasimova A. A., Senchenkova S. N., Shashkov A. S., Dmitrenok A. S., Chizhov A. O., Mikhaylova Y. V., Shagin D. A., Sokolova O. S., Timoshina O. Y., Kozlov R.S., Miroshnikov K. A., Knirel, Y. A. Specific Interaction of Novel Friunavirus Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types. //Journal of Virology. 2021. – Т. 95. – №. 5. – С. e01714-20.
3. Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Timoshina O. Y., Shneider M. M., Knirel Y. A. Structure of the capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* MAR 55–66 //Russian Chemical Bulletin. – 2021. – Т. 70. – №. 3. – С. 592–599.
4. Timoshina O. Y., Shneider M. M., Evseev P. V., Shchurova A. S., Shelenkov A. A., Mikhaylova Y. V., Sokolova O. S., Kasimova A. A., Arbatsky N. P., Dmitrenok A. S., Knirel Y. A., Miroshnikov K. A., Popova, A. V. Novel *Acinetobacter baumannii* bacteriophage aristophanes encoding structural polysaccharide deacetylase //Viruses. – 2021. – Т. 13. – №. 9. – С. 1688.
5. Kasimova A. A., Arbatsky N. P., Timoshina O. Y., Shneider M. M., Shashkov A. S., Chizhov A. O., Popova A. V., Hall R. M., Kenyon J. J., Knirel Y. A. The

K26 capsular polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* KZ-1098: Structure and cleavage by a specific phage depolymerase //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Т. 191. – С. 182-191.

6. Timoshina O. Y., Kasimova A. A., Shneider M. M., Arbatsky N. P., Shashkov A. S., Shelentov A. A., Mikhaylova Y. V., Popova A. V., Hall R. M., Knirel Y. A., Kenyon J. J. Loss of a Branch Sugar in the *Acinetobacter baumannii* K3-Type Capsular Polysaccharide Due To Frameshifts in the *gtr6* Glycosyltransferase Gene Leads To Susceptibility To Phage APK37.1 //Microbiology Spectrum. – 2023. – С. e03631-22.

Тезисы конференций:

1. The Future Applications of Bacteriophages: First Annual Phage International Conference in Egypt, 2021. Characterization of the New Lytic *Acinetobacter baumannii* Phage Aristophanes. O. Yu. Timoshina, M. M. Shneider, A. V. Popova, P. V. Evseev, K. A. Miroshnikov.
2. XXXIV Международная зимняя молодёжная научная школа ИБХ РАН, 2022. Новые бактериофаги семейства *Autographiviridae*, инфицирующие *Acinetobacter baumannii*. Тимошина О.Ю., Шнейдер М.М., Евсеев П.В., Михайлова Ю.В., Касимова А.А., Книрель Ю.А., Попова А.В., Мирошников К.А.

2. Обзор литературы

Данный обзор посвящен описанию основных микробиологических, таксономических и эпидемиологических характеристик *A. baumannii*, как одного из наиболее важных бактериальных патогенов, вызывающих в первую очередь тяжело поддающиеся терапии внутрибольничные инфекции, а также включает в себя актуальную информацию об известных на данный момент бактериофагах, специфичных в отношении *A. baumannii*.

2.1. Краткая характеристика рода *Acinetobacter* и *Acinetobacter baumannii*

Одним из наиболее успешных патогенов, ассоциированных с внутрибольничными инфекциями по всему миру, без сомнения, является *A. baumannii* [3]. С начала XXI века в разных странах возрастает частота возникновения инфекций, ассоциированных с *A. baumannii*, а также растет антибиотикорезистентность возбудителя [4]. С *A. baumannii* связано более 1 млн. инфекций ежегодно по всему миру, это число постоянно растет. *A. baumannii* является причиной вентилятор-ассоциированных пневмоний, катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей, инфекции кожи и мягких тканей (в частности, раневых инфекции), менингитов и инфекции кровотока [3]. Также были описаны случаи внебольничных пневмоний, связанных с *A. baumannii* [5]. Однако на сегодняшний день внебольничные инфекции, вызываемые *A. baumannii*, встречаются в основном у пациентов с сопутствующими заболеваниями, включая алкоголизм, сахарный диабет, онкологические заболевания и обструктивные заболевания легких [5]. Лекарственно устойчивые штаммы *A. baumannii* получили повсеместное распространение в отделениях интенсивной терапии и зачастую являются причиной инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Специалисты Всемирной организации здравоохранения включили *A. baumannii* в число самых опасных бактерий-патогенов (группа ESKAPE). Для того, чтобы эффективно решить проблему распространения инфекций, ассоциированных с *A. baumannii*, критически важно знать и понимать особенности представителей рода *Acinetobacter*, а именно

присущие им факторы вирулентности и патогенности, спектр генов антибиотикорезистентности отдельных штаммов, трудности их видовой идентификации и т. д.

Представления о таксономии рода *Acinetobacter* менялись несколько раз, начиная с 1986 года. Согласно современной классификации протеобактерий род *Acinetobacter* относится к семейству *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gamma*proteobacteria. Часто в клинической практике род *Acinetobacter* подразделяют на три группы (комплекса): *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-, или (Acb)-complex; *Acinetobacter lwoffii*; *Acinetobacter haemolyticus* [6].

Представители рода *Acinetobacter* характеризуются как строго аэробные, неферментирующие, каталазо-позитивные, оксидазо-негативные, неподвижные (безжгутиковые, обладают поверхностной и твичинг-подвижностью) грамотрицательные коккобациллы с содержанием G+C в геноме от 39 до 47 % [6,7]. Большинство штаммов ацинетобактерий не образует индол, не способны деградировать нитраты до нитритов [6], расщепляют сахара (D-глюкозу, D-рибозу, D-ксилозу, D-арабинозу) с образованием спирта только при помощи кислородзависимого метаболизма [6].

Большая часть видов ацинетобактерий хорошо растут при температуре от 20°C до 37°C с температурным оптимумом при 33-35°C (за исключением *A. baumannii*, способным расти и при 44°C, температурный оптимум для клинических изолятов 37-38°C) [8]. В экспоненциальной фазе роста представляют из себя коккобациллы 0,9 – 1,6 мкм в диаметре и 1,5 – 2,5 мкм в длину, часто собраны попарно или в цепочки различной длины [9]. Представители рода *Acinetobacter* формируют гладкие, зачастую мукоидные, серовато-белые колонии с диаметром до 1,5–3 мм для ночной культуры *A. baumannii* [8]. Гемолитическую активность на 5% кровяном агаре проявляют только виды комплекса *A. hemolyticus* [8]. Селективная среда для ацинетобактерий – Лидс-среда (Leeds *Acinetobacter* Medium); также ацинетобактерии селективируются на хромогенных агарах CHROMagar, UriSelect и т. д. [6].

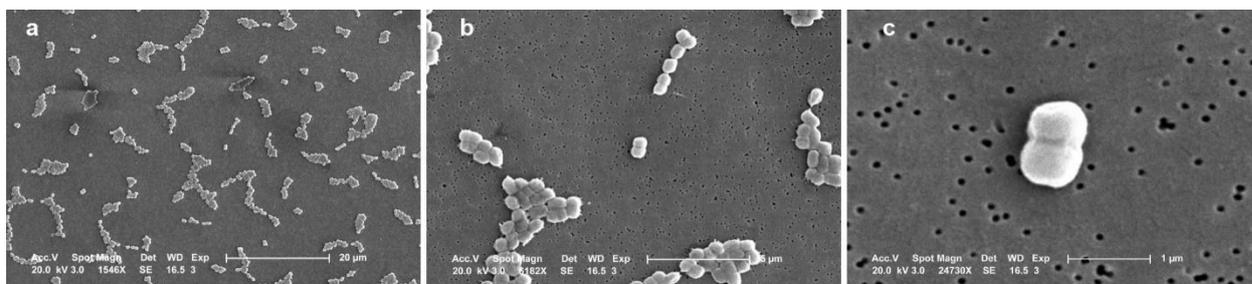


Рис 1. Сканирующая электронная микроскопия клеток *A. baumannii* с увеличением в 1546 раз (a), 6182 раза (b) и 24730 раз (c) [10]

Представители рода *Acinetobacter* являются свободноживущими микроорганизмами, часто встречающимися в объектах окружающей среды. Природными ресурсами бактерий рода *Acinetobacter* являются почва и вода, где они встречаются повсеместно. Ацинетобактерии переживают высыхание и обнаруживаются в составе пыли [6]. В качестве источника питания ацинетобактерии могут использовать широкий спектр веществ, начиная от простых углеводов и заканчивая нефтью и дизельным топливом [11]. Также ацинетобактерии являются составной частью кожной микрофлоры здоровых людей [12]. В эпидемиологических исследованиях было показано, что колонизация кожи и слизистых оболочек у здоровых людей составляет около 43 % от числа обследованных лиц, при этом наиболее часто выявлялись ацинетобактерии видов *Acinetobacter lwoffii* (58%), *Acinetobacter johnsonii* (20%), *Acinetobacter junii* (10%) [13]. В это же время бессимптомное носительство *A. baumannii*, по-видимому, является редкостью: колонизация кожных покровов встречается в приблизительно 3% случаев [13], колонизация прямой кишки - в 0.8% случаев [14].

В состав генома ацинетобактерий входят нуклеоид, который представлен единичной кольцевой хромосомой, имеющей объем порядка 3,5–3,9 МБ, а также плазмиды разного объема и функционального назначения [6]. Например, в геном *A. baumannii* штамма ZW85-1, секвенированного в 2014 году, помимо хромосомы объемом около 3,7 МБ, кодирующей около 3,5 тысяч генов, входят также две плазмиды объемом 48 368 п. н. и 113 866 п. н. [15]. В качестве примера также можно привести геном *A. baumannii* штамма ACICU, секвенированного одним из первых методом 454-высокопроизводительного пиросеквенирования, в состав

которого входит хромосома объемом 3,9 МБ и две плазмиды pACICU1 и pACICU2 объемом 28 279 и 64 366 п. н., соответственно [16]. С наличием плазмид зачастую связан спектр антибиотикорезистентности конкретного штамма *A. baumannii*, так как многие ферменты, расщепляющие антибиотики, передаются посредством трансмиссивных плазмид. Множество научных публикаций указывает на то, что *A. baumannii* способен быстро приобретать устойчивость к различным классам антимикробных препаратов. Таким образом, достаточно часто в клинической практике приходится иметь дело с мультирезистентными и панрезистентными штаммами этого патогена. Распространенность инфекций, вызванных полирезистентными штаммами *A. baumannii*, значительно отличается в различных странах Европы [17].

Клеточная стенка представителей рода *Acinetobacter* имеет типичное для грамотрицательных бактерий строение. Для *A. baumannii* показано отсутствие O-антигена, таким образом, ЛПС *A. baumannii* на самом деле является липоолигосахаридом (ЛОС). Строение ЛОС играет существенную роль в патогенезе инфекций, вызванных штаммами *A. baumannii*. Например, у колистин-резистентных штаммов наблюдается полная или частичная потеря ЛОС, либо происходят модификации его компонента – липида А [18].

Большинство ацинетобактерий (в первую очередь *A. baumannii*) формируют полисахаридные капсулы, строение которых влияет на вирулентность. Эти капсулы состоят из плотно упакованных повторяющихся полисахаридных единиц, которые формируют барьер вокруг клеточной стенки бактерии, обеспечивающий защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как высыхание и дезинфицирующие вещества, а также от компонентов иммунитета хозяина [19]. Для *A. baumannii* описано 240 капсульных типов, продолжают выявляться новые [20].

Важным фактором, влияющим на патогенность штаммов *A. baumannii*, является способность данного микроорганизма формировать биоплёнки. В клинической практике биопленкообразование ассоциировано прежде всего с раневыми инфекциями и другими инфекциями кожи и мягких тканей, вызванными

A. baumannii. Одним из компонентов биопленок является секретируемый клетками полисахарид поли-бета-1-6-N-ацетилглюкозамин [21].

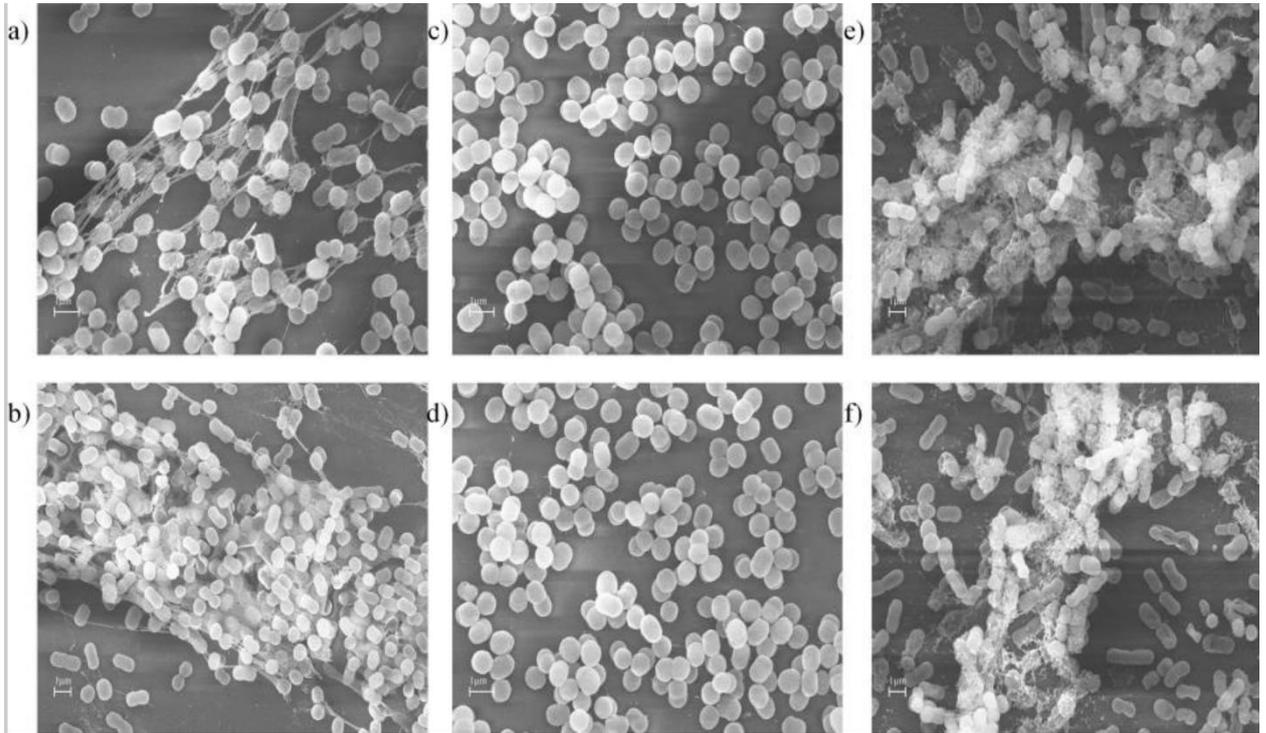


Рис. 2. Сканирующая электронная микроскопия клеток *A. baumannii* штамма S1 (a и b), S1Δpga (мутанта, не продуцирующего поли-бета-1-6-N-ацетилглюкозамин) (c и d), and S1Δpga-c (штамма с восстановленной продукцией поли-бета-1-6-N-ацетилглюкозамина (e и f) (увеличение в 5,000 и 7,500 раз) [21].

Все вышеперечисленные особенности, такие как способность выживать в разнообразных условиях окружающей среды, способность к образованию биопленок, чрезвычайная склонность к формированию мультирезистентных штаммов и т. д., делают *A. baumannii* объектом пристального внимания клинических микробиологов по всему миру.

2.2. Современная таксономия рода *Acinetobacter*

Микроорганизмы, в последующем охарактеризованные как представители рода *Acinetobacter*, по всей видимости, были впервые выделены Виктором Мораксом в 1896 году [8]. Бактерии со сходной морфологией были описаны

позднее Теодором Аксенфельдом и получили название «бациллы Моракса-Аксенфельда». На протяжении нескольких десятков лет в научной литературе велись дискуссии о таксономической принадлежности данных «бацилл»: бактерии обозначались различными видовыми именами, включая *Bacterium anitratum*, *Herella vaginicola*, *Mima polymorpha*, *Achromobacter*, *Micrococcus calcoaceticus*, *Diplococcus*, *B5W*, и *Cytophaga* [8].

Родовое имя *Acinetobacter* (от греч. *akinetos* – неподвижный) было предложено Брисо и Прево в 1954 году. В 1968 году более 100 штаммов, ранее принадлежащих к различным видам бактерий, были объединены в 2 вида рода *Acinetobacter*: *A. lwoffii* и *A. hemolysans* [8]. В 1980 году род *Acinetobacter* вошел в Утвержденный список наименований бактерий (Approved Lists of Bacterial Names), в 1984 году – в справочник Берджи по бактериологической систематике (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) [8].

Род *Acinetobacter* относится к семейству *Moraxellaceae* порядка *Pseudomonadales* класса *Gamma proteobacteria* тип *Proteobacteria*. Согласно таксономическому справочнику NamesForLife [22], предложенному Университетом Штата Мичиган в качестве альтернативы классификатору Берджи и содержащему номенклатуру эубактерий и архебактерий, род *Acinetobacter* включает в себя 68 видов бактерий: *A. calcoaceticus*, *A. albensis*, *A. apis*, *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bohemicus*, *A. boissieri*, *A. bouvetii*, *A. brisouii*, *A. celticus*, *A. chinensis*, *A. colistiniresistens*, *A. courvalinii*, *A. cumulans*, *A. defluvii*, *A. dijkshoorniae*, *A. dispersus*, *A. equi*, *A. gandensis*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. guangdongensis*, *A. guillouiae*, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. halotolerans*, *A. harbinensis*, *A. indicus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. kookii*, *A. lactucae*, *A. larvae*, *A. lwoffii*, *A. modestus*, *A. nectaris*, *A. nosocomialis*, *A. pakistanensis*, *A. parvus*, *A. piscicola*, *A. pittii*, *A. populi*, *A. pragensis*, *A. proteolyticus*, *A. pseudolwoffii*, *A. puyangensis*, *A. qingfengensis*, *A. radioresistens*, *A. rudis*, *A. schindleri*, *A. seifertii*, *A. sichuanensis*, *A. soli*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. ursingii*,

A. variabilis, *A. venetianus*, *A. vivianii*, *A. wuhouensis*, а также неутвержденные виды *A. kyonggiensis*, *A. oleivorans*, *A. pediculi*, *A. plantarum* и *A. refrigeratorensis* [22].

Согласно Списку валидированных названий прокариот (List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature) [23] род *Acinetobacter* на момент написания данного обзора содержит 73 вида бактерий: все вышеперечисленные виды, а также не упомянутые ранее и непризнанные виды *A. antiviralis*, *A. marinus*, *A. oryzae*, *A. pullorum* и *A. seohaensis*.

Некоторые представители рода *Acinetobacter* были описаны как отдельные виды, однако, последующее детальное рассмотрение позволило объединить выделенные изоляты в один вид. Так, следует рассматривать как один вид представителей (попарно): *A. dijkschoorniae* и *A. lactucae*; *A. guangdongensis* и *A. indicus*; *A. pakistanensis* и *A. bohemicus*; *A. oryzae* и *A. johnsoni*; *A. refrigeratoris* и *A. variabilis*; *A. seohaensis* и *A. townneri*; *A. septicus* и *A. ursingi* [24,25].

Фенотипический метод, основанный на применении различных биохимических тестов, является классическим способом определения видовой принадлежности бактерий. Углеводный, белковый и липидный метаболизм, продукция определенных ферментов, способность утилизировать различные вещества, - все эти свойства помогают отличить один вид бактерий от другого. Алгоритм идентификации видов рода *Acinetobacter*, впервые предложенный в 1986 году Буве и Гримо, основывается на проведении 28 фенотипических тестов. Существующий алгоритм продолжает дорабатываться и, на данный момент, включает 40 биохимических тестов, а также культивирование бактерий при 5 различных температурах [24]. Для определения ацинетобактерий до рода могут быть использованы также баканализаторы API 20NE, VITEK 2, Phoenix, Biolog, MicroScan WalkAway и Accelerate Pheno™ [26].

В связи со сложностью фенотипической идентификации ацинетобактерий до вида в клинической практике род разделяют на 3 группы (кластера): *A. calcoaceticus-baumannii* (окисляют глюкозу, негемолитические); *A. lwoffii* (не окисляют глюкозу, негемолитические); *A. haemolyticus* (гемолитические) [6].

Наиболее важными с клинической точки зрения являются представители (Acb)-комплекса, включающие *A. calcoaceticus* (преимущественно почвенный вид), а также *A. baumannii* и его близких родственников, зачастую ассоциированных с нозокомиальными инфекциями: *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* и *A. dijksboorniae* [26]. Наиболее хорошо охарактеризованным видом рода *Acinetobacter* является *A. baumannii*.

Для точного определения видовой принадлежности представителей рода *Acinetobacter* используются молекулярные методы: ДНК-ДНК гибридизация (DDH), секвенирование ДНК, рестрикционный анализ (PCR-RFLP), а также MALDI-TOF масс-спектрометрия [26]. На данный момент всё более широкое распространение получает метод полногеномного секвенирования с последующей оценкой полученного генома биоинформатическими методами (например, использованием алгоритма OGRI, позволяющим осуществлять выравнивание полных геномов) [26]. Более дешевой альтернативой методу полногеномного секвенирования может служить секвенирование генов 16S рРНК и гена *groB*, кодирующего β -субъединицу РНК-полимеразы, а также 16S-23S межгенного спейсера (ITS) [26]. Наиболее простым и удобным способом определения *A. baumannii* в рутинной клинической практике является использование методик на основе MALDI-TOF масс-спектрометрии с последующим подтверждением результатов методом ПЦР (выявление гена оксациллиназы *bla*_{OXA-51-like}, являющегося генетическим маркером данного вида) [6].

На данный момент в базе Genome на сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) собрано более 250 последовательностей полных геномов различных штаммов *A. baumannii* [27]. Продолжают публиковаться новые полногеномные сборки. Всего в базе NCBI собрано более 7 500 сиквенсов полных геномов и частей генома *A. baumannii*, что свидетельствует о высоком интересе исследователей к данному микроорганизму [27].

Для оценки генетического разнообразия штаммов *A. baumannii* на данный момент наиболее часто применяется метод мультилокусного секвенирования-типирования (MLST, МЛСТ). Широко используемыми для типирования штаммов

A. baumannii являются две схемы МЛСТ. При использовании обеих схем принадлежность к сиквенс-типу (ST) определяется путем секвенирования фрагментов семи генов «домашнего хозяйства», а при совпадении минимум пяти аллелей из семи сиквенс-типы объединяются в клональные комплексы (CC) [28]. Первая схема была предложена в 2005 году Vartual с соавт. [29] и получила название «оксфордской» (Oxford (^{Oxf})). В рамках данной методики определяются последовательности фрагментов генов *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi*, *rpoD*. Вторая схема была предложена пять лет спустя Diancourt с соавт. [30] и получила название «пастеровской» (Pasteur (^{Pas})). В рамках данной методики определяются последовательности фрагментов генов *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB*, *rpoB*. Данные ряда исследований указывают на более высокую разрешающую способность «оксфордской» схемы, однако, на её результаты существенно влияет повышенная активность рекомбинации в гене *gpi* (входит в капсульный оперон) [31]. Отечественными авторами для определения генетического разнообразия штаммов *A. baumannii* также используется метод SNP-типирования, основанный на анализе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в десяти хромосомных локусах (*gltA*, *recA*, *cpn60*, *gyrB*, *gdhB*, *rpoD*, *fusA*, *pyrG*, *rplB* и *rpoB*), используемых в существующих схемах МЛСТ [2].

Молекулярно-эпидемиологические исследования выявили наличие генетически различных клональных линий внутри популяций *A. baumannii*. Три из этих линий, изначально получившие название европейских клонов I-III, представлены по всему миру, вследствие чего получили название международных клонов (ICL) 1-3 или глобальных клонов (GC). Согласно «пастеровской» схеме МЛСТ международные клоны ICL1, ICL2 и ICL3 были определены, соответственно, как CC1, CC2 и CC3 (доминирующие сиквенс-типы ST1^{Pas}, ST2^{Pas} и ST3^{Pas}, соответственно). Другими эпидемически успешными сиквенс-типами являются ST10^{Pas}, ST15^{Pas}, ST25^{Pas}, ST32^{Pas}, ST78^{Pas}, ST79^{Pas} [32]. Согласно результатам многоцентрового исследования «МАРАФОН» среди изолятов *A. baumannii*, выделенных в стационарах медицинских учреждений на территории РФ, наблюдается преобладание трех генетических линий [2]. В 57,4% случаев были

обнаружены штаммы, относящиеся к CC92/208^{Oxf}/CC2^{Pas} (международный клон ICL2). В 19,6% случаев были обнаружены штаммы, относящиеся к CC944^{Oxf}/CC78^{Pas}, который представляет собой новый «международный клон высокого риска». В 14,9% случаев были обнаружены штаммы, относящиеся к CC109/231^{Oxf}/CC1^{Pas} - международной клональной линии ICL1 [2].

Таким образом, на данный момент наблюдается широкая генетическая вариабельность штаммов *A. baumannii*, распространенных в различных стационарах как внутри одной страны, так и между разными странами и частями света.

2.3. Антимикробная устойчивость штаммов *A. baumannii* и распространённость инфекций, вызванных *A. baumannii*

Широко и экстремально устойчивые к противомикробным препаратам штаммы *A. baumannii* получили широкое распространение в стационарах медицинских учреждений по всему миру и представляют значительную угрозу здоровью и благополучию на глобальном уровне. На данный момент известен ряд механизмов резистентности штаммов *A. baumannii* к противомикробным препаратам, включающий экспрессию ферментов, разрушающих антибиотики, модификацию мишени противомикробного препарата, моно- и мультидрагэфлюксные механизмы, а также механизмы, связанные с изменением проницаемости клеточной мембраны [7].

Клинические штаммы *A. baumannii* обладают низкой природной чувствительностью к большинству бета-лактамовых антибиотиков, включая пенициллины и цефалоспорины [2]. Согласно данным EUCAST, неферментирующие грамотрицательные патогенные бактерии природно устойчивы к бензилпенициллину, цефалоспорином I и II поколений, гликопептидам, липогликопептидам, фузидовой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, рифампицину и оксазалидинонам [33].

Опираясь на данные EUCAST, в алгоритм оценки чувствительности к антибиотикам клинических изолятов *A. baumannii*, *A. pittii* и *A. nosocomialis* в виду

их природной резистентности не следует включать ампициллин, амоксициллин, амоксициллин-клавуланат, цефтриаксон, цефотаксим, азтреонам, эртапенем, триметоприм, фосфомицин, тетрациклин и доксициклин [33]. Европейские стандарты тестирования антибиотикорезистентности бактерий, входящих в (Acb)-комплекс, не предполагают оценки чувствительности клинических изолятов к пенициллинам и цефалоспорином в классическом протоколе, хотя в отдельных случаях некоторые штаммы *A. baumannii* остаются восприимчивыми к действию, например, ампициллин-сульбактама [34]. Современные стандарты оценки чувствительности клинических изолятов бактерий, входящих в (Acb)-комплекс, включают в панель тестирования следующие антибиотики: карбапенемы (дорипенем, имипенем и меропенем), фторхинолоны (ципрофлоксацин и левофлоксацин), аминогликозиды (амикацин, гентамицин, тобрамицин, нетилмицин), а также колистин и триметоприм-сульфаметоксазол [34]. Таким образом, актуальные на данный момент клинические штаммы ацинетобактерий повсеместно приобрели устойчивость к целым классам антимикробных препаратов. Данные многоцентрового исследования «МАРАФОН 2015-2016» выглядят ещё более обескураживающими: на территории РФ нозокомиальные изоляты *A. baumannii* были резистентными к карбапенемам: имипенему и меропенему – соответственно 77,4% и 77,1% из всех собранных изолятов [2].

Основным механизмом устойчивости *A. baumannii* к карбапенемам является продукция приобретенных сериновых карбапенемаз молекулярного класса D (по Амблеру), а именно ОХА-карбапенемаз групп ОХА-24/40-подобных, ОХА-23-подобных и ОХА-58-подобных. В целом, у ацинетобактерий были обнаружены ОХА-карбапенемазы групп ОХА-23, ОХА-24/40, ОХА-25, ОХА-26, ОХА-27, ОХА-49, ОХА-58, ОХА-72, ОХА-73, ОХА-96, ОХА-97, ОХА-143 и ОХА-23 [6]. Генетическим маркером *A. baumannii* является наличие в геноме гена ОХА-51-подобной β -лактамазы (возможные варианты включают около 40 видов β -лактамаз, в частности, ОХА-51, ОХА-64, ОХА-65, ОХА-66, ОХА-68, ОХА-69, ОХА-70, ОХА-71, ОХА-78, ОХА-79, ОХА-80, ОХА-82 и другие) [6]. Данные ферменты обладают пенициллиназной активностью в отношении бензилпенициллина,

ампициллина, тикарциллина, пиперациллина, однако, они могут приобретать карбапенемазные свойства (влиять на увеличение МПК карбапенемов) в случае *upsteam*-инсерции специальных вставочных элементов [6]. Распространённость изолятов, несущих разные типы карбапенемаз, зависит от географического положения субъекта РФ, в котором проводится оценка чувствительности. Так для западных регионов, в частности Санкт-Петербурга, характерна большая распространённость изолятов, несущих ОХА-24/40, в то время как в более восточных регионах, например, в Екатеринбурге и Новосибирске преобладают изоляты, обладающие карбапенемазой группы ОХА-23-подобных [35,36]. В целом по стране в ходе многоцентрового исследования «МАРАФОН 2015-2016» были получены следующие данные: наличие генов приобретенных карбапенемаз, относящихся к группам ОХА-24/40 (57,5%), ОХА-23 (18,4%) и ОХА-58 (0,1%), выявлено у 76,2% собранных нозокомиальных изолятов *A.baumannii*; причем у двух изолятов (0,2%) – одновременное наличие генов ОХА-24/40- и ОХА-23-подобных карбапенемаз [2].

Для ацинетобактерий менее характерна продукция металло- β -лактамаз (МБЛ) – карбапенемаз молекулярного класса В (по Амблеру), обеспечивающих гидролиз всех β -лактамов за исключением азтреонама, а также GES-5- и GES-2-подобных карбапенемаз (молекулярный класс А), продукция которых часто встречается у других грамотрицательных неферментирующих патогенов, в частности у *P. aeruginosa*. В научной литературе встречается упоминание штаммов *A. baumannii*, несущих гены МБЛ групп VIM, IMP и NDM, а также SIM-1. Так, по данным многоцентрового исследования «МАРАФОН 2015-2016» у собранных на территории РФ нозокомиальных изолятов *A. baumannii* генов МБЛ обнаружено не было [2]. Напротив, у других видов рода *Acinetobacter* не было обнаружено генов приобретенных карбапенемаз класса D, однако у двух изолятов *A. ursingii* и *A. baylyi*, выделенных в разных стационарах Санкт-Петербурга, были выявлены гены МБЛ группы NDM. У всех исследованных изолятов видов рода *Acinetobacter* не было найдено генов GES-5- и GES-2- подобных карбапенемаз, однако гены β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС) группы GES-1 были выявлены у 5,4%

изолятов *A. baumannii* из 7 городов (Москва, Мурманск, Пенза, Пермь, Петрозаводск, Ростов-на-Дону и Санкт-Петербург) [2].

Сниженные показатели резистентности к карбапенемам и устойчивость к пенициллинам у *A. baumannii* могут реализоваться за счёт экспрессии пенициллин-связывающих белков РВР, образующих комплексы непосредственно с β -лактамом, тем самым ингибируя действие антибиотика [37].

Механизмы антибиотикорезистентности к аминогликозидам включают в себя ферментативную модификацию/инактивацию аминогликозида (с помощью ацетилтрансфераз, нуклеотидилтрансфераз и фосфотрансфераз), повышение эффлюкса антибиотика, снижение проницаемости мембран для антибиотика, а также модификацию мишени (30S субъединицы рибосомы) посредством мутаций в генах *rrs*, *rpsL*, *tlyA*, *gidB* и др. или посредством посттранскрипционных модификаций 16S рРНК с помощью 16S-рРНК-метилтрансфераз [6]. По данным исследования «МАРАФОН 2015-2016» частота резистентности к аминогликозидам (амикацину, гентамицину, нетилмицину и тобрамицину) среди нозокомиальных штаммов *A. baumannii* составляла соответственно 89,2%, 77,4%, 64,2% и 50,6% [2].

У ацинетобактерий существует много примеров возникновения резистентности за счет модификации мишеней. Для хинолонов и фторхинолонов — это мутации гиразы А; для рифампицинов — замена аминокислот активного центра РНК-полимеразы [6]. Другим механизмом устойчивости к антибиотикам у ацинетобактерий является использование эффлюкс-механизмов различных типов: ABC-транспортера (от англ. ATP binding cassette), SMR (от англ. small multidrug resistance), МАТЕ-эффлюкс (от англ. multidrug and toxic compound extrusion), MFS (от англ. major facilitator superfamily) и RND (от англ. resistance-nodulation-cell division) [6].

Данные по другим антибиотикам, оценка чувствительности к которым проводилась в рамках исследования «МАРАФОН 2015-2016», также выглядят не утешающими. Крайне высокие показатели устойчивости отмечены для ципрофлоксацина (99,0%). Устойчивость к ко-тримоксазолу выявлена у 41,2%

изолятов. Значения МПК₅₀ и МПК₉₀ для тигециклина составили 1 и 4 мг/л соответственно [2].

По данным исследования «МАРАФОН 2015-2016» среди не-бета-лактамных антибиотиков наиболее высокой активностью *in vitro* в отношении нозокомиальных штаммов *A. baumannii* обладал колистин (0,9% резистентных изолятов) [2]. Резистентными ко всем антибиотикам, за исключением колистина, были 20,5% изолятов *A. baumannii* [2]. Тем не менее, клетки *A. baumannii* способны к формированию устойчивых к колистину фенотипов под воздействием этого антибиотика. Данный механизм резистентности обусловлен модификацией ЛОС посредством присоединения к липиду А различных катионных групп, в частности, фосфоэтаноламина (PEtN) [38]. Резистентность к колистину может быть также обусловлена мутациями в генах *lpxA*, *lpxC* и *lpxD*, которые приводят к полной потере бактериями ЛОС и липида А. Такой механизм в настоящее время был обнаружен только у бактерий вида *A. baumannii* [39]. В научной литературе также встречаются данные об обнаружении у некоторых штаммов *A. baumannii* плазмид, содержащих в своём составе гены мобильной резистентности к полимиксинам группы *mcr* [40], что представляет значительную угрозу мировому здравоохранению в дальнейшем.

По данным наиболее свежего отчёта ECDC за 2019 год [17] от 30 Европейских стран поступила информация об антибиотикорезистентности 6113 изолятов ацинетобактерий. Для них была оценена чувствительность к фторхинолонам (для 5918 изолятов), аминогликозидам (для 5909 изолятов) и карбапенемам (для 5953 изолятов). Более половины исследуемых изолятов (53,4 %) были устойчивы по крайней мере к одной из вышеперечисленных групп антибиотиков [17]. Устойчивость к одной или двум группам противомикробных препаратов встречалась значительно реже, чем комбинированная устойчивость ко всем трем группам антибиотиков. Резистентными к фторхинолонам, аминогликозидам и карбапенемам одновременно были 43,6% всех исследуемых изолятов [17]. Процент устойчивых изолятов значительно варьировал среди разных стран Европы. Так, резистентность к карбапенемам наблюдалась преимущественно в странах южной и

восточной Европы (более 50% в Испании, Италии и странах восточной Европы), в то время как в северной и западной частях Европы наблюдалось сравнительно низкое количество устойчивых изолятов (менее 1% в Норвегии, Финляндии и Дании) [17].

Выживаемость *A. baumannii* в условиях антибиотикотерапии может быть связана с формированием персистирующих форм. Способность ацинетобактерий к биопленкообразованию также может влиять на антибиотикорезистентность: бактериальные клетки, находящиеся в глубине биоплёнки, становятся недостижимыми для антибиотиков [6].

Таким образом, фактически единственной возможностью терапии тяжёлых нозокомиальных инфекций, вызванных *A. baumannii*, является использование колистина, обладающего высокой нефро- и ототоксичностью. Возможные альтернативы колистину включают комбинированные схемы с использованием тигециклина, сульбактама или триметоприм-сульфаметоксазола [41]. Следует также упомянуть, что новейший аминогликозидный антибиотик плазомицин не проявляет улучшенной активности по сравнению с традиционными аминогликозидами в отношении широко лекарственно устойчивых штаммов *A. baumannii* [42]. Многообещающим решением проблемы подбора эффективной терапии инфекций, вызванных мультирезистентными и панрезистентными штаммами *A. baumannii*, выглядит применение фаготерапии в составе комбинированной противомикробной терапии. Однако следует учитывать её ограничения, в числе которых неизвестные показатели фармакодинамики и фармакокинетики, а также сложности, связанные с надлежащей очисткой препаратов для парентерального введения.

2.4. Факторы, ассоциированные с патогенностью и вирулентностью *A. baumannii*

На данный момент не описаны какие-либо заметные токсины или молекулярные детерминанты, которые могли бы объяснить потенциал вирулентности каждого конкретного штамма *A. baumannii* [43]. Вместо этого

нынешнее понимание вирулентности *A. baumannii* предполагает стратегию "persist and resist" [43]. *A. baumannii* обладает способностью выживать в самых разнообразных неблагоприятных условиях. Среди факторов вирулентности, характерных для *A. baumannii* можно выделить следующие: наличие поринов, полисахаридной капсулы, ЛОС, экспрессия фосфолипаз PLC и PLD, систем секреции, наличие пилей и др. [6].

Порины – это белки внешней мембраны, связанные с модуляцией клеточной проницаемости. Для *A. baumannii* одним из важных факторов вирулентности является экспрессия порина OmpA, имеющего структуру β -бочки. Показано, что OmpA связывается с хозяйской эпителиальной клеткой и запускает процесс её апоптоза, высвобождая проапоптотические молекулы, такие как цитохром C и апоптоз-индуцирующий фактор [44]. OmpA также взаимодействует с фибронектином, что играет важную роль в процессе адгезии и инвазии в эпителиальные клетки хозяина и связывается с фактором H в плазме крови человека, что может быть связано с возможностью *A. baumannii* избежать воздействия системы комплемента [45]. OmpA помимо всего прочего также связан с формированием антибиотикорезистентных фенотипов у *A. baumannii*. Так, показано, что инактивация OmpA значительно снижает МПК хлорамфеникола, азтреонама и наликсодовой кислоты [46]. Кроме того, OmpA влияет на выживание клеток *A. baumannii* и образовании ими персистирующих форм, облегчая подвижность бактерии и биопленкообразование [47]. OmpA также регулирует образование секретлируемых везикул [48]. Все приведённые выше данные свидетельствуют об уникальности порина OmpA. Данный белок может быть возможным кандидатом для разработки новых антибиотиков, активных в отношении мультирезистентных штаммов *A. baumannii*, а также может использоваться при разработке вакцин против данного патогена.

Другим важным порином, ассоциированным с цитотоксичностью *A. baumannii*, является Omp33-36. Делеция гена *omp33-36* существенно снижает адгезию и проникновение в человеческие эпителиальные клетки [49]. В одном из исследований показано, что очищенный Omp33-36 индуцировал апоптоз в

культурах клеток различного типа, включая иммунные клетки и клетки соединительной ткани, путем активации каспаз и регуляции аутофагии. Утрата данного порина также связана с формированием карбапенем-резистентных фенотипов [6]. Другими поринами, влияющими на вирулентность *A. baumannii*, по-видимому, являются карбапенем-ассоциированный белок внешней мембраны CarO и OprD [6].

Одним из предполагаемых факторов, влияющих на вирулентность штаммов *A. baumannii*, является способность клеток этого бактериального патогена к передвижению [50]. Клетки *A. baumannii* способны к двум разным типам передвижения: твитчинг-активности, связанной с наличием пилей IV типа, и поверхностно-ассоциированной подвижности [43]. Хотя прямой связи между наличием пилей IV типа и вирулентностью установлено не было, исследования показывают, что экспрессия генов, которые кодируют белки, необходимые для синтеза пили IV типа, повышается во время роста в сыворотке человека [51], что указывает на то, что пили IV типа могут быть важны для инфицирования крови. Поверхностно-ассоциированная подвижность изолятов *A. baumannii* также может быть связана с повышенной вирулентностью [52]. В целом, показано, что увеличение подвижности *A. baumannii* связано с повышенной вирулентностью в модели инфекции *Caenorhabditis elegans* [53], и обратно, неподвижные мутанты обладали фенотипом со сниженной способностью к инфицированию [54].

Клетки *A. baumannii* чрезвычайно устойчивы к высыханию, что влияет на их способность к персистенции на различных поверхностях внутри отделений ОРИТ. Механизмы устойчивости к высыханию у *A. baumannii* многофакторны и еще не полностью определены [43]. Наличие полисахаридной капсулы у клеток *A. baumannii*, образующих биоплёнки при высыхании [55], и её способность удерживать воду указывает на то, что капсульные полисахариды необходимы для выживания в условиях такого рода стресса. Также показана зависимость устойчивости к высыханию от состава внешней мембраны: мутанты по ЛОС не могли выживать в засушливых условиях [56]. Во избежание повреждения ДНК, связанного с циклами высушивания и регидратации, клетки *A. baumannii*

используют белок RecA [57], представляющий собой фермент, необходимый для осуществления гомологичной рекомбинации и репарации ДНК. Клетки *A. baumannii* также характеризуются своей чрезвычайно мощной способностью справляться с оксидативным стрессом, связанным с высушиванием, что, по-видимому, связано с оверэкспрессией гена *katG* [58], кодирующего каталазу.

Для *A. baumannii* показана устойчивость к действию дезинфицирующих агентов. Утилизация хлоргексидина, использующегося в качестве антисептика в госпиталях, происходит за счёт его активного выброса с помощью эффлюкс-помпы AceI [59] (*Acinetobacter chlorhexidine efflux protein*). Также было показано, что этанол в низких концентрациях способствует росту *A. baumannii* [60]. Более того, физиологические концентрации этанола в крови некоторых пациентов ослабляют процесс фагоцитоза клеток *A. baumannii* и, соответственно, их элиминации [60]. Это объясняет тот факт, что лица, страдающие алкоголизмом, наиболее подвержены внебольничным инфекциям, связанным с данным патогеном.

Способность клеток *A. baumannii* к биопленкообразованию является важным фактором патогенности и оказывает влияние на развитие катетер-ассоциированных инфекций и вентилятор-ассоциированных пневмоний, а также инфекций кожи и мягких тканей, при которых популяции *A. baumannii* образуют устойчивые биопленки как непосредственно в ране, так и на повязках [61]. На процесс образования биопленки влияет ряд факторов, в частности, состав капсульных полисахаридов, наличие пилей, адгезины, ионы кальция и железа [6].

Несмотря на то, что способность к образованию биопленки во многом зависит от конкретного штамма, есть некоторые общие для разных штаммов *A. baumannii* факторы биопленкообразования. Пили являются важным фактором, формирующим ацинетобактерную биопленку, на что указывает необходимость активности системы шаперон-ашерной сборки пилей CsuA/BABCDE для успешного биопленочного процесса на абиотических поверхностях [62]. Однако данная система не играет роли при биопленкообразовании на поверхности человеческих эпителиальных клеток [63]. Интересно, что субингибиторные концентрации триметоприм-сульфаметоксазола полностью репрессируют

образование пилей, что может способствовать поддержанию существования популяции *A. baumannii* в планктонной форме [64]. В поддержании биопленки у *A. baumannii* также играет роль система шаперон-ашерной сборки пилей Pap (формирующая аналог P-пилей *Escherichia coli*) [65], однако детальная информация об этом отсутствует. *A. baumannii* также способен к продукции биопленко-ассоциированных поверхностных белков Var_{Ab}, секретлируемых компонентами I системы секреции (T1SS) [66]. Белки Var_{Ab} играют роль в клеточной адгезии, участвуя в формировании сложных многослойных биопленок на поверхностях медицинской аппаратуры [66]. Некоторые штаммы *A. baumannii* также экспрессируют Вар-подобные белки VLP1 и VLP2, для которых также показано участие в формировании биопленок [67].

Инфицирование организма человека требует от клеток *A. baumannii* некоторой гибкости метаболических путей, так как в условиях инфекции патоген испытывает дефицит микронутриентов, в частности металло-дефицит. Клетки *A. baumannii* используют сидерофор ацинетобактин для усвоения ионов железа. Ацинетобактин способен работать при различных значениях pH, что является незаменимым в условиях острой фазы инфекции [68]. Эта особенность метаболизма делает ацинетобактин удачной мишенью для поиска новых антимикробных агентов. *A. baumannii* имеет и другие сидерофоры: фимсбактин A-F [69], баумманоферрин A и B [70], однако их роль как факторов вирулентности не доказана. Цинк, являющийся ко-фактором многих ферментов, также необходим для выживания клеток *A. baumannii* в процессе инфекции. Для противостояния связыванию цинка кальпротектином в крови хозяина *A. baumannii* экспрессирует высокоаффинную систему связывания цинка ZnuABC [71]. Система ZnuABC регулируется белком-репрессором Zur, распознающим консервативные участки перед генами, экспрессия которых зависит от наличия цинка. Другая система усвоения цинка, также регулируемая белком Zur, включает в себя металлошаперон ZigA и систему утилизации гистидина Hut, высвобождающие цинк из комплексов His-Zn. Третьим важным микроэлементом, усвояемость которого влияет на вирулентность, является марганец. По-видимому, в условиях ограниченности по металлам в клетках *A.*

baumannii накапливается мочевины, распад которой опосредован марганцем, таким образом успешный захват марганца в условиях инфекционного процесса способствует выживаемости бактерии.

Подобно другим грамотрицательным патогенам, *A. baumannii* использует секретлируемые белки для облегчения адаптации к окружающей среде и человеческому организму [43]. В последнее десятилетие было выявлено использование клетками *A. baumannii* различных систем секреции типов I [72], II [73,74], IV [75], V [76], VI [77,78].

Впервые у *A. baumannii* был обнаружен транспортер Ata (компонент V системы секреции), который играет роль в адгезии к внеклеточному матриксу и компонентам базальной мембраны [76]. Введение сыворотки против Ata защищает мышей от инфекции [79], таким образом Ata – один из перспективных кандидатов на создание противобактериальных вакцин.

Система секреции шестого типа (T6SS) используется у *A. baumannii*, как механизм бактериальной конкуренции, и таким образом может играть важную роль в патогенезе инфекций, вызываемых двумя или более разными видами бактерий [78]. Компоненты T6SS не влияют на цитотоксичность в отношении эукариотических клеток [77]. Экспрессия компонентов VI системы секреции значительно варьирует для разных штаммов *A. baumannii*: часть штаммов экспрессирует их конститутивно, а часть – только при отсутствии репрессора. В частности, некоторые штаммы *A. baumannii* содержат большую конъюгативную плазмиду, несущую помимо некоторых генов устойчивости к антибиотикам также репрессоры T6SS [80]. Часть популяции клеток способна спонтанно терять данную плазмиду, становясь при этом чувствительной к антибиотикам и одновременно экспрессируя компоненты VI системы секреции, что делает их мощными бактериальными киллерами [80]. Таким образом, под воздействием антибиотиков часть популяции *A. baumannii* погибает вместе с бактериями-конкурентами, однако, другая часть – продолжает жить и размножаться.

A. baumannii и *A. nosocomialis* также используют систему секреции II типа (T2SS) для экспорта нескольких эффекторных белков, в частности липазы LipA и

металлопротеазы СраА. Вторая система секреции у этих патогенов функционирует как фактор вирулентности, секретирующий эффекторы, которые опосредуют колонизацию легких и распространение в другие органы. Более того, недавно было показано, что СраА может быть одним из основных факторов вирулентности, секретлируемых T2SS, поскольку мутант по *sraA* был менее вирулентен как в модели беспозвоночных, так и в мышинной модели пневмонии [81]. Интересно, что мутант *sraA* был менее способен распространяться в селезенку. Это может быть связано со способностью СраА ингибировать свертывание крови [82]. Однако роль каждого конкретного эффектора, кроме СраА, в патогенезе *A. baumannii* и *A. nosocomialis* остается неясной [43]. Необходимы дальнейшие исследования для определения секретлируемых белков, которые способствуют успеху *A. baumannii* в качестве внутрибольничного патогена.

Таким образом, вопрос о вирулентности и патогенности *A. baumannii* является с одной стороны сложным ввиду многофакторности данных явлений, а с другой стороны – перспективным для выявления новых мишеней для разработки новых противомикробных препаратов.

2.5. Роль капсулы в патогенезе инфекций, вызванных штаммами *A. baumannii*

Первой линией факторов вирулентности, влияющих на ускользание от иммунного ответа человека, являются ацинетобактерные капсульные полисахариды, гликозилированные поверхностные белки мембраны, ЛОС и пептидогликаны. Капсульные полисахариды защищают бактерии от внешних угроз, включая иммунную систему комплемента человеческого организма [83]. Фактически, капсульные полисахариды *A. baumannii* можно считать его основным фактором вирулентности, поскольку штаммы, лишенные капсулы, являются авирулентными и легко убиваются комплементом [84]. Гликозилированные поверхностные белки не участвуют в борьбе с системой комплемента, однако штаммы с выключенной системой гликозилирования не формируют биопленки, что негативно влияет на выживаемость клеток *A. baumannii* [85]. Липид А [86] и сериновая протеиназа [87] также обладают противокплементарной активностью.

Благодаря этим факторам клетки *A. baumannii* могут выживать в системе кровотока, таким образом конъюгаты капсульных полисахаридов могут рассматриваться в качестве вакцин, предотвращающих ацинетобактерные инфекции, а препараты, ингибирующие гликозилирование белков – быть использованы для профилактики образования биопленок.

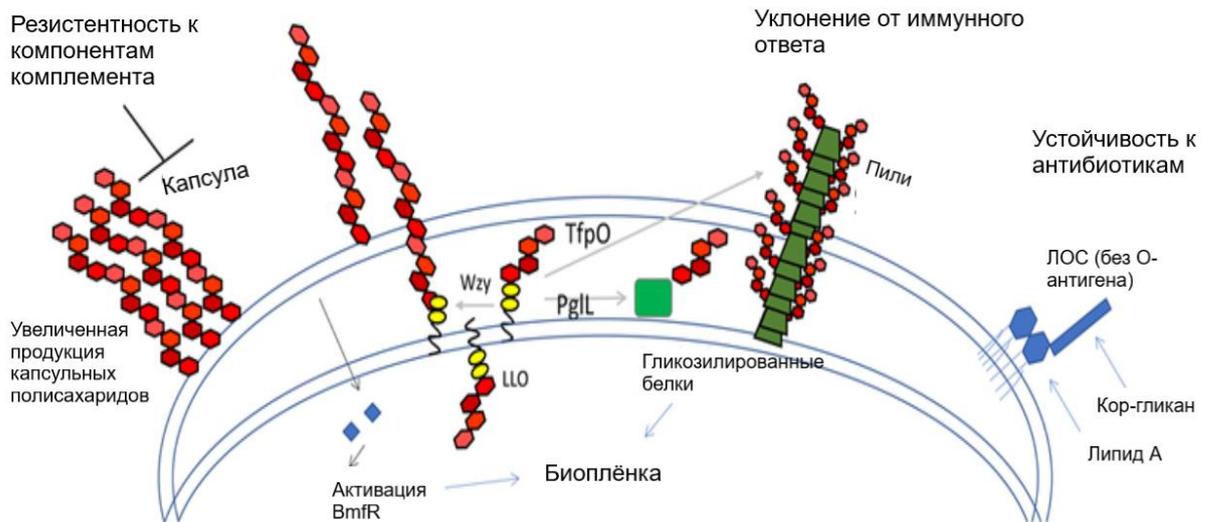


Рис. 3. Гликоконъюгаты *A. baumannii*, находящиеся на поверхности бактериальной клетки. Капсульный полисахарид, гликопротеины и гептаацелированный липолигосахарид (ЛОС) способствуют вирулентности и патогенности *A. baumannii*. [43]

Поверхностные полисахариды являются основными иммуногенными компонентами оболочки бактериальной клетки. Для *A. baumannii* не было показано наличие O-антигена, в то время как локус синтеза капсульного полисахарида был хорошо охарактеризован [88]. Для грамотрицательных микроорганизмов показано наличие высокой степени вариабельности для локуса синтеза капсульных полисахаридов, что позволило идентифицировать его в геноме *A. baumannii* биоинформатическими методами.

В геноме *A. baumannii* прослеживаются 2 локуса синтеза сахаридов – один ассоциирован с синтезом внешнего кора (outer core) ЛОС, а второй – с синтезом

капсульного полисахарида (K локус). Капсульные полисахариды состоят из большого количества повторяющихся единиц (K units), синтез сахаров для которых происходит в цитоплазме. Капсульные полисахариды штаммов *A. baumannii* могут различаться по наличию разных сахаров, а также характером и порядком связи между повторяющимися единицами (K units). Повторяющиеся единицы капсульных полисахаридов могут быть также разнообразно «декорированы» с помощью ацетильных, ацильных, пирувильных групп и др. (например, см. публикации [89–92]). Такое разнообразие структур опосредовано генетической вариабельностью хромосомных кластеров (K locus, KL), ответственных за биосинтез капсульных полисахаридов [20,88,93,94].

Локус синтеза капсульных полисахаридов включает в себя от 20 до 27 различных генов в зависимости от K-типа. На данный момент для *A. baumannii* обнаружено 240 различных K-типов и продолжают выявляться новые [20]. Химическая структура на данный момент решена для более 40 различных K-типов *A. baumannii* [95], полученные структуры согласуются с генетическими данными. Важно отметить, что в состав полисахаридной капсулы *A. baumannii* могут входить редко встречающиеся в природе сахара, например, 6-дезоксид-Л-талоза [96] и редкие производные легионаминовой кислоты [97–99].

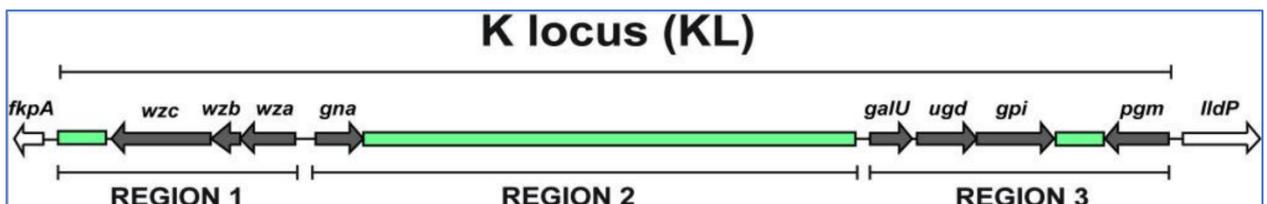


Рис. 4. Общее устройство хромосомного локуса генов, ответственных за синтез капсульного полисахарида *A. baumannii*. Белым показаны консервативные гены, фланкирующие локус, серым – гены всегда присутствующие в составе кластера, зеленым – регионы вариабельных генов [20].

Локус синтеза капсульного полисахарида имеет консервативную генную последовательность [20,100], локализован в едином месте генома – между генами пептидил-пролил цис-транс изомеразы *FkpA* и лактат пермеазы *LldP* (Рис. 4).

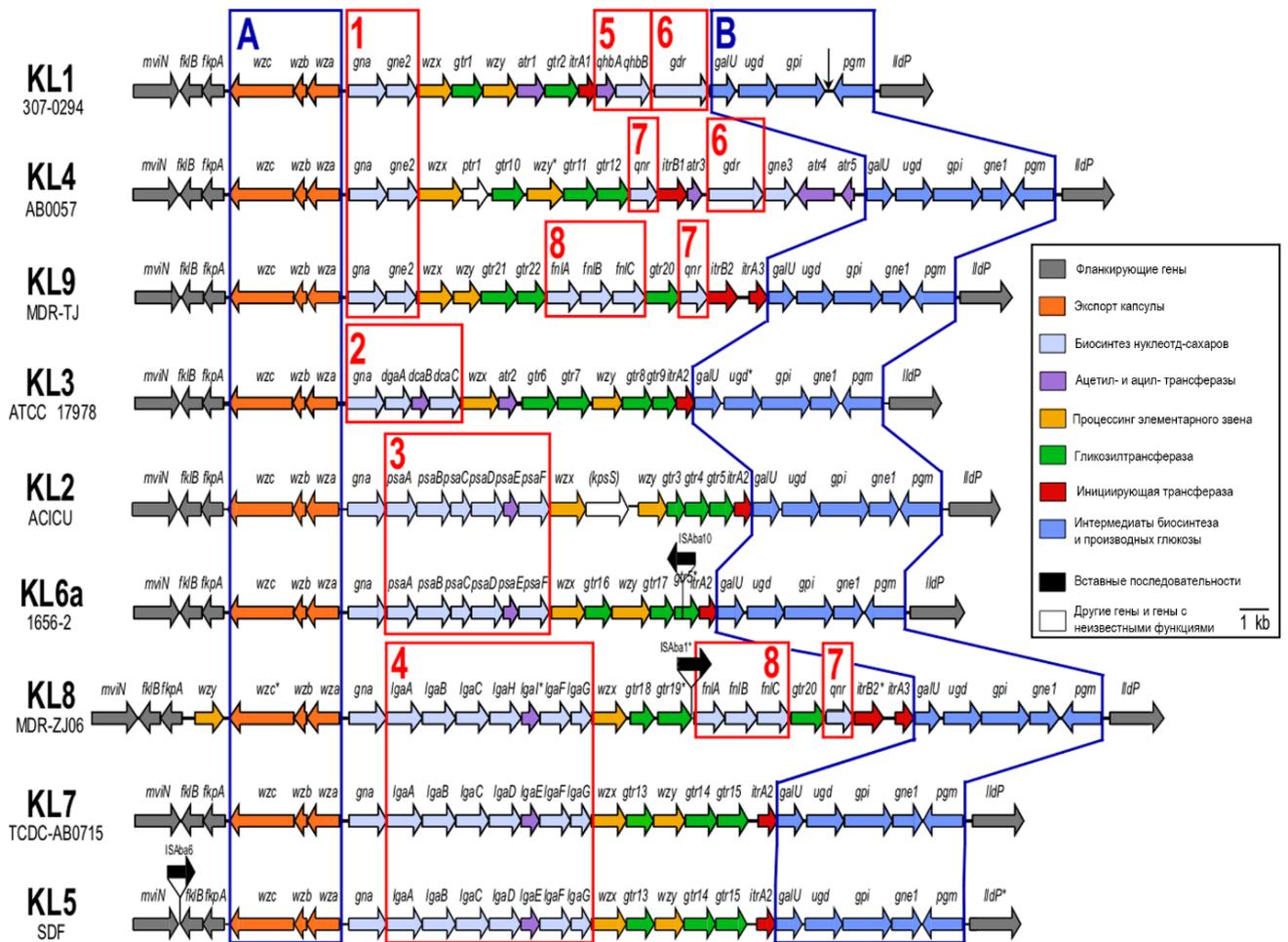


Рис. 5. Схема строения локусов синтеза капсульных полисахаридов *A. baumannii* (локусы KL1 – KL9) [100].

Левое плечо локуса синтеза капсульного полисахарида содержит трехгенную последовательность *wza-wzc*, отвечающие за транспорт полисахарида через клеточную стенку и мембраны на поверхность клетки [101], правое плечо содержит гены, отвечающие за синтез простых сахаров. Внутри локуса находится переменная область, содержащая гены полимеразы *wzy*, пермеазы *wzx*, гликозилтрансфераз, а также мини-опероны генов синтеза сложных сахаров. На поверхности клетки капсульный полисахарид связывается с белком внешней мембраны *Wzi* [102]. Специфичность связывания, по-видимому, опосредована

парами *Wzi* – иницирующая гликозилтрансфераза синтеза капсульного полисахарида (*Itr*), то есть с *Wzi* связывается первый сахар цепи. Отмечены случаи, когда гены, имеющие отношение к синтезу капсульного полисахарида находятся вне локуса синтеза и расположены в других областях генома (KL24 [103], KL19 [104]), как правило это ген полимеразы или ацетилаз. Описан так-же вариант структуры, когда внешний ген полимеразы, кодируемый профагом, меняет способ полимеризации повторяющихся единиц [105].

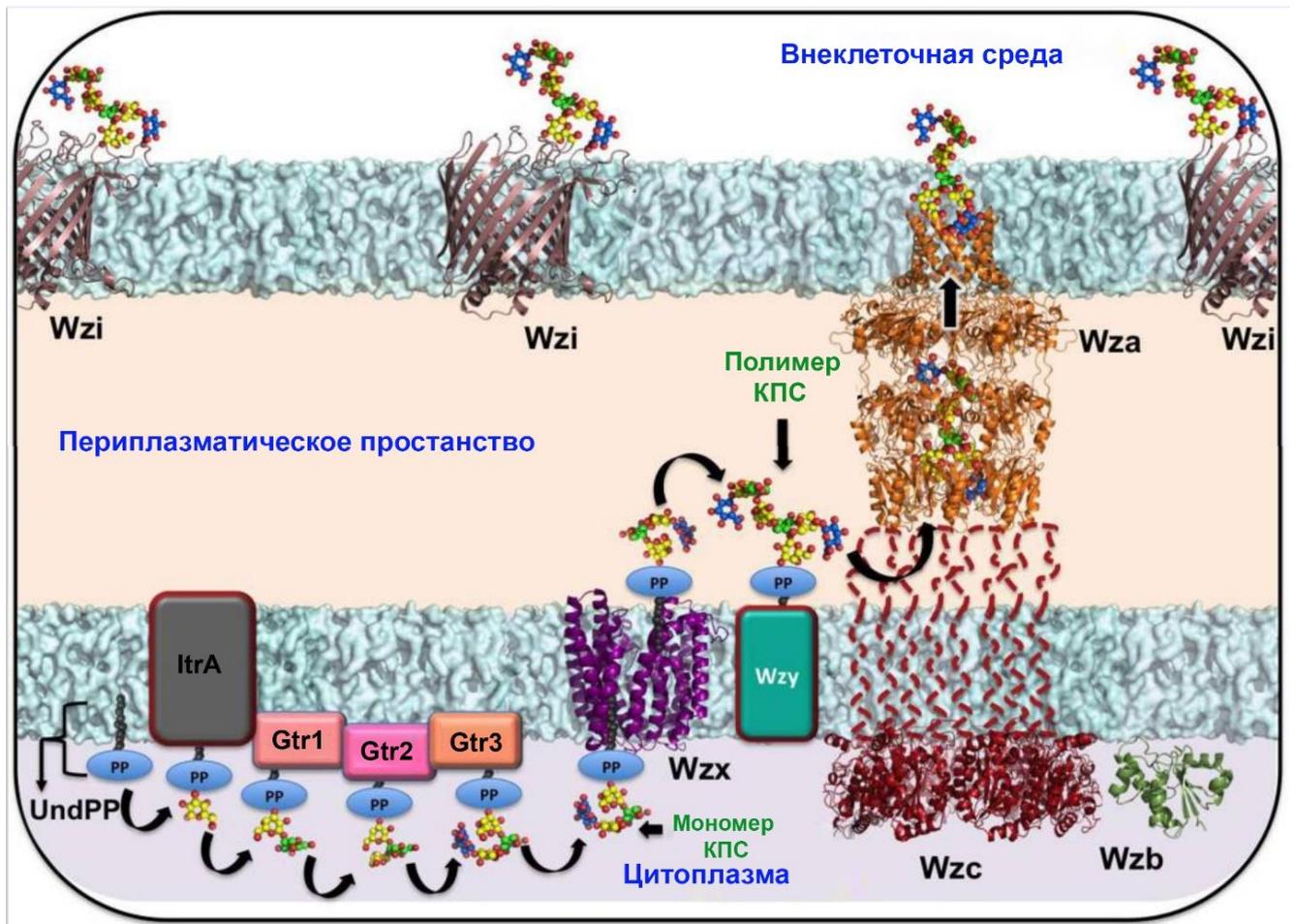


Рис. 6. Схематическое изображение синтеза элементарного звена капсульного полисахарида во внутриклеточном пространстве, транспорта элементарного звена в периплазму, полимеризации и секреции во внеклеточную среду (адаптация [101]).

На основе анализа 8994 геномов штаммов *A. baumannii*, депонированных в GenBank показано, что 10 наиболее распространенных в нозокомиальных условиях KL-типов это K2 (16,5%), K3 (13,3%), K22 (6,7%), K9 (6,7%), K13 (4,4%), K49 (3,7%), K18 (3,6%), K12 (3,5%), K17 (2,9%), K12 (3,5%), K6 (2,3%). В общей

сложности 17 KL типов имеют долю $>1\%$ от всех геномных сборок и совместно охватывают 74.6% общего пула. Оставшиеся 25.4% геномных сборок содержат 201 KL тип [20]

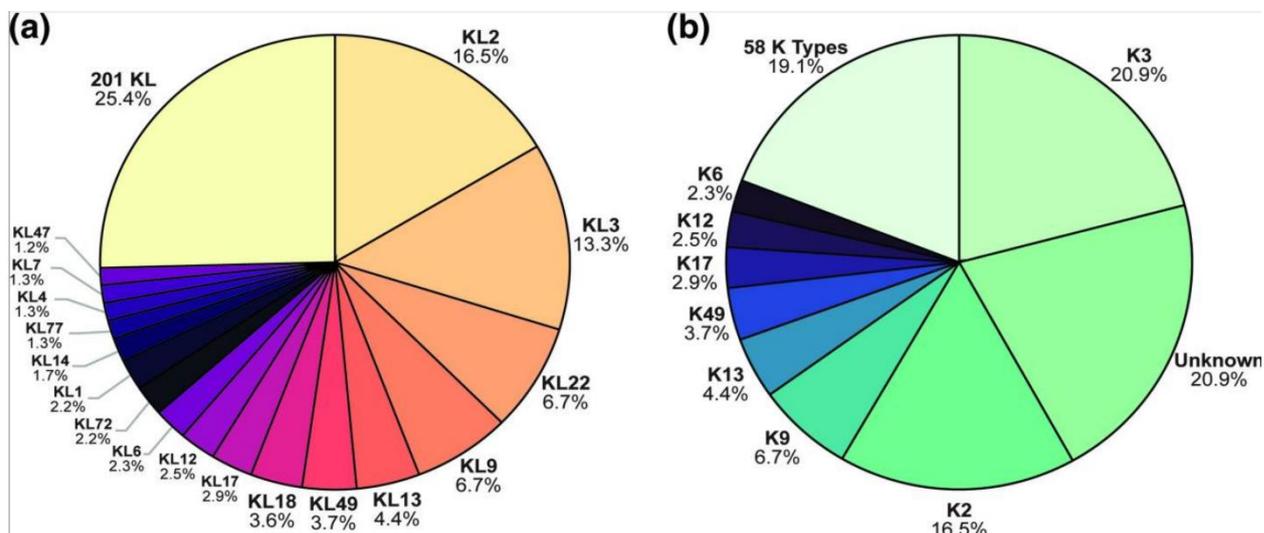


Рис. 7. Распределение по типам локуса синтеза капсульного полисахарида (в тех случаях, когда тип локуса достоверно установлен) (a) и распределение по типу локуса среди 8994 геномных сборок в GenBank (b) (выполнено при помощи программы Kaptive) [20].

Строение капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii* может влиять на патогенез инфекции. Показано, что антитела, продуцируемые на капсульные полисахариды *A. baumannii*, защищают от инфекции гипервирулентным штаммом мышей в моделях бактериемии и аспирационной пневмонии; элиминация возбудителя осуществляется в первую очередь за счет опосредованного Fc-рецептором фагоцитоза макрофагами и нейтрофилами [106].

Вариации в локусе синтеза полисахарида также влияют на вирулентность. Показано, что штаммы экспрессирующие интактный ген *gtrb*, кодирующий гликозилтрансферазу, были менее вирулентны, чем мутанты по этому гену (ген *gtrb* содержал спонтанные транспозонные мутации). Штаммы с мутантным *gtrb* проявляли устойчивость к фагоцитозу *in vitro* и были связаны с более высокой летальностью *in vivo* [107] Штаммы с интактным *gtrb* были более подвержены фагоцитозу и не приводили к летальному исходу в мышинной модели инфекции. В

случае, если опосредованный CR3-рецептором фагоцитоз был заблокирован, штаммы, интактные по *gtrB*, демонстрировали большую вирулентность *in vivo* [107]. Таким образом, изменения всего одного компонента в локусе синтеза полисахаридов привели в существенному изменению вирулентности.

Известно, что мутации в локусе синтеза капсульного полисахарида, приводящие к потере капсулы, связаны с образованием авирулентных изолятов *A. baumannii* [83,108]. Таким образом, капсульные полисахариды *A. baumannii* играют существенную роль в патогенезе ацинетобактерной инфекции.

Анализ геномов, содержащихся в международных базах данных, показал, что *A. baumannii* имеет 14 генетических типов ЛОС [93], которые по набору имеющихся в их составе генов делятся на две группы А и В. Установлены только две химические структуры ЛОС – OCL1 (штамм SMAL) (группа А) [100,109] и структура ЛОС штамма ATCC 19606 (геном не секвенирован), видимо относящегося к группе В (только в локусах группы В есть гены биосинтеза рамнозы) [110].

2.6. Общая характеристика бактериофагов класса *Caudoviricetes*

Наиболее распространенными из всех вирусов бактерий являются «хвостатые» бактериофаги класса *Caudoviricetes* филума *Uroviricota*. На настоящий момент более 95% всех бактериофагов с известной нуклеотидной последовательностью включают в класс, ранее атрибутированный как порядок *Caudovirales*. Описанные бактериофаги этого класса инфицируют более 130 видов бактерий, среди которых и представители рода *Acinetobacter*.

Бактериофаги класса *Caudoviricetes* характеризуются наличием хвостового отростка. Геном хвостатых фагов представлен одной несегментированной копией двуцепочечный ДНК (разной длины от 12 т.п.н. до 500 т.п.н.), которая иногда может замыкаться в кольцо. В двуцепочечной структуре могут встречаться одноцепочечные промежутки. Геном упакован в икосаэдрический капсид, к которому на одной из вершин крепится хвостовой отросток [111].

В целом, структуру фаговой частицы бактериофагов класса *Caudoviricetes* можно описать на примере типичного представителя – бактериофага Т4 (Рис. 8). Фаговая частица состоит из икосаэдрической головки и хвоста. Хвост подразделяется на «воротник», «чехол», базальную пластинку и фибриллы. В момент инфекции чехол сокращается, внутренняя трубка хвоста погружается вглубь клеточной оболочки и входит в цитоплазму бактериальной клетки, и ДНК из капсида по трубке переходит внутрь клетки.

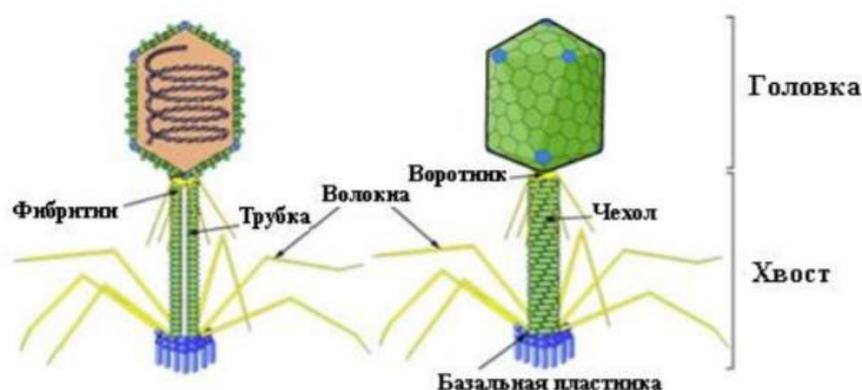


Рис. 8. Структура типичного представителя класса *Caudoviricetes*, бактериофага Т4 [112]

Таксономия внутри класса *Caudoviricetes* претерпела драматические изменения. До недавнего времени в состав порядка *Caudovirales* входили только семейства *Myoviridae*, *Podoviridae* и *Siphoviridae* (Рис.3), выделенные лишь по одному критерию, а именно по типу хвостового отростка. В настоящее же время порядок *Caudovirales* ликвидирован. Хвостатые фаги отнесли к классу *Caudoviricetes* филы *Uroviricota*, а внутри класса находится ряд полрядков и независимых семейств (например, *Autographiviridae*, подсемейств и родов *s* [113]. Класс *Caudoviricetes* включает множество семейств и родов, среди которых: семейства *Ackermannviridae*, *Autographiviridae*, *Chaseviridae*, *Demereciviridae*, *Drexleriviridae*, *Guelinviridae*, *Herelleviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae*, *Rountreeviridae*, *Salasmaviridae*, *Schitoviridae*, *Siphoviridae*, *Zobellviridae*, род

Lilyvirus [113]. Морфология вирусных частиц (миовирусы, подовирусы, сифовирусы) остается внесистемной, но важной описательной характеристикой, и будет использоваться в данном обзоре при описании и систематизации фагов *A. baumannii*. Имеются предложения по дальнейшему развитию и совершенствованию таксономической классификации [114].

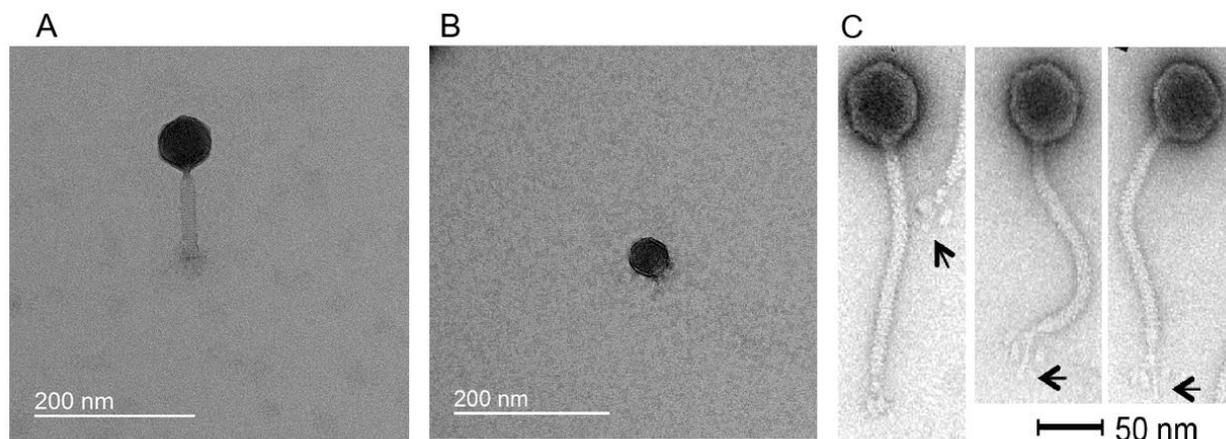


Рис. 9. Электронная микрофотография частиц фагов различной морфологии. А. Представитель *Myoviridae*, бактериофаг P2. В. Представитель *Podoviridae*, бактериофаг T7. С. Представитель *Siphoviridae*, бактериофаг T1.

На данный момент бактериофаги класса *Caudoviricetes*, инфицирующие различные патогенные бактерии, за счет своей распространённости, вариабельности и лёгкости их выделения исследованы более всего: их изучению посвящено множество публикаций.

2.7. Характеристика бактериофагов, специфически инфицирующих *A. baumannii*

На данный момент в научной литературе присутствуют разрозненные данные по бактериофагам, инфицирующим *A. baumannii*. Все они принадлежат к классу *Caudoviricetes*. Единственными исключениями являются два представителя класса *Leviviricetes* [115]. Также есть данные о присутствии в геномах штаммов

A. baumannii профагов семейства *Inoviridae*, что может свидетельствовать о большом разнообразии ацинетобактерных фагов [116]. Ацинетобактерии могут содержать в своем геноме существенное количество профаговых последовательностей [117], которые заслуживают отдельного детального исследования.

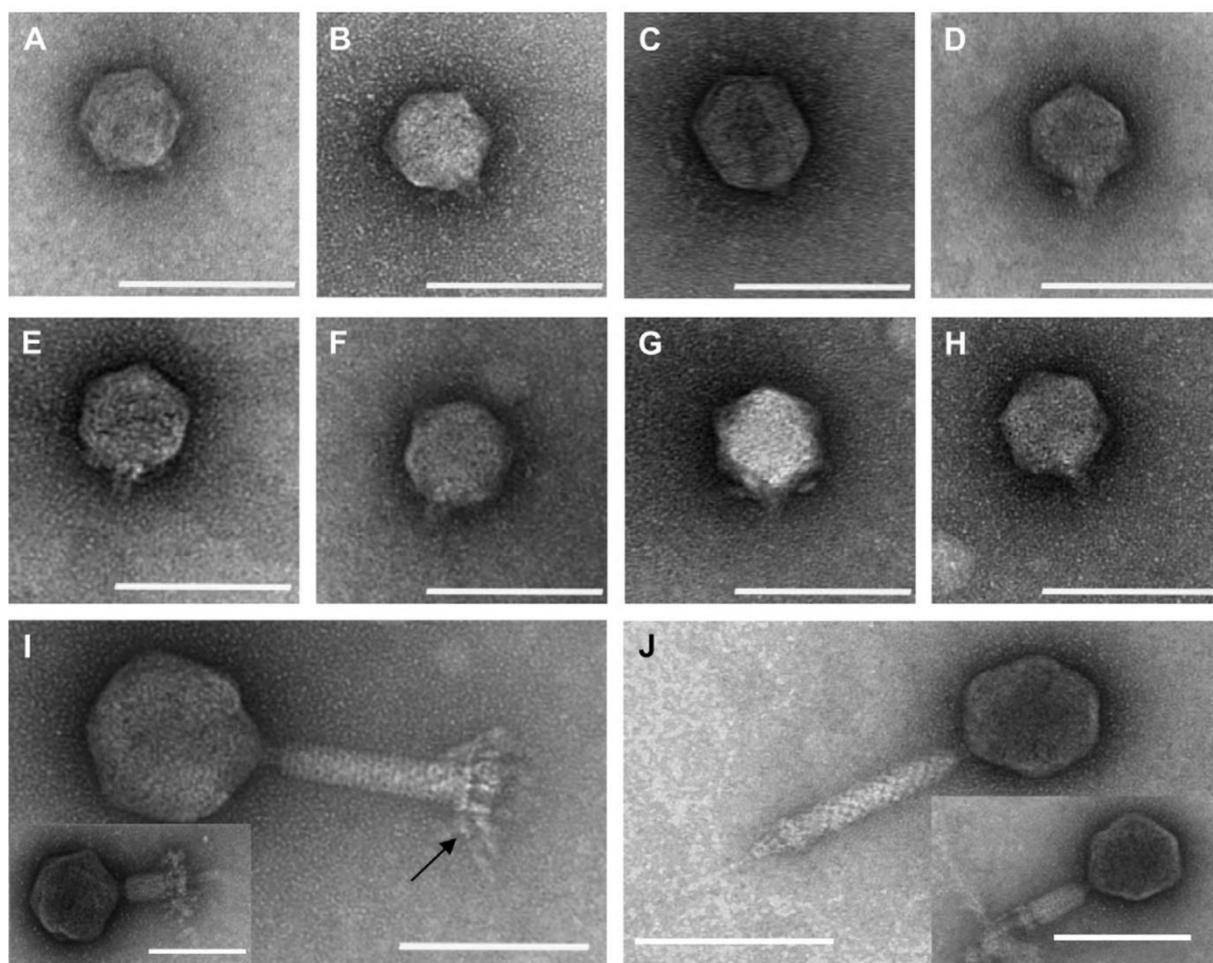


Рис. 10. Электронная микрофотография бактериофагов *A. baumannii*, выделенных в ходе исследования [118]. Фаги phiAB1-7 и phiAB9 принадлежат к семейству *Beijerinckvirinae*, в том числе phiAB1, phiAB2 и phiAB3 относятся к роду *Friunavirus*. Фаг phiAB11 принадлежит к роду *Saclayvirus* (JF733905). Фаг phiAB8 - неохарактеризованный представитель семейства *Ackermannviridae* (о чем свидетельствует сложная базальная пластинка). Негативное контрастирование, шкала 100нм.

Бактериофаги являются естественными регуляторами популяции микроорганизмов, их разнообразие в природе чрезвычайно велико, и они используют ряд стратегий для заражения и уничтожения бактерий. Бактериофаги, инфицирующие *A. baumannii*, известны с конца 20-го века [119]. Однако, активный поиск фагов начался только в начале 21 века и ныне более сотни расшифрованных геномов фагов депонировано в базы GenBank. Данные об известных нам фагах *A. baumannii* были обобщены в двух обзорах, 2017 года (37 геномов) [115] и 2021 года (134 генома) [120].

Способность бактериофагов заражать бактериальные клетки, в первую очередь, зависит от их способности распознавать специфические детерминанты на поверхности клетки бактерии. В этом отношении фаги, инфицирующие *A. baumannii*, делятся на две большие группы, – для первой капсульные полисахариды являются основными рецепторами, частицы таких фагов как правило несут полисахарид-деградирующие ферменты [121–125]. Ко второй группе относятся все остальные фаги, фибриллы которых в качестве рецепторов распознают липоолигосахариды, белки-порины и другие поверхностные детерминанты.

2.7.1 Вирусы с коротким несократимым хвостом

подавляющее большинство описанных подовирусов *A. baumannii* принадлежат к подсемейству *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae* (*Duplodnaviria* › *Heunggongvirae* › *Uroviricota* › *Caudoviricetes* › *Autographiviridae*). В это подсемейство на данный момент входят три рода бактериофагов: *Daemvirus*, *Friunavirus*, *Pettyvirus*. Наибольшее количество выделенных и охарактеризованных вплоть до геномной последовательности фагов принадлежат к роду *Friunavirus*. Фаги семейства *Autographiviridae* имеют следующий набор признаков:

1. Морфология частицы: капсид икосаэдрический, с симметрией $T=7$, около 60 нм в диаметре, хвост несократим, оснащен 6 фибриллами (хвостовыми шипами).

2. Транскрипция ранних генов осуществляется РНК-полимеразой клетки-хозяина до того, как геномная ДНК полностью выйдет из капсида. Транскрипция средних и поздних генов осуществляется собственной РНК-полимеразой.

3. Репликация генома осуществляется собственной ДНК-полимеразой, линейный геном имеет одно направление транскрипции. Геном имеет концевые повторы 250-400 нуклеотидов длиной. Для описываемых вирусов размер генома составляет примерно 42 тысячи пар оснований, и содержит приблизительно 52-56 генов.

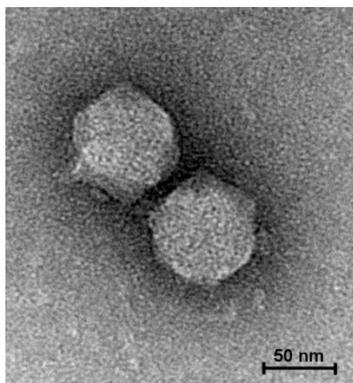


Рис. 11. Электронная микрофотография частицы подовируса vB_AbaP_Acibel07, принадлежащего к роду *Daemvirus* [126]. Негативное контрастирование.

Фаги рода *Friunavirus* имеют сходство геномов на уровне $>70\%$, число одинаковых белков так же превышает 70% , фаги различаются ранними генами и генами, кодирующими структурную деполимеразу.

Отличительная черта фагов семейства *Beijerinckvirinae*, – наличие хвостовых шипов, белков сложной структуры, обладающих ферментативной активностью, гидролазной или лиазной. Полиморфизм локусов синтеза капсульных полисахаридов у *A. baumannii* ведёт к большой вариабельности капсульных полисахаридов, а следовательно, к большому разнообразию бактериофагов, инфицирующих такие штаммы, по крайней мере в области гена, кодирующего белок хвостового шипа.

В процессе распознавания фагом клетки и адсорбции фаговой частицы на её поверхности белок хвостового шипа специфически распознает капсульный

полисахарид как субстрат и расщепляет его [122–125,127]. Таким образом, спектр хозяйских штаммов для фага определяется ферментативной активностью его хвостовых шипов, и каждый вид фага способен инфицировать только штаммы строго определенных К-типов, при том, что за исключением хвостовых шипов геномы фагов в высокой степени сходны между собой. Так, было показано, что замена гена, кодирующего деполимеразу, меняет специфичность фага [128].

На настоящий момент в международной базе GenBank депонированы геномы более 60 фагов семейства *Beijerinckvirinae*, включая более 60 фагов рода *Friunavirus*, 1 фаг рода *Daemvirus* (vB_AbaP_Acibel007) [126] и 1 фаг *Pettyvirus* (Petty) [129].

Полиморфизм локусов синтеза капсульных полисахаридов у *A. baumannii* ведёт к большой вариабельности капсульных полисахаридов, а следовательно, к большому разнообразию бактериофагов, инфицирующих такие штаммы.

На данный момент в научной литературе присутствуют мало систематизированные сведения о механизме взаимодействия структурных деполимераз бактериофагов с бактериальными капсульными полисахаридами. В одном из исследований методом ЯМР показано, как деполимераза хвостового шипа фага φAB6 гидролизовала капсульный полисахарид клинического изолята Ab-54149 *A. baumannii* (относящегося к капсульному типу K2) [124]. После этого появился ряд работ со сходным дизайном.

Деполимеразы хвостовых шипов двух бактериофагов Fri1, vB_AbaP_AS12 проявляют себя как специфические гликозидазы, которые гидролизуют капсульные полисахариды трёх штаммов *A. baumannii*: 28 (K19 капсульный тип), 1432 (K27) [127].

Фаги семейства *Beijerinckvirinae* отличает специфическая морфология негативных колоний – прозрачные бляшки диаметром около 2 мм, окруженные полупрозрачным ореолом (который возникает вследствие диффузии белка деполимеразы и взаимодействия его с капсульным полисахаридом клеток в агаризованной среде).

В Табл. 1 обобщена вся доступная информация по охарактеризованным фагам семейства *Beijerinckvirinae* и их специфичности к вариантам капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii*. В ряде случаев тип капсульного полисахарида указан в публикации, посвященной соответствующему фагу, в других случаях помогает сравнение аминокислотной последовательности хвостовых шипов относительно белков с известной специфичностью, кроме того, К-тип легко установить биоинформатическим анализом генома штамма хозяина (в тех случаях, когда такие данные доступны) при помощи программы Kaptive [130].

Табл. 1. Бактериофаги семейства *Beijerinckvirinae* и их специфичность в отношении капсульных полисахаридов инфицируемых ими штаммов *A. baumannii*

Название	Номер генома в базе GenBank	К-тип	Примечание
Fri1	KR149290	K19	
phiAB1	HQ186308	K128	
vB_AbaP_AS11	KY268296	K19	
vB_AbaP_PE21	OL964948	K19	
AB3	KC311669	-	Неполный геном
vB_AbaP_APK44	MN604238	K44	
BM12	OP508218	K2	
vB_AbaP_APK2	MK257719	K2	
IME-200	KT804908	K2	
AbpL	OP171942	K2	
SH-Ab15519	KY082667	K2	
Ab124	MT633129	K2	
vB_AbaP_ABWU2101	OK546191	K2	
MRABP9	OP727261	K2	
vB_AbaP_AGC01	MT263719	K2	

vB_AbaP_APK81	MT741944	K2	
vB_AbaP_APK2-2	MK257720	K2	
vB_AbaP_APK93	MK257721	K2/K93	
AbTP3phi1	OL770263	K37	
vB_AbaP_APK37	MK257723	K37	
vB_AbaP_APK26	MW345241	K26	
vB_AbaP_IME546	MN061582	K7 (?)	
vB_AbaP_APK89	MN651570	K89	
Pipo	MW366783	K32	
Paty	MW366784	K32	
vB_AbaP_ZHSHW	OM925528	K32	
vB_AbaP_APK32	MK257722	K32	
MD-2021b	CAKLQG020000001.1	-	
AbKT21phiIII	MK278859	K3	
Abp1	JX658790	-	
APK20	MZ936316	K20	
vB_AbaP_B3	MF033348	K2	
vB_AbaP_B1	MF033347	K9	
vB_AbaP_B5	MF033349	K9	
vB_AbaP_WU2001	MZ099557	K2	
phiAB6	KT339321	K2	
vB_AbaP_D2	MN212906	K2	
vB_AbaP_D2M	MN212906	K2	
WCHABP5	KY888680	K2	
vB_AbaP_B3	MF033348	K2	
SWH-Ab-3	MG599035	K2	
vB_AbaP_PMK34	MN433707	K2	

vB_AbaP_PD-6A3	KT388102	-	
vB_AbaP_APK116	MN807295	K116	
vB_AbaP_AS12	KY268295	K27	
vB_AbaP_PD-AB9	KT388103	K77	
vB_AbaA_fBenAci001	MW056501	K77	
vB_AbaA_fBenAci002	MW056502	-	
vB_AbaA_fBenAci003	MW056503	-	
AIIMS-AbE5-RC	OP291336	-	Неправильно собран геном
vB_Ab4_Hep4	OP019135	-	
vB_AbaP_APK48	MN294712	K48	
vB_AbaP_APK48-3	MN614471	K48	
vB_AbaP_46-62_Aci07	MH800200	-	
AB_SZ6	ON513429	K14	
vB_AbaP_B09_Aci08	MH763831	-	
APK15	MZ936315	K15	
vB_AbaP_APK128	MW459163	K128	
vB_AbaP_APK87	MN604239	K87	
F1245/05	HH777814	K9	
vB_AbaP_APK14	MK089780	K14	
vB_AbaP_Acibel007	KJ473423	K1	
Petty	KF669656	K116	

Разнообразие подовирусов *A. baumannii* не исчерпывается семейством *Beijerinckvirinae*. Описан единственный представитель N4-подобных фагов, фаг *Presley* (*Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Caudoviricetes* > *Schitoviridae* > *Presleyvirus* > *Presleyvirus Presley*) [131,132]. Как и другие N4-подобные фаги *Presley* имеет вирион-ассоциированную РНК полимеразу, которая транслоцируется

внутри инфицируемой клетки вместе с геномом фага, и осуществляет транскрипцию ранних генов, включая вторую двусубъединичную РНК полимеразу, которая в свою очередь выполняет транскрипцию оставшейся части генома. Линейная хромосома фага *Presley* содержит 77181 пар оснований и имеет прямые концевые повторы длиной 611 п.о. Геном содержит 94 уникальные рамки считывания. Сведений о молекулярных деталях адсорбции этого фага в литературе не имеется.

2.7.2 Вирусы с длинным сократимым хвостом

Среди фагов инфицирующих *A. baumannii* наибольшее видовое разнообразие на настоящий момент обнаружено среди миовирусов. Классификация миовирусов включает несколько родов, при этом некоторое количество фагов пока остаются вне классификации. Это роды: *Obolenskvirus* (*Duplodnaviria* > *Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Caudoviricetes* > *Obolenskvirus*), *Saclayvirus* (*Duplodnaviria* > *Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Caudoviricetes* > *Saclayvirus*). Т4 подобные фаги *A. baumannii* согласно последней классификации были распределены в 4 рода семейства *Twarogvirinae*, *Hadassahvirus*, *Lasallevirus*, *Lazarusvirus*, *Zedzedvirus* (*Duplodnaviria* > *Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Caudoviricetes* > *Straboviridae* > *Twarogvirinae*).

В первую очередь следует упомянуть о бактериофагах, имеющих структурные деполимеразы. Во-первых, это фаги семейства *Obolenskvirus*. Это семейство относительно небольших миовирусов, имеющих линейную хромосому размером от 43,2 до 46,4 тысяч пар оснований, кодирующую примерно 82-89 открытых рамок считывания, по большей части расположенных на плюс цепи [133–136]. Электронные микрофотографии демонстрируют частицы с икосаэдрическим капсидом 63–65 нм в диаметре и сократимым хвостом 85–90 нм длиной, видно наличие фибрилл, отходящих от базальной пластинки. На агаризованных средах эти фаги формируют прозрачные негативные колонии 2–3 мм в диаметре с видимым ореолом (гало). Адсорбционный аппарат фагов этого рода детально охарактеризован и состоит из коротких фибрилл и хвостовых шипов. В

международной базе данных кристаллографических структур (<https://www.rcsb.org>) находятся атомарные структуры деполимеразы фага AP22 в комплексе со структурной единицей капсульного полисахарида (4Y9V) и хвостовой фибриллы фага (4MTM). Хвостовые шипы (структурные деполимеразы) также имеют высокую специфичность к капсульным полисахаридам различных штаммов.

Табл. 2. Фаги семейства *Obolenskivirus* и их специфичность в отношении капсульных полисахаридов инфицируемых ими штаммов

Название	Номер депонированного генома в базе GenBank	К-тип	Примечание
AP22	HE806280	K91 (K40)	
vB_AbaM_IME512	MH853788	-	
WCHABP1	KY829116	-	
vB_AbaM_IME285	MH853786	K9	
WCHABP12	KY670595	K9	
BUCT629	MZ712044	K9	
Bphi-R2919	MN516421	-	
Bphi-R1888	MN516422	-	
vB_AbaM_IME284	MH853787	-	
vB_AbaM-IME-AB2	JX976549	-	
Abp95	MZ618622	K2	
Brutus	ON036882	K116	
Cato	OM471864	K102	
Scipio	ON036883	K82	
vB_AbM_WUPSU	OL743187	-	
AbP2	MF346584	-	

YMC-13-01-C62	KJ817802	K48	
LZ35	KU510289	-	
AB1	HM368260	-	
Abp9	MN166083	-	
Arbor	ON237674	K14	

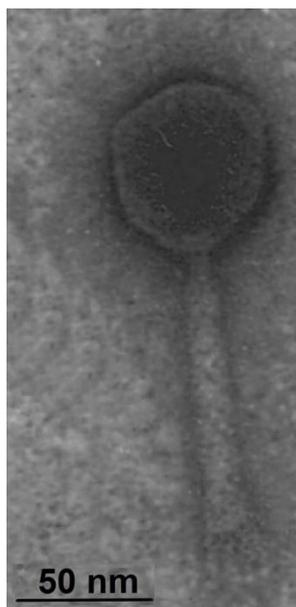


Рис. 12. Электронная микрофотография частицы фага AM24 [121]. Негативное контрастирование.

Группа миовирусов типа AM24 объединяет пять представителей, геномы которых были депонированы в базы GenBank: собственно AM24 (KY000079) [121], YMC13/03/R2096 (KM672662), Mitridates (MW316731), Bestia (MW316733), Herod (MW316732). Вирусы этой группы имеют частицы с икосаэдрическим капсидом 67 ± 3 нм в диаметре и сократимый хвост длиной 112 ± 3 нм [121]. Геном представляет собой линейную хромосому размером примерно 97-98 т.п.н., которая содержит около 170 открытых рамок считывания. На агаризованной среде фаг формирует мелкие негативные колонии с ореолом, что свидетельствует о наличии структурной деполимеразы. Действительно, аппарат адсорбции AM24-подобных фагов состоит из фибриллы и хвостового шипа, имеющего деполимеразную

активность по отношению к капсульному полисахариду. Известно, что фаг AM24 инфицирует клетки с полисахаридом K9, Mitridates – K7, Bestia – K26, Herod – K10 (М.М. Шнейдер, личное сообщение). На основе наблюдаемого высокого сходства деполимеразы фага YMC13/03/R2096 с деполимеразой фага vB_AbaP_APK14 можно предположить, что фаг YMC13/03/R2096 инфицирует штаммы капсульного типа K14.

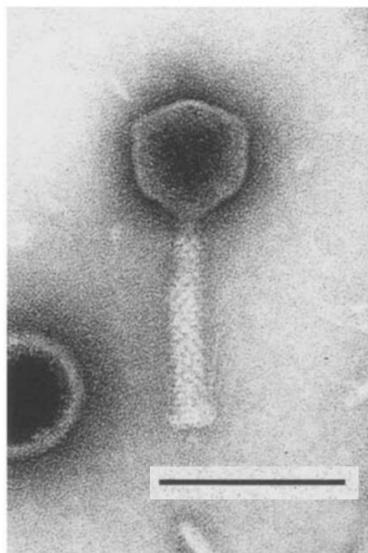


Рис. 13. Электронная микрофотография частицы фага BS46 [119]. Масштаб шкалы 100нм. Негативное контрастирование.

Группа фагов BS46 объединяет четыре фага, геномы которых доступны в базе GenBank: BS46 (MN276049) [137], TaPaz (MZ043613) [138], Phab24 (MZ477002) [139–141], vB_AbaM_B9 (MH133207) [142], MD-2021a (CAKLQH020000001). Вирусы этой группы имеют частицы с икосаэдрическим капсидом 85 ± 3 нм в диаметре и сократимый хвост 110 ± 5 нм длиной. Геном представляет собой линейную хромосому размером примерно 93-94 тыс. пар оснований, которая содержит около 167-178 открытых рамок считывания. На агаризованной среде фаги формируют мелкие негативные колонии с ореолом. Геном фага кодирует 1-3 тРНК. Адсорбционный аппарат вируса имеет сложное строение и состоит из двух фибрилл и 1-2 (у фага TaPaz) хвостового шипа. Соответственно, данные фаги отличаются высокой специфичностью к штаммам *A. baumannii*: BS46 инфицирует

штаммы K9, ТаPaz – K3, vB_AbaM_B9 – K45, MD-2021a – K14. Фаг ТаPaz, судя по наличию двух генов, кодирующих структурные деполимеразы, должен обладать двойной штамм-специфичностью, однако документирована пока только его активность в отношении полисахарида штамма капсульного типа K47.

Кроме перечисленных выше, описано несколько других фагов, уникальных представителей своих видов. Так, фаг SH-Ab 15599 (MH517022) миовирус с геномом 143.2 т. п.н., 127 из 174 его рамок уникальны среди ацинетобактерных фагов. Биоинформационный анализ его структурных белков свидетельствует, что эволюционно он ближе всего к фагам семейства *Ackermannviridae*. Геном SH-Ab15599 кодирует два белка, содержащих альфа-глутамил/путресцинил тимин фосфорилазный домен (InterPro: IPR041271) который, как предсказывается, катализирует гипермодификацию гидроксиметил-уридина [120]. Эта модификация в различных вариантах характерна в частности для фагов семейства *Ackermannviridae*, и в ряде вариантов чрезвычайно затрудняет установление нуклеотидной последовательности их геномов [143].

Миовирусы, не имеющие структурных деполимераз, относятся, главным образом, к двум семействам, весьма распространенным в природе. Первое семейство – это T4-подобные фаги, современная классификация которых была приведена выше, достаточно хорошо представлены в базе GenBank (около 20 геномов). Некоторые из фагов подробно охарактеризованы в литературе, например ZZ1 (HQ698922) [144,145], KARL-1 (MH713599) [146]. Фаговые частицы имеют удлиненный икосаэдрический капсид шириной 81.4 ± 1 нм и длиной 108.8 ± 1.7 нм. Длина растянутого хвоста 113.8 ± 1.1 нм, а сокращенного 47.3 ± 0.8 нм. T4-подобные фаги на агаризованной среде образуют чрезвычайно мелкие (>0.5 мм) негативные колонии без ореола. Линейная хромосома с концевой избыточностью имеет размер примерно 166-168 т.п.н. Геном фагов чрезвычайно мозаичен (как и у большинства T-четных фагов), кодирует ранние, средние и поздние гены, в общей сложности примерно 250 открытых рамок считывания, и около 10 тРНК. Анализ генома показывает, что ДНК фага, по всей видимости, содержит остатки гидроксиметилцитозина, к которому присоединены остатки арабинозы (гены

биосинтеза арабинозы присутствуют в геноме, равно как и две гликозилтрансферазы). Для сравнения, ДНК классического фага Т4 модифицирована остатками глюкозы. Адсорбционный аппарат представлен набором длинных и коротких фибрилл. Скорее всего, специфичность фага к хозяйским штаммам определяется длинными хвостовыми фибриллами, имеющими переменные участки последовательности, что делает спектр каждого отдельного фага довольно узким.

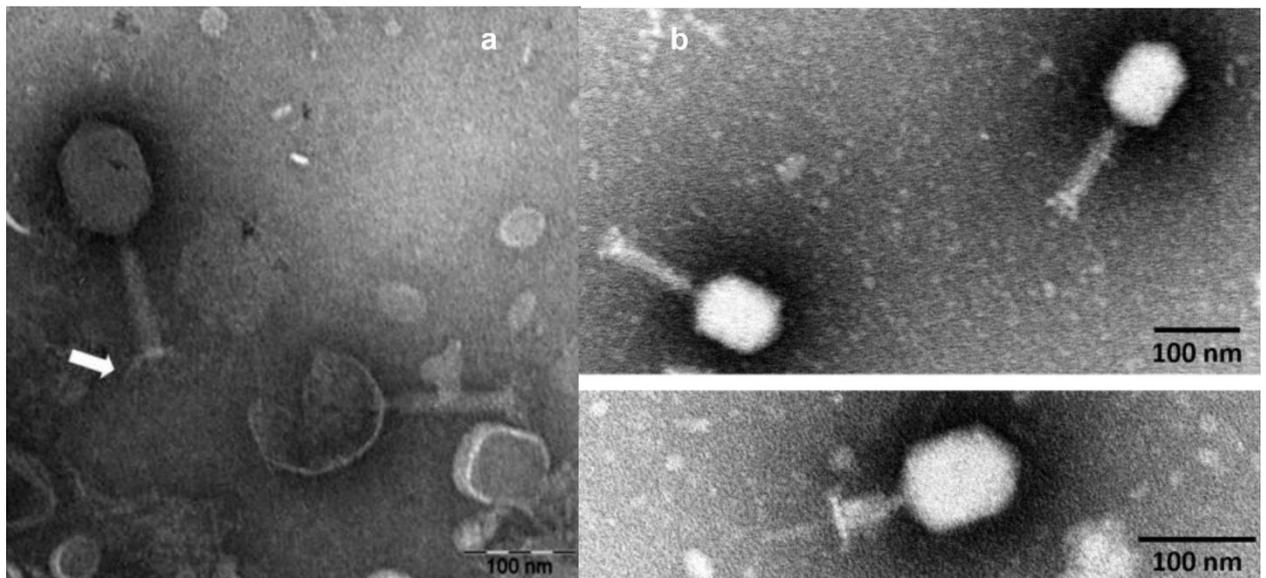


Рис. 14. Электронная микрофотография частиц фагов (а) ZZ1 [144] и (б) KARL-1 (интактная и контрактованная частицы) [146]. Негативное контрастирование.

Второе семейство представлено родом *Saclayvirus*. В настоящий момент в базах GenBank представлено около 10 геномов фагов этого рода. Эти фаги относятся к одним из самых распространенных для *A. baumannii*. Это фаги Acibel004 (KJ473422), phiAbaA1 (KJ628499), TAC1 (MK170160), B09_Aci01-1 (MH800198), B09_Aci02-2 (MH800199) [126,147] и другие. На агаризованной среде эти фаги формируют прозрачные негативные колонии диаметром около 1мм без ореола. Линейная хромосома размером от 99,7 до 104,4 т.п.н. кодирует от 151 до 173 открытых рамок считывания и, как утверждается, имеет прямые концевые повторы длиной более 1000 п.н. [147]. Геномы фагов *Saclayvirus* кодируют в

среднем около 10 тРНК. Адсорбционный аппарат фагов состоит из фибрилл, кроме того, геном *Saclayvirus* кодирует длинный (2100-3200 а.о.) белок, для которого предсказывается альфа-спиральная структура. Вероятно, этот белок инкрустирует частицы фага и может участвовать в первичном связывании с бактериальной клеткой [148,149].

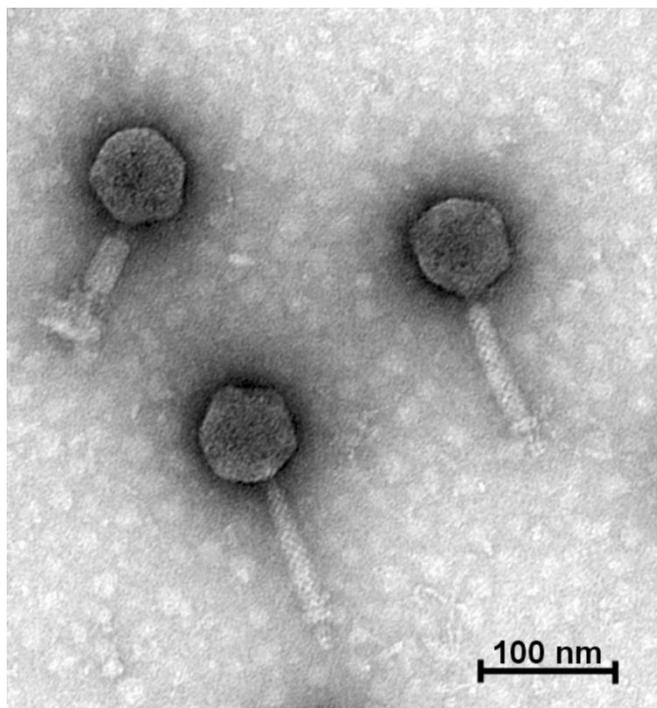


Рис. 15. Электронная микрофотография частиц фага vB_AbaM_Acibel004 принадлежащего к роду *Saclayvirus* [126]. Негативное контрастирование.

Описано ещё несколько фагов – одиночных представителей своих групп, в частности *Metrivirus* (*Duplodnaviria* > *Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Metrivirus*) vB_AbaM_ME3 (KU935715) [150], имеющий большой геном 234,9 т.п.н., фаг с ещё большим геномом BFG (378,11 т.п.н.) только упомянут в литературе [120]. Фаг АВРН49 (MH533020) единственный представитель семейства *Vequintavirinae* инфицирующий *A. baumannii*, имеет геном 149.9 т.п.н., который кодирует 246 открытых рамок считывания, в том числе фибриллы (AXN57970 и AXN57744).

2.7.3 Вирусы с длинным несократимым хвостом.

Сифовирусы, инфицирующие *A.baumannii*, описаны ещё в конце прошлого века [119] и многочисленны [151], однако, на данный момент литические вирусы с длинным несократимым хвостом представлены только одним родом *Lokivirus* (*Viruses* > *Duplodnaviria* > *Heunggongvirae* > *Uroviricota* > *Caudoviricetes* > *Lokivirus*). В базе данных GenBank содержатся геномы 4 представителей этого рода, собственно фага Loki (NC_042137.1) ([152]), IMEAB3 (NC_023590.1), Ab_SZ3 (MW151244.1), vB_AbaS_D0 (MK411820.1). Геном фага Loki представляет собой линейную хромосому размером 41308 п.о., имеющую либо концевую избыточность примерно 800 пар оснований, либо прямые концевые повторы. Геном содержит 51 открытую рамку считывания. Собственно Loki, как было показано исследователями, его изолировавшими, способен инфицировать только один штамм *A. baumannii* ATCC 17978 (штамм KL3), что указывает на высокую специфичность фага. Это косвенным образом свидетельствует о том, что у фагов рода *Lokivirus* отсутствует специфичность по отношению к типу капсульного полисахарида.

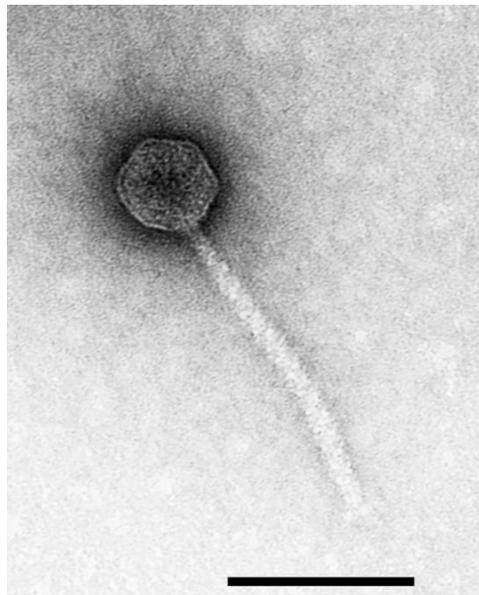


Рис. 16. Электронная микрофотография частицы фага Loki, шкала 100 нм [152]. Негативное контрастирование.

2.8. Деполимеразы фагов *A. baumannii*

Фаговые деполимеразы представляют собой достаточно большие белки размером 600-1000 аминокислот, сложной структуры. Исследованные деполимеразы представляют собой тримеры с симметрией третьего порядка вдоль длинной оси молекулы. Типичная деполимераза состоит из трех доменов – N-концевого с функцией крепления к частице фага, ферментативного и C-концевого, предположительно отвечающего за связывание с молекулой полисахарида или иным рецептором. Как правило, C-концевой домен представляет собой сверток антипараллельно уложенных β -тяжей, ось этого свертка может располагаться под углом по отношению к главной оси молекулы (от 0° (4Y9V) до 90° (6C72, 6EU4)). Иногда на C-конце молекулы располагается отщепляемый шаперон (6EU4). Ферментативный домен представляет собой протяженную треугольную β -призму, две боковые плоскости которой отвечают за контакты с олигомерами, а одна экспонирована в раствор. Сам каталитический домен находится либо в расселине между соседними призмами, либо на экспонированной плоскости [153–156]. В настоящий момент атомарные структуры деполимераз фагов Fri1 (6C72), AP22 (4Y9V), vB_AbaP_AS12 (6EU4), phiAB6 (5JS4), инфицирующих *A. baumannii*, установлены методом рентгеноструктурного анализа.

Деполимераза хвостового шипа бактериофага AP22 была характеризована как полисахарид-лиаза, разрушающая капсульный полисахарид штамма *A. baumannii* 1053 (K91) посредством β -элиминирования из цепи полисахарида гексуроновой кислоты (D-ManNAcA) [133].

Группой отечественных авторов, включая автора данной работы, в недавнем времени были выделены и описаны бактериофаги, инфицирующие штаммы *A. baumannii* различных капсульных типов. Бактериофаги vB_AbaP_APK2, vB_AbaP_APK32, vB_AbaP_APK37, vB_AbaP_APK44, vB_AbaP_APK48, vB_AbaP_APK87, vB_AbaP_APK89 и vB_AbaP_APK116 были изолированы из образцов сточной и речной воды на штаммах *A. baumannii* ACICU (K2), LUN5549 (K32), NIPH146 (K37), NIPH70 (K44), NIPH615 (K48), LUN5547 (K87), LUN5552

(K89) и MAR303 (K116) [125]. Все перечисленные бактериофаги, кроме vB_AbaP_ARK2, были строго специфичны к своим хозяевам, в то время как ARK2 был способен инфицировать штаммы двух разных капсульных типов за счет того, что расщепляет полисахарид по связи, присутствующей в обеих структурах: K2 (штамм AC1CU) и K93 (штамм B11911).

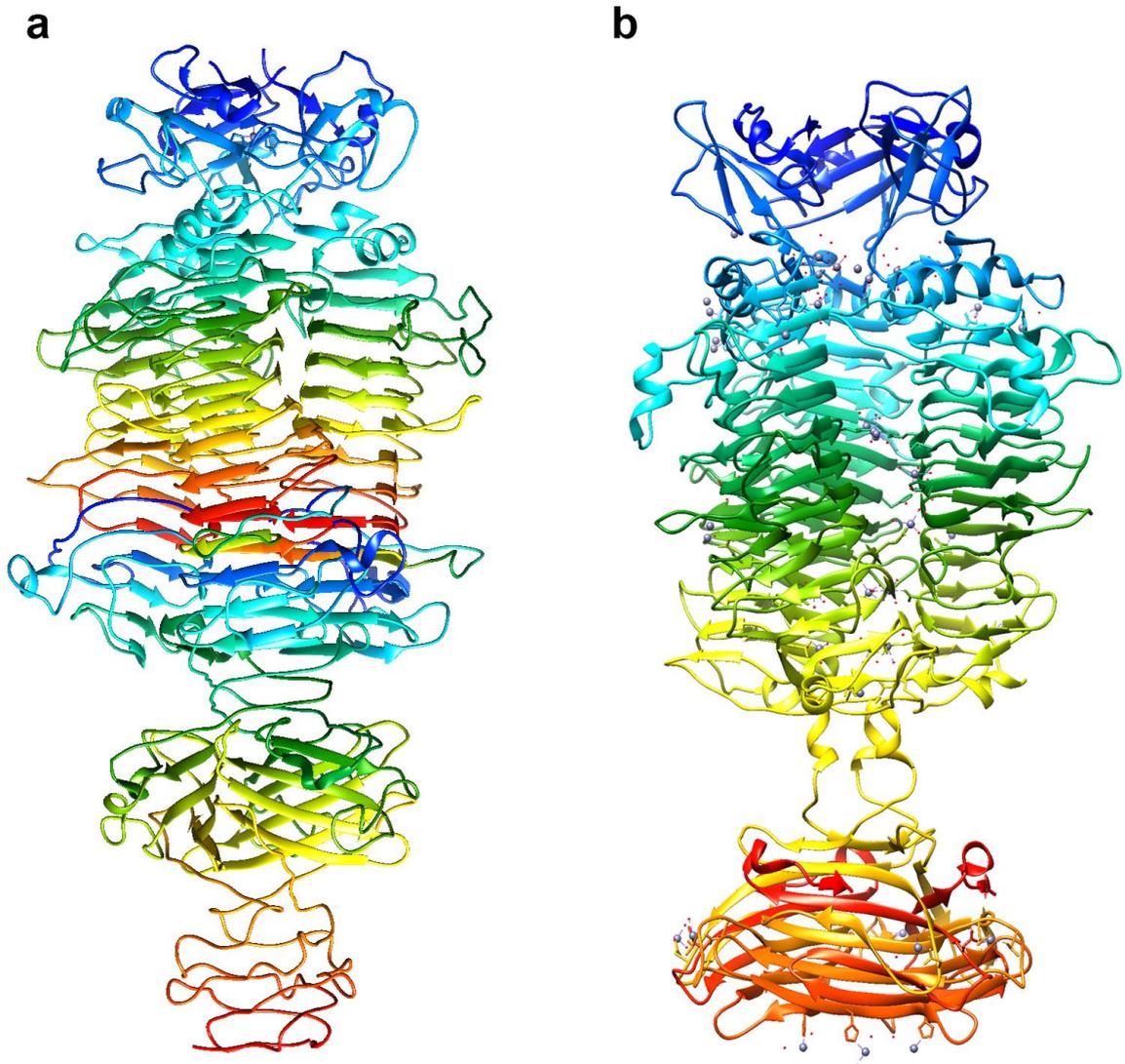


Рис. 17. Атомарные структуры деполимераз (a) фага vB_AbaP_AS12 (6EU4), и (b) фага Fri1 (6C72).

2.9. Практическое применение бактериофагов и фаговых ферментов для контроля бактериальных инфекций

В сложившихся условиях остро встала проблема разработки и внедрения на рынок новых противомикробных препаратов, активных в отношении *A. baumannii* и других патогенов группы ESCAPE. Создание новых противомикробных препаратов и вывод на рынок новых антибиотиков и ингибиторов белков резистентности отстаёт от потребностей клинической практики. Возможной альтернативой и/или дополнением к традиционному применению антибиотиков может служить использование препаратов бактериофагов, особенно в форме персонифицированных коктейлей. Перспективным терапевтическим методом представляется комбинированная терапия, сочетающая воздействие на патоген фагов и антибиотиков.

Вышеизложенные тезисы иллюстрируют недавние клинические случаи, опубликованные группами врачей и специалистов в области бактериофагов из США [157] и Израиля [158]. Первая работа описывает случай 68-летнего пациента, у которого инфекция панрезистентным штаммом *A. baumannii* протекала в форме абсцесса поджелудочной железы. Пациент находился в коме и, ввиду безнадежного случая, было получено разрешение прибегнуть к экспериментальному лечению. Оперативно был выделен пул фагов, инфицирующих штамм-возбудитель, и сформированы фаговые коктейли, которые вводились пациенту внутривенно. Поскольку применение фагов вызывало появление фагорезистентных клонов патогена, было последовательно составлено в общей сложности три специфических фаговых коктейля, которые и были использованы по мере выявления фагорезистентных клонов. В определенный момент было выявлено, что у возбудителя появилась чувствительность к миноциклину, после чего в терапию был введен этот антибиотик. После этого наблюдалась эрадикация патогена, и спустя 11 недель полное выздоровление пациента [157]. К сожалению, авторы не сообщают о молекулярном механизме, лежавшем в основе лечения. Однако можно предположить, что один из бактериофагов в качестве рецептора использовал порин TetB. Фагорезистентные клоны утратили этот порин, что привело к тому, что такие

клоны стали чувствительны к действию миноциклина. Некоторые косвенные данные позволяют предположить, что в этом клиническом случае схема лечения могла бы быть оптимизирована, однако, для этого авторам следовало иметь более четкое представление о биологии используемых фагов.

Ещё один клинический случай успешной терапии описан учеными из Израиля [158]. 42-летний пациент страдал инфекцией кожи и мягких тканей ноги, вызванной экстремально резистентным штаммом *A. baumannii* (устойчивым к колистину и меропенему) в сочетании с множественно лекарственно устойчивым штаммом *K. pneumoniae*. Терапия включала два шестидневных курса фаговым коктейлем, состоявшим из двух бактериофагов, специфичных к *A. baumannii* и *K. pneumoniae*, соответственно, в сочетании с колистином и меропенемом. Сочетание антибиотиков и бактериофагов оказалось настолько действенным, что бактерии полностью элиминировали, а возникновения фагорезистентных клонов *in vivo* выявлено не было. Примечательно, что штамм *K. pneumoniae* был чувствителен к меропенему, однако, карбапенемаза, продуцируемая *A. baumannii*, обеспечивала выживание обеих бактерий. По всей видимости, использование фага, специфичного в отношении *A. baumannii*, вернуло чувствительность бактерии к колистину. Возможно, это явление связано с тем, что использованный фаг специфически инфицирует штаммы *A. baumannii*, имеющие капсульный полисахарид типа КЗ, и фагорезистентные клоны были лишены полисахаридной оболочки.

Показателен также случай лечения 76-летнего пациента с хронической инфекцией протеза аорты синегнойной палочкой [159]. На начальном этапе инфекцию удавалось контролировать антибиотикотерапией цефтазидимом и ципрофлоксацином, до тех пор, пока бактерия не приобрела устойчивость к этим антибиотикам. Однако применение специфически подобранного фага ОМКО1 и цефтазидима позволило полностью элиминировать *P. aeruginosa*. В данном случае решение об использовании фага ОМКО1 было принято более осознанно: ранее было выявлено, что рецептором этого фага на поверхности клеток является порин ОpgM, компонент системы эффлюкс насоса MexAB-OpgM, в числе прочего

ответственного за выведение из бактериальных клеток цефтазидима. Таким образом, возникающие фагорезистентные клоны бактерии имели дефект эффлюкс насоса и были чувствительны к цефтазидиму. Примечательно, что фаг ОМКО1 относится к группе phiKZ-подобных вирусов, применение которых в терапии не рекомендовано ввиду явления так называемой «псевдолизогении» [160].

Помимо использования коктейлей фагов в персонифицированной медицине перспективным направлением является использование фаговых ферментов в качестве противомикробных препаратов. Например, могут использоваться фаговые эндолизины, - ферменты, разрушающие пептидогликан клеточной стенки бактерий. Эндолизины успешно прошли испытания на животных моделях инфекции грамположительными бактериями и показали ряд преимуществ по сравнению с использованием классических антибиотиков [161].

Также ведутся разработки препаратов на основе рекомбинантных фаговых полисахарид-деполимеризующих ферментов. Такие препараты будут обладать лишь бактериостатическим эффектом, однако, рассматриваются как потенциальный агент, снижающий потенциал вирулентности штаммов патогенных бактерий. Потеря или нарушение поверхностных полисахаридов, в том числе капсульного полисахарида, может сказаться на спектре чувствительности к антибиотикам, а также может предотвратить биопленкообразование и снизить сопротивляемость компонентам иммунитета человека (фагоцитоз и действие системы комплемента). Терапевтический потенциал фаговых полисахарид-деградирующих ферментов был подтвержден в ряде исследований на лабораторных моделях *in vivo* [162,163].

Все приведенные выше примеры демонстрируют, насколько важным является понимание молекулярных основ фаговой инфекции, в виду того, что оно позволяет оптимизировать терапевтические методы.

2.10. Заключение к обзору литературных данных

Одним из наиболее распространенных и грозных граммотрицательных нозокомиальных патогенов является *A. baumannii*. В последнее время во всем мире наблюдается взрывной рост устойчивости к противомикробным препаратам клинических штаммов данного патогена. По данным многоцентровых исследований в России и странах Восточной и Южной Европы чрезвычайно велика распространенность мультирезистентных, экстремально резистентных и панрезистентных штаммов *A. baumannii*. Инфекции, ассоциированные с инвазией *A. baumannii*, включают такие угрожающие жизни и здоровью состояния как бактериемия, сепсис, вентилятор-ассоциированные пневмонии и катетер-ассоциированные инфекции мочевыводящих путей (включая уросепсис).

Таксономическое положение бактерий, в настоящем идентифицируемых как ацинетобактерии, менялось несколько раз с течением времени, однако основные характеристики этих бактерий оставались неизменными: это обладающие твитчинг-подвижностью, строго аэробные, неферментирующие, каталазо-позитивные, оксидазо-негативные граммотрицательные коккобациллы. На данный момент род *Acinetobacter* включает по разным данным от 68 до 73 видов бактерий, большинство из которых являются почвенными или водными свободноживущими видами. С клинической точки зрения наиболее важными представителями рода *Acinetobacter* являются виды, входящие в (Acb)-комплекс: *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. seifertii* и *A. dijkschoorniae*. Изоляты данных видов бактерий часто колонизируют кожу и слизистые оболочки здоровых людей (за исключением *A. baumannii* занявшим экологическую нишу нозокомиального патогена) и способны вызывать оппортунистические инфекции у иммуно-супрессированных пациентов.

Вид *A. baumannii* интересен своей чрезвычайной способностью к приобретению генов резистентности к противомикробным препаратам и устойчивостью к действию дезинфицирующих веществ и высыханию, а также высокой способностью к формированию биопленок. Данные свойства способствуют выживанию популяции *A. baumannii* в госпитальных условиях, делая

данную бактерию грозным нозокомиальным патогеном, вызывающим разнообразные инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи.

Препаратами выбора при лечении инфекций, связанных с *A. baumannii*, традиционно считались карбапенемы. В связи с этим высокую угрозу мировому здравоохранению представляет распространение карбапенем-резистентных штаммов данного патогена. По данным многоцентровых исследований распространенность устойчивых к карбапенемам изолятов *A. baumannii* в госпитальной среде перевалила за отметку в 50% в странах Южной, Восточной Европы и Российской Федерации. Таким образом, практически единственной опцией терапии инфекций, связанных с такими изолятами, остается колистин, обладающий высокой нефро- и ототоксичностью. Также большую проблему представляет формирование колистин-устойчивых штаммов непосредственно в процессе терапии данным препаратом. Возможной альтернативой классическим схемам противомикробной терапии, основанным на применении антибиотиков, в борьбе с такими мультирезистентными штаммами может выступать сочетанная антибиотикотерапия и фаготерапия персонифицированными коктейлями литических бактериофагов и/или использование рекомбинантных фаговых полисахарид-деградирующих ферментов.

На данный момент в фаготерапии инфекций, ассоциированных с *A. baumannii*, наиболее рациональным представляется метод подбора фаговых коктейлей на основе строения экзополисахаридов целевых штаммов *A. baumannii* и строения полисахарид-деградирующих ферментов бактериофагов, соответственно. На сегодняшний день в научной литературе описаны более 80 бактериофагов *A. baumannii*, являющихся представителями класса *Caudoviricetes* и использующих в качестве рецептора на поверхности бактериальной клетки капсульные полисахариды. Следует упомянуть, что капсульные полисахариды *A. baumannii* являются одним из основных факторов вирулентности, принимающим участие в формировании биопленок, предохраняющим бактерии от высыхания и воздействия детергентов и обеспечивающим ускользание от компонентов иммунной системы человека. Таким образом, разрушение капсульных полисахаридов само по себе

может сыграть роль в элиминации патогена, на чем и основано действие препаратов, включающих в себя рекомбинантные полисахарид-деполимеризующие ферменты бактериофагов.

Детальное понимание факторов вирулентности и патогенности штаммов *A. baumannii* может способствовать поиску новых мишеней для разработки новых противомикробных препаратов. В то же время использование фаготерапии или использование фаговых ферментов в терапии сложных инфекций, вызванных широко лекарственно устойчивыми штаммами патогена, также является перспективным направлением. Подробная характеристика новых литических фагов *A. baumannii* и принципов взаимодействий между вирусом и бактерией-хозяином позволит лучше понять основы применения фаготерапии в рамках персонализированного подхода в медицине.

3. Материалы и методы

3.1. Штаммы *A. baumannii*

Штамм *A. baumannii* KZ-1098 (МК420047), являющийся штаммом-хозяином для выделения бактериофагов Aristophanes и АРК26, был изолирован из респираторного тракта госпитализированного пациента в Астане, Казахстан, в 2016 году. В соответствии с базой SNPTAb [164] штамм KZ-1098 принадлежал к сиквенс-типу ST218^{Pas}/ST184^{Oxf}, капсульному типу K26, а также нес ген карбапенемазы *bla*_{OXA-58-like}.

Штамм *A. baumannii* B05 [121], являющийся штаммом-хозяином для выделения фага АРК09, принадлежал к капсульному типу K9 (МК331712).

Штамм *A. baumannii* AB5256 [165], являющийся штаммом-хозяином для выделения фага АРК14, принадлежал к капсульному типу K14 (NZ_ANAI00000000.1).

Штамм *A. baumannii* D4 [166,167], являющийся штаммом-хозяином для выделения фага АРК16, принадлежал к капсульному типу K16.

Штамм *A. baumannii* KZ1101, являющийся штаммом-хозяином для выделения фага АРК37.1, был выделен из очага инфекции мягких тканей госпитализированного пациента в Нур-Султане, Казахстан, в 2016 году (NZ_JAPYKX00000000.1). В соответствии с базой SNPTAb [164] штамм KZ-1101 принадлежал к сиквенс-типу ST132^{Pas}/ST2213^{Oxf} и капсульному типу K37 и был чувствителен к карбапенемам.

Штамм *A. baumannii* MA-55-66, являющийся штаммом-хозяином для выделения фага АРК86, был выделен в Москве в 2015 году. В соответствии с базой SNPTAb [164] штамм MA-55-66 принадлежал к сиквенс-типу ST824^{Pas}/ST1129^{Oxf} и капсульному типу K86.

Штамм *A. baumannii* 36–1454, являющийся штаммом-хозяином для выделения бактериофага АРК127v, был выделен в Москве в 2013 году (NZ_JANTLN00000000.1). В соответствии с базой SNPTAb [164] штамм 36–1454

принадлежал к сиквенс-типу ST448^{Pas}/ST1174^{Oxf}, капсульному типу K127 и был чувствителен к карбапенемам.

Штамм *A. baumannii* KZ1093, являющийся штаммом-хозяином для выделения бактериофага APK128, был выделен из респираторного тракта госпитализированного пациента в Нур-Султане, Казахстан, в 2016 году (NZ_JAJAWC000000000.1). В соответствии с базой SNPTAb [164] штамм KZ1093 принадлежал к сиквенс-типу ST1574^{Pas}/ST2240^{Oxf}, капсульному типу K128 и был чувствителен к карбапенемам.

Специфичность бактериофагов оценивали на панели из 51 штамма *A. baumannii* с подтвержденной структурой капсульных полисахаридов различных K-типов: K1, K2, K3/22, K6, K7, K8, K11, K15, K17, K19, K20, K21, K24, K25, K27, K30, K32, K33, K35, K42, K43, K44, K45, K46, K47, K48, K51, K52, K53, K54, K55, K57, K58, K61, K73, K74, K80, K81, K82, K83, K84, K85, K87, K88, K89, K90, K91, K92, K93, K116, K125 (Табл. 3) Коллекцию составляли по наибольшей вариабельности локусов синтеза капсульных полисахаридов.

Табл. 3. Список штаммов *A. baumannii*, используемых в ходе определения специфичности бактериофагов

К-тип	Штамм <i>A. baumannii</i>	Номер GeneBank
1	AYE	CU459141
2	ACICU	CP000863
3	ATCC17978	CP000521
6	RBH4	KF130871
7	LUH5533	KC526894
8	BAL097	KX712116
11	LUH5545	KC526904
15	LUH5554	KC526900
17	G7	KC118541
19	28	KU215659

20	A388	JQ684178
21	G21	MG231275
22	LUH5537	KC526920
24	RCH51	KX756650
25	AB5075	BK008886
27	4190	KT266827
30	NIPH190	MN166189
32	LUH5549	KC526897
33	NIPH67	MN166195
35	LUH5535	KC526896
42	LUH5550	KC526903
43	LUH5544	KC526905
44	NIPH70	APRC01000043
45	NIPH201	MN166190
46	NIPH329	MK609549
47	NIPH601	MN166193
48	NIPH615	MN166191
49	“NL4”	-
51	WM98b	MN148384
52	LUH5546	KC526899
53	D23	MH190222
54	RCH52	MG867726
55	BAL204	MN148381
57	BAL212	KY434631
58	BAL114	KT359617
73	SGH0703	MF362178
74	BAL309	MN148383
80	LUH3712	KC526914
81	LUH3713	KC526916

82	LUH5534	KC526908
83	LUH5538	KC526898
84	LUH5540	KC526902
85	LUH5543	KC526913
87	LUH5547	KC526918
88	LUH5548	KC526910
89	LUH5552	KC526919
90	LUH5553	KC526917
91	1053	KM402814
92	B8300	CP021347
93	B11911	BK010902
116	MAR-303	MK399425
125	MAR13-1452	MH306195

Вышеперечисленные штаммы были любезно предоставлены для исследования М. В. Эйдельштейном, И. С. Азизовым, а также Alexandr Nemes, Bin Liu, Lei Wang, Dean Scholl, Johanna Kenyon, Ruth Hall, Raffaele Zarrilli, Veeraraghavan Balaji и Indranil Biswas. Штамм B05 получен из коллекции ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, г. Оболенск. Штаммы 36–1454, KZ1101, KZ1093, KZ1098, MA55-66, MAR-303, MAR13-1452 получены из коллекции НИИ антимикробной химиотерапии, г. Смоленск.

3.2. Выделение, культивирование и очистка бактериофагов

Исследуемые бактериофаги выделяли из образцов сточной и речной воды, собранных на территории г. Москвы в 2018–2020 гг, с помощью процедуры обогащения. Образцы воды очищали от твердой фракции путем центрифугирования при 7000 x g в течение 15 мин, чтобы избежать бактериальной и механической контаминации. Затем супернатант собирали и перемешивали со средой LB (на 1 л 10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl). В полученную среду инокулировали штаммы *A. baumannii* различных капсульных

типов, инкубацию проводили в течение ночи при 37°C с помешиванием и аэрацией. Затем в полученную культуру добавляли 10 мл хлороформа для предотвращения дальнейшего размножения бактерий. Полученную суспензию бактериальных клеток и бактериофагов очищали от фрагментов клеток путем центрифугирования при 7000 x g в течение 30 мин. Полученный супернатант затем пропускали через мембранные фильтры с диаметром пор от 1,20 до 0,45 мкм (Millipore, Cork, Ирландия), фильтраты концентрировали путем ультрацентрифугирования при 85000 x g в течение 2 ч при 4°C.

Полученный концентрат проверяли на наличие литических бактериофагов с помощью спот-теста. На чашки Петри с газонами культур *A. baumannii* наносили по капле (10 мкл) полученного концентрата, затем чашки Петри инкубировали в течение ночи в термостате при 37°C и просматривали на наличие зон лизиса бактериальных клеток.

Фрагменты агара из зон лизиса, образовавшихся на газоне штамма *A. baumannii*, помещали в 500 мкл SM-буфера (50 mM Tris-HCl pH 7.7, 8 mM MgSO₄, 100 mM NaCl). Полученные суспензии затем титровали на чашках Петри с предварительно инокулированной культурой соответствующего штамма *A. baumannii* до получения единичных бляшек бактериофагов. Единичные зоны лизиса затем скалывали и помещали в 500 мкл SM-буфера для получения чистого стока бактериофага.

Культивирование бактериофагов проводили в среде LB. Заражение культуры штамма *A. baumannii* проводили на стадии экспоненциального роста при достижении культурой оптической плотности OD₆₀₀=0,3 при приблизительной множественности инфекции MOI=0,1. Инкубацию проводили при 37°C с помешиванием и аэрацией до достижения лизиса, затем добавляли хлороформ для умерщвления оставшихся бактериальных клеток. Избавление от фрагментов клеток проводили центрифугированием при 7000 x g в течение 15 мин. Фаговые частицы осаждали с помощью полиэтиленгликоля PEG 8000 (добавленного до конечной концентрации 10%) и 500 mM NaCl в течение 24 часов при 4°C. Фаговый преципитат получали центрифугированием при 9000 x g в течение 20 мин при 4°C,

затем фаги ресуспендировали в SM-буфере. Фаги очищали от ПЭГ путем центрифугирования при 7000 x g в течение 10 мин в присутствии хлороформа (0,5 объема).

Дальнейшую очистку фагов осуществляли с помощью центрифугирования в ступенчатом градиенте CsCl (1,7, 1,5, 1,4, 1,3 г/мл) при 100000 x g в течение 2 ч, опалесцирующую полосу собирали и диализировали против SM-буфера. Препараты очищенных фагов хранили при 4°C.

3.3. Электронная микроскопия бактериофагов

Для определения морфологии фаговых частиц проводили трансмиссионную электронную микроскопию с негативным окрашиванием [168]. Подготовленную аликвоту препарата очищенного бактериофага наносили на медную сеточку с углеродным покрытием, подвергали тлеющему разряду, а затем окрашивали с помощью 1%-уранил ацетата в течение 30 секунд и просушивали на воздухе. Подготовленные сеточки исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 200 кВ. Изображения отрицательно окрашенных частиц фага получали с помощью CCD-камеры Gatan Ultrascan 1000XP и программного обеспечения Gatan Digital Micrograph. Размеры фага усредняли по меньшей мере среди 30 индивидуально измеренных частиц.

3.4. Определение специфичности бактериофагов

Определение фаговой специфичности проводили на панели из 52 штаммов *A. baumannii*, приведённых в табл. 3 и отобранных по максимальной вариабельности кластеров синтеза капсульного полисахарида. Для этого 300 мкл культуры каждого из штаммов *A. baumannii*, подготовленных в среде LB до оптической плотности $OD_{600}=0,3$ при 37°C с перемешиванием и аэрацией, смешивали с 4 мл верхнего мягкого агара (среда LB с добавлением 0,6% агарозы). Полученные суспензии инокулировали на чашки Петри с предварительно подготовленным питательным агаром. Затем 10 мкл аликвоты препаратов очищенных фагов (с примерной концентрацией фаговых частиц 10^9 бляшко

образующих единиц на мл (БОЕ/мл)) помещали на суспензии бактериальных клеток в верхнем агаре. Инкубацию проводили в течение ночи при 37°C, затем полученных чашки исследовали на наличие зон лизиса.

3.5. Определение параметров инфекционного процесса

Препарат очищенного фага инокулировали в растущую культуру штамма-хозяина *A. baumannii* с приблизительной множественностью инфекции $MOI=0,001$ и инкубировали при комнатной температуре. Объем в 100 мкл полученной суспензии отбирали после инкубации в течение 0, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25 и 30 мин и смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. Затем полученные смеси центрифугировали, и супернатант разбавляли в 10 раз в SM-буфере. Неабсорбированные частицы обнаруживали с помощью титрования полученных суспензий на газоне целевого штамма. Процедуру проводили трижды. Константу адсорбции рассчитывали при помощи метода Адамса для периода в 5 мин.

Для определения характеристик инфекции также проводили эксперимент по определению единичного цикла роста. Для этого 20 мл культуры штамма-хозяина с оптической плотностью $OD_{600}=0,3$ центрифугировали при 3 500 x g в течение 10 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды LB. Бактериальные клетки инфицировали бактериофагом при множественности инфекции $MOI=0,01$. Бактериофаг адсорбировался в течение 5 мин при 37°C. Затем суспензию центрифугировали при 13000 x g в течение 2 мин для избавления от неадсорбированных фаговых частиц, и осадок ресуспендировали в 20 мл среды LB. Аликвоты полученной суспензии отбирали с 5- и 10-минутными интервалами в течение 100 мин инкубации при 37°C и незамедлительно титровали. Процедуру повторяли трижды.

Для определения характеристик инфекции также проводили эксперимент по определению единичного цикла роста. Для этого 20 мл культуры штамма-хозяина с оптической плотностью $OD_{600}=0,3$ центрифугировали при 3 500 x g в течение 10 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл среды LB. Бактериальные клетки инфицировали бактериофагом при множественности

инфекции $MOI=0,01$. Бактериофаг адсорбировался в течение 5 мин при $37^{\circ}C$. Затем суспензию центрифугировали при $13000 \times g$ в течение 2 мин для избавления от неадсорбированных фаговых частиц, и осадок ресуспендировали в 20 мл среды LB. Аликвоты полученной суспензии отбирали с 5- и 10-минутными интервалами в течение 100 мин инкубации при $37^{\circ}C$ и незамедлительно титровали. Процедуру повторяли трижды.

Анализ ингибирования фаговой инфекции проводили следующим образом. Для экспериментов по конкуренции был выбран титр $3,5 \times 10^6$ БОЕ/мл. Штамм-хозяин *A. baumannii* выращивали в среде LB при $37^{\circ}C$ до оптической плотности $OD_{600}=0,3$. Затем рекомбинантный белок, соответствующий фаговой деполимеразе или деацетилазе, добавляли в 300 мкл клеточной культуры до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 20 мин при $37^{\circ}C$. Аликвоты 300 мкл культуры *A. baumannii* без добавок или с добавлением бычьего сывороточного альбумина (BSA) до конечной концентрации 0,5 мг/мл, инкубированные в течение 20 мин при $37^{\circ}C$, служили контролем. После инкубации к смеси добавляли несколько разведений фага и 4 мл мягкого агара и наносили на питательный агар. Чашки Петри инкубировали в течение ночи при $37^{\circ}C$ и определяли количество зон лизиса. Эксперимент проводили в трех повторах. Для статистического анализа и графического представления результатов использовали программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

3.6. Очистка ДНК бактериофагов. Секвенирование и анализ фаговых геномов

ДНК фага выделяли из концентрированного и очищенного фагового стока с высоким титром стандартным фенол-хлороформным методом с предварительной инкубацией образца в 0,5% SDS с 50 мкг/мл протеиназы К при $65^{\circ}C$ в течение 20 мин.

Секвенирование генома бактериофагов проводили на платформе MiSeq с использованием набора для подготовки библиотеки ДНК Nextera (Illumina, США). Генерированные риды собирали *de novo* в контиги с использованием программы SPAdes v. 3.11.1 [169] (использовали параметры по умолчанию).

Геном фага аннотировали путем прогнозирования и проверки открытых рамок считывания с использованием программ Prodigal 2.6.1 [170], GeneMarkS 4.3 [171] и Glimmer 3.02 [172]. Идентифицированные открытые рамки считывания также проверяли вручную. Функции генов определяли с использованием поиска в базах данных BLAST NCBI и HHpred [173]. Области, кодирующие тРНК, идентифицировали с помощью программного обеспечения tRNAscan-SE [174] и ARAGORN [175]. Полученные геномы визуализировали с использованием программы Geneious Prime версии 2021.1.0. Поиск промоторов осуществляли с помощью утилиты PhagePromoter в рамках программы Galaxy с порогом 0,65. Положение и длину концевых повторов определяли путем поиска области с двойной глубиной считывания по сравнению со средней глубиной считывания по всему геному фага. Предсказанные белки сравнивали с использованием базы данных факторов вирулентности (VFD) [176].

3.7. Номера геномов бактериофагов в базе данных GenBank

Аннотированные геномы бактериофагов *A. baumannii* размещены в международной базе данных NCBI GenBank под номерами: Aristophanes - MT783706, APK9 - MZ868724, APK14 - MK089780, APK16 - MZ868725, APK26 - MW345241, APK37.1 - MZ967493, APK86 - MZ936314, APK127v - ON210142, APK128 - MW459163.

3.8. Определение филогении и таксономии бактериофагов

Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью MAFFT (алгоритм L-INS-i, матрица подсчета BLOSUM62). Выравнивания проверяли вручную и с помощью скрипта trimAL. Филограммы генерировали на основе аминокислотных последовательностей белков и их конкатенированных выравниваний. Лучшие модели белка находили с помощью MEGAX 10.0.5 [177]. Филогенетические деревья строили с использованием метода максимального правдоподобия (ML) с помощью программы RAxML [178,179] и модели белка LG+G [180], а также с помощью MrBayes [181].

Среднюю идентичность нуклеотидов (ANI) вычисляли с помощью инструмента OrthoANIu, используя USEARCH по BLAST [182] с настройками по умолчанию. Сервер VIRIDIS использовали для вычисления межгеномного сходства фагов [183]. Сравнение генома проводили с помощью Easyfig [184]. Идентификацию белков проводили с использованием HHpred и Phyre2 [185]. Пользовательские базы данных BLAST монтировали с помощью инструмента BLAST.

3.9. Клонирование, экспрессия и очистка рекомбинатных ферментов

Последовательности ДНК, соответствующие белкам хвостового шипа, лишенным N-концевого домена, амплифицировали с помощью пар праймеров, перечисленных в табл. 4. Полученные ампликоны клонировали в вектор pTSL (GenBank KU314761) [186] по сайтам рестрикции BamHI (5'-конец) и HindIII, XhoI (3'-конец).

Табл. 4. Последовательности пар праймеров для амплификации рекомбинантных полисахарид-деградирующих ферментов исследуемых бактериофагов *A. baumannii*

Бактериофаг	Прямой праймер	Обратный праймер
Aristophanes	5'-ATA-GGA-TCC-GAT-AGT-GCG-AGC-GTT-GCA-A	5'-ATA-CTC-GAG-TTA-TAG-ATT-CTC-AAA-AAT-TGG-CA
APK09	5'-ATA-GGA-TCC-GAG-GAA-GCT-GCT-CAA-GTA-GC	5'-ATA-CTC-GAG-TTA-TGT-GAT-AGT-TAA-TAA-GTT-AGC-A
APK14	5'-ATA-GGA-TCC-GAT-GCT-GCT-GAG-GAA-G	5'-ATA-AAG-CTT-AAC-ACT-TGA-AAT-GTA-CGT-ATG

APK16	5'-ATA-GGA-TCC-GAG-GTA-GCT-GCT-GCA-CAA-AC	5'-ATA-CTC-GAG-TTA-CAC-AGC-AAC-CCA-ATT-AG
APK26	5'-ATA-GGA-TCC-CAC-GAA-GCT-AGT-GAG-GCT-G	5'-ATA-AAG-CTT-ACC-AGT-TTG-ACA-TAG-ATC-CA
APK37.1	5'-ATA-GGA-TCC-ACT-GCT-GCT-GAG-GAA-GCT-G	5'-ATA-AAG-CTT-ATA-AGA-CAC-TAC-TAA-CTG-ATT-T
APK86	5'-ATA-GGA-TCC-GAA-GCT-GCC-GAA-GAT-GCT-T	5'-ATA-AAG-CTT-AAA-TAA-GTT-TAA-TAA-GTC-CTC-G
APK127v	5'-ATA-GGA-TCC-GAG-GAA-GCT-GCA-CAG-ACA-AC	5'-ATA-CTC-GAG-TTA-AAC-ATT-ATA-GTA-TGG-CAT-CTT-AT
APK128	5'-ATA-GGA-TCC-CAA-GAG-GCT-GCT-AAT-GCA-G	5'-ATA-CTC-GAG-TTA-ATT-TAG-TCG-AAC-ATC-AAT-C

Рекомбинантные белки экспрессировали в *E. coli* B834 (DE3) с помощью индукции 1 mM β -изопропилтиогалактозида (IPTG) на протяжении 16ч [186]. Затем клетки осаждали путем центрифугирования при 4 000 x g в течение 20 мин при 4°C, ресуспендировали в буфере А (20 mM Tris pH 8,0, 0.4 M NaCl) и подвергали ультразвуковому разрушению (аппарат Virsonic, VirTis, Франция). Полученный лизат очищали от клеточной фракции путем центрифугирования при 13 000 x g в течение 25 мин. Супернатант загружали в 5 мл колонку Ni²⁺-NTA Sepharose (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную в буфере А. Белки элюировали в ступенчатом градиенте имидазола 0 - 50 - 400 mM. Удаление His-tag и белка-шаперона SlyD проводили обработкой TEV-протеазой в течение ночи в условиях диализа против 10 mM Tris pH 8,0, 5mM бета-меркаптоэтанола. Окончательную очистку белков проводили на ионнообменной колонке 5 mL

SourceQ 15 (GE Healthcare, США) с использованием линейного градиента 0–600 мМ NaCl в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0).

3.10. Изоляция капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii* и их обработка рекомбинантными ферментами

Штаммы *A. baumannii* культивировали в среде 2TY в течение ночи при 37°C. Бактериальные клетки собирали центрифугированием (10 000 x g, 20 мин), промывали Na-фосфатным буфером, суспендировали в 70%-ном ацетоне, осаждали и сушили на воздухе. Образцы капсульных полисахаридов выделяли путем экстракции водным фенолом [187]. Экстракт диализовали, нерастворимые примеси удаляли центрифугированием, подкисляли 50% водным раствором CCl₃CO₂H до pH ~ 2 при 4°C. Осадок отделяли центрифугированием (12 000 x g, 20 мин), супернатант нейтрализовали, концентрировали и подвергали гель-проникающей хроматографии на колонке (70S2.6 см) с гелем Sephadex G-50, контролируя элюцию УФ-детектором при 206 нм.

Очищенные препараты капсульных полисахаридов солюбилизировали в 50 мМ буфере Tris HCl pH 8,0 и добавляли рекомбинантный фаговый белок в соотношении 1/100. Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение ночи. Продукты расщепления капсульных полисахаридов фракционировали методом гель-проникающей хроматографии на колонке (110S1.2 см) с гелем Sephadex G-50 (Amersham Biosciences, Швеция) в воде с детектированием с помощью дифференциального рефрактометра (Кнауер, Германия) [125].

3.11. Определение строения капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii* методом ЯМР

Для регистрации спектров ЯМР образцы лиофилизировали и растворяли в 99.95%-ном D₂O. Спектры ЯМР записывали на приборе Avance II (600 МГц, Bruker, Германия) при 40 °C для КПС и ОС8 или при 50 °C для ОС1—ОС7 с использованием в качестве внутреннего стандарта натрий-3-триметилсилилпропаноата-2,2,3,3-d₄ (dH 0 м.д., dC –1.6 м.д.). Двумерную 1H—1H

корреляционную спектроскопию (COSY и TOCSY), ^1H — ^1H спектроскопию ядерного эффекта Оверхаузера во вращающейся системе координат (ROESY), гетероядерную одноквантовую (HSQC) и многосвязевую (HMBC) ^1H — ^{13}C корреляционную спектроскопию проводили с использованием стандартного программного обеспечения (Bruker, Германия). Для сбора и обработки данных ЯМР использовали программу TopSpin 2.1 (Bruker, Германия). Время спиновой стабилизации MLEV-7 и время смешивания в экспериментах TOCSY и ROESY составляло 60 и 200 мс соответственно. Для оптимизации экспериментов ^1H — ^{13}C HMBC использовали задержку для развития многосвязевых корреляций 60 мс, соответствующую константе спин-спинового взаимодействия $J_{\text{H,C}} = 8$ Гц [188].

4. Результаты и обсуждение

4.1. Изоляция бактериофагов *A. baumannii* и определение их специфичности

Бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК86, АРК127v и АРК128 были выделены из образцов сточной и речной воды, собранных на территории г. Москвы в 2018-2020 гг, на клинических штаммах *A. baumannii* B05, AB5256, D4, KZ-1101, MAR55-66, 36-1454 и KZ-1093, принадлежащих к капсульным типам K9, K14, K16, K37, K86, K127 и K128, соответственно. Бактериофаги Aristophanes и АРК26 были выделены из образца сточных вод на клиническом штамме KZ-1098, принадлежащем к капсульному типу K26. Выделенные бактериофаги были наименованы в соответствие со схемой наименования новых вирусов архей и бактерий с указанием номера капсульного типа штамма *A. baumannii*, являющегося хозяйским штаммом для соответствующего бактериофага.

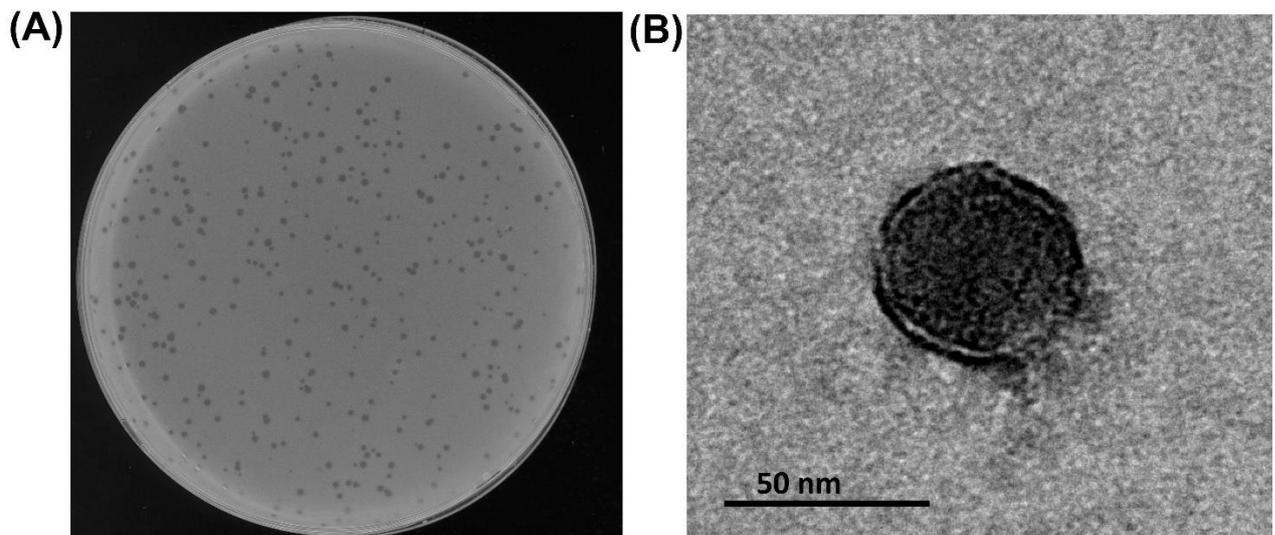


Рис. 18. Морфологические характеристики бактериофага Aristophanes. А. Фаговые бляшки на газоне штамма *A. baumannii* KZ-1098. В. Электронная микрофотография бактериофага Aristophanes

Все изолированные бактериофаги, за исключением бактериофага Aristophanes, формировали крупные бляшки с большими зонами просветления (гало) вокруг них, свидетельствующими о деполимеразной активности фагов. Бактериофаг

Aristophanes на газоне штамма *A. baumannii* KZ-1098 формировал мелкие бляшки без видимого гало (рис. 3А).

По результатам электронной микроскопии с негативным окрашиванием все бактериофаги имели икосаэдрический капсид порядка 50–60 нм в диаметре с коротким несократимым хвостом (рис. 3В на примере бактериофага Aristophanes).

Специфичность бактериофагов была протестирована на коллекции из 52 штаммов *A. baumannii* различных капсульных типов. Бактериофаги Aristophanes, АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК127v и АРК128 были высоко специфичны и инфицировали только клетки штаммов, на которых были выделены. Бактериофаг АРК37.1 проявил способность инфицировать клетки штаммов KZ-1101 и АВ5001, относящихся к капсульным типам К37 и К3-v1 (дефектный). Было так же установлено, что бактериофаг АРК86 способен инфицировать штаммы *A. baumannii* МА-55-66 и LUN5547 капсульных типов К86 и К87, соответственно. Способность фагов инфицировать штаммы *A. baumannii*, принадлежащие к разным капсульным типам, можно объяснить тем фактом, что деполимеразы, кодируемые в геномах фагов, могут распознавать и разрушать одинаковые связи, присутствующие в структурах капсульных полисахаридов этих штаммов. На данный момент такая способность выявлена у бактериофага АРК2, способного расщеплять капсульные полисахариды штаммов *A. baumannii*, принадлежащих к капсульным типам К2 and К93 [124].

4.2. Характеристики инфекционного процесса бактериофагов

Характеристики инфекционного процесса, вызываемого каждым из выделенных бактериофагов, были исследованы в рамках экспериментов по установлению эффективности адсорбции фаговых частиц и определению параметров единичного цикла роста. Для бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК37.1 АРК86, АРК127v и АРК128 динамика инфекции совпадала с таковой для ранее известных представителей рода *Friunavirus* (абсорбция 95% фаговых частиц в течение первых 5 мин инфекции, выход 150–300 частиц на клетку).

Динамика инфекционного процесса, вызываемого фагом *Aristophanes*, существенно отличалась от наблюдаемой для остальных исследуемых фагов. Согласно полученным данным (рис. 4А) в течение первых 5 мин после добавления бактериофага адсорбируются только 50% вирусных частиц, в течение первых 20 мин – 80% вирусных частиц. Константа адсорбции составила $1,3 \times 10^{-9}$ мл/мин. Латентный период инфекции составил 20 мин, выход фаговых частиц оказался низким – всего 15 фаговых частиц на одну инфицированную клетку (рис. 4В).

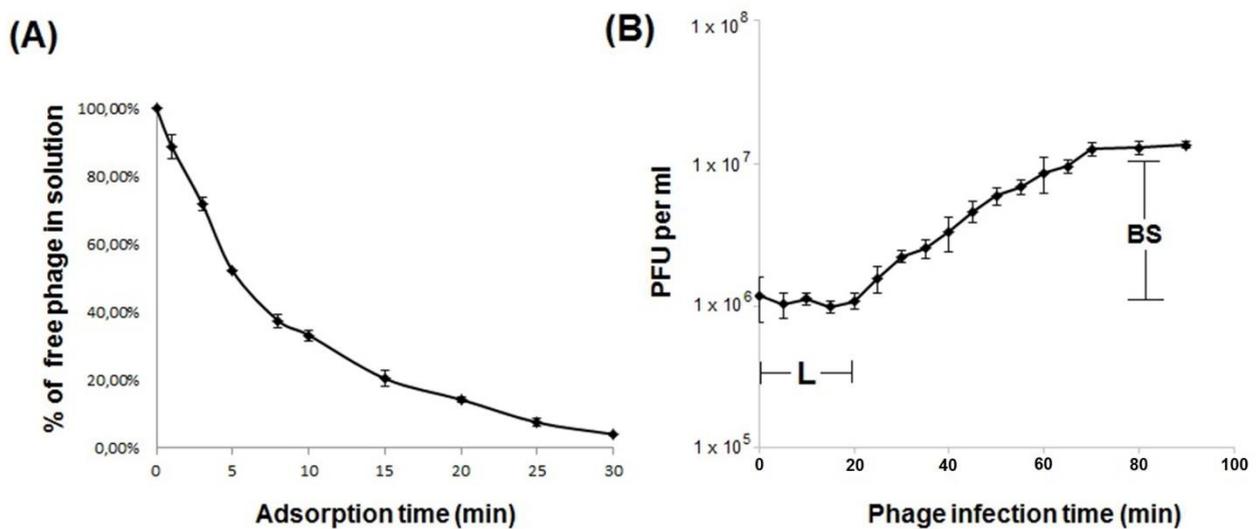


Рис. 19. Параметры инфекционного процесса бактериофага *Aristophanes*. Определение скорости адсорбции (А) и эксперимент по единичному циклу роста (В). L – длительность латентного периода, BS – выход фаговых частиц.

4.3. Организация геномов выделенных бактериофагов

Геномы бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК26, АРК37.1, АРК86, АРК127v и АРК128 были представлены линейной двуцепочечной молекулой ДНК в объеме от 40,966 до 42,013 п.н. с прямыми концевыми повторами от 339 до 428 п.н., с содержанием от 52 до 56 предсказанных генов, расположенных только в прямом направлении (Табл. 5). Концы геномов фланкированы прямыми концевыми повторами (DTR - direct terminal repeat) длиной от 339 до 428 п.н. Содержание G+C в геномах фагов составляло от 39,2% до 39,4%, что близко к G+C контенту генома

A. baumannii (около 39%) [189]. Генов, кодирующих тРНК, в геномах бактериофагов обнаружено не было.

Табл. 5. Характеристика геномов исследуемых бактериофагов *A. baumannii*, положение в геномах белков хвостового шипа

Название бактериофага	Длина генома (п.н.)	DTR длина (bp)	G+C (%)	Кол-во генов	Номер Genbank	Положение TSP в геноме (ID)
Aristophanes	43505	184	42.5	46	MT783706	Aristophanes_gp41 (QNO11465)
APK09	41477	409	39.2	56	MZ868724	APK09_gp48 (UAW09804)
APK14	41767	405	39.2	55	MK089780	ABPK14_gp49 (AYR04394)
APK16	41135	357	39.4	54	MZ868725	APK16_gp47 (UAW09859)
APK26	41097	345	39.3	54	MW34524 1	APK26_gp48 (QQO97001)
APK37.1	40966	339	39.2	56	MZ967493	APK37.1gp49 (UAW07728)
APK86	41297	383	39.2	56	MZ936314	APK86_gp49 (UAW09972)
APK127v	41380	422	39.2	53	ON210142	APK127v_gp47 (URQ05189)
APK128	42013	428	39.2	52	MW45916 3	APK128_gp45 (QVD48888)

Геном бактериофага *Aristophanes* значительно отличался от геномов остальных исследуемых фагов. Он также был представлен линейной двуцепочечной молекулой ДНК в объеме 43,505 п.н., однако прямые нуклеотидные повторы на концах генома были существенно короче и составляли всего 184 п.н. Содержание G+C в геноме также отличалось и составляло 42,5%. Организация генома

бактериофага совпала с типичной организацией генома фагов семейства *Autographiviridae* (рис. 20).



Рис. 20. Карта генома бактериофага *Aristophanes*. Сверху: краткая карта генома. Снизу: карта генома с указанием функции генов.

В геноме бактериофага *Aristophanes* было предсказано наличие 46 генов, расположенных только в прямом направлении. Генетический анализ показал, что большинство белков фага *Aristophanes*, включая белки репликации и морфогенеза, были родственны белкам других бактериофагов семейства *Autographiviridae*. Двенадцать генов были уникальными для бактериофага *Aristophanes*. Генов, кодирующих тРНК, в геноме обнаружено не было. Расположение промоторов в геноме аналогично модели фага T7 [190].

4.4. Сравнение геномов выделенных бактериофагов

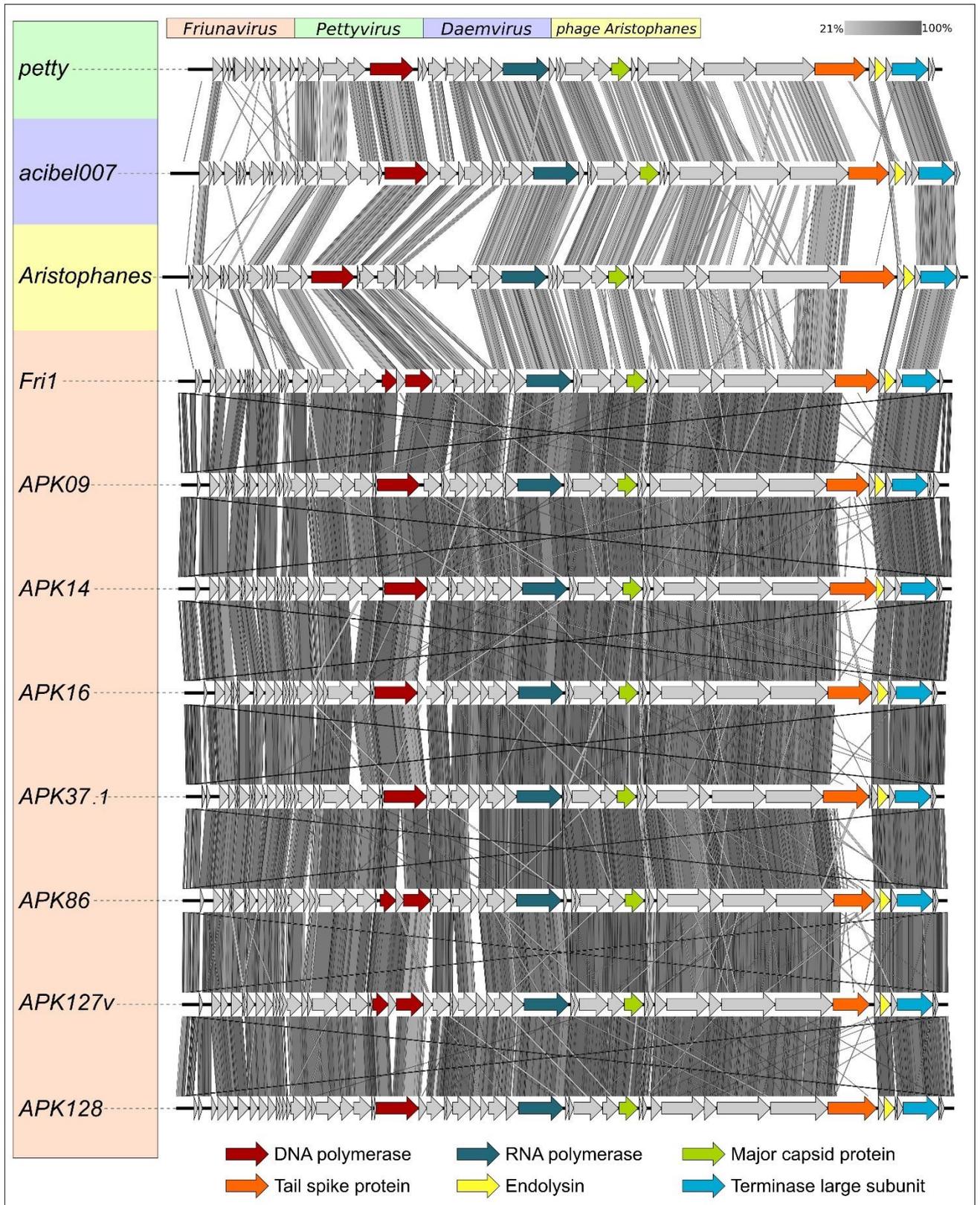


Рис. 21. Сравнение геномов 11 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, инфицирующих *A. baumannii*. Степень идентичности нуклеотидной последовательности обозначена интенсивностью линий серого цвета.

Организация геномов бактериофагов APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 идентична организации геномов других бактериофагов рода *Friunavirus* подсемейства *Beijerinckvirinae*. Методом сравнения полных геномов было установлено, что наиболее вариабельные участки располагались в центральной и 3'- частях генов, кодирующих белок хвостового шипа бактериофагов, который отвечает за узнавание и ферментативное взаимодействия с капсульными полисахаридами *A. baumannii*, а также в регионе ранних генов, необходимых для первых шагов фаговой инфекции. Гены ДНК-полимеразы в геноме бактериофагов APK127v и APK86 были разделены на две части, между которыми находился ген HNH - эндонуклеазы. Все фриунавирусы *A. baumannii*, для которых было проведено сравнение геномов, обладали одинаковым геном эндолизина, отличающимся от генов эндолизинов фагов Petty (род *Pettyvirus*) и Acibel007 (род *Daemvirus*), инфицирующих *A. baumannii*, а также фага Aristophanes.

Тепловая карта межгеномного сходства (рис. 22) показала, что бактериофаги APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 имеют высокую идентичность последовательностей геномов с геномами ранее известных бактериофагов рода *Friunavirus* подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*. Нуклеотидные последовательности геномов исследуемых бактериофагов на 82–87% совпадали с нуклеотидными последовательностями геномов других известных фриунавирусов, инфицирующих *A. baumannii*, что выше порогового значения для определения рода фага (70%).

Оценка средней идентичности нуклеотидов (ANI) генома бактериофага Aristophanes с геномами известных фагов семейства *Autographiviridae* показала наибольшее сходство с геномами ацинетобактерных фагов vB_AbaP_Acibel007 рода *Daemvirus* - 66.9% идентичности, и AbKT21phiIII рода *Friunavirus* - 66.4% идентичности, что ниже порогового значения 70% для отнесения бактериофага к какому-либо из известных на данный момент родов семейства *Autographiviridae*.

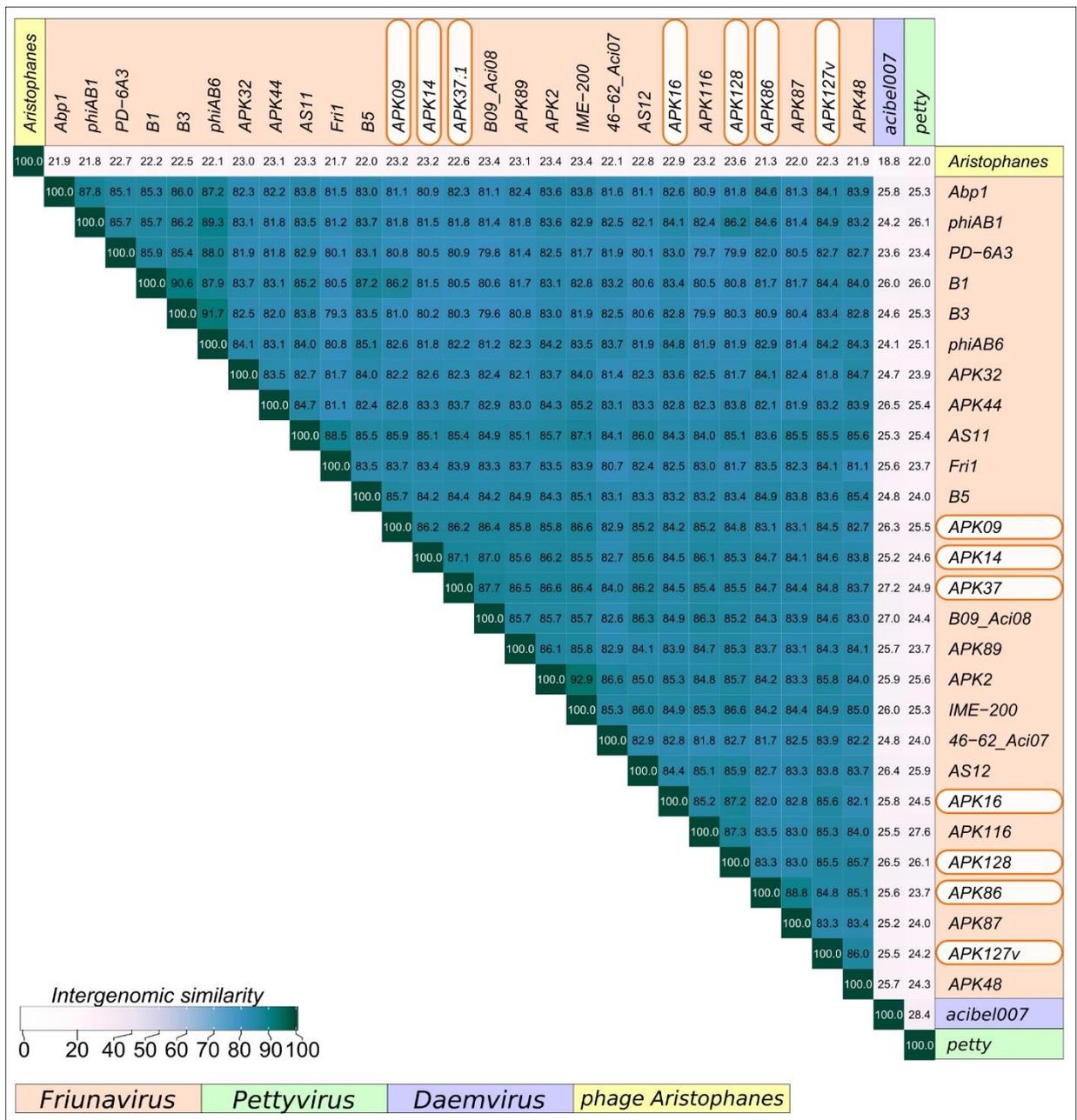


Рис. 22. Карта сходства нуклеотидных последовательностей геномов 30 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, инфицирующих *A. baumannii*, сгенерированная с помощью VIRIDIC.

4.5. Филогенетический анализ

Филогенетический анализ, основанный на сравнении аминокислотных последовательностей основного белка капсида, большой субъединицы терминазы, белка-коннектора хвоста и головы, а также ДНК- и РНК-полимераз, показал, что

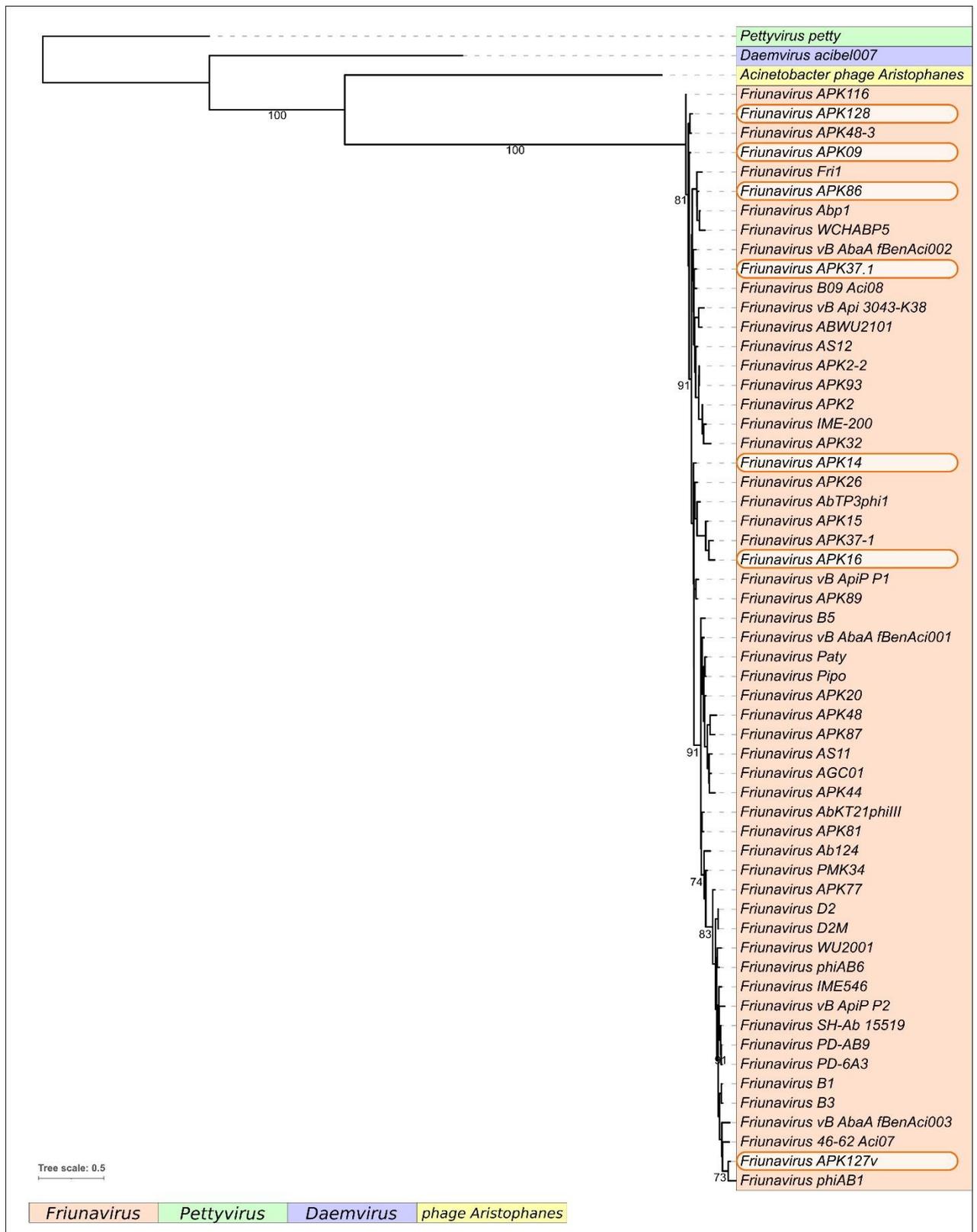


Рис. 23. Филогенетический анализ геномов 60 бактериофагов подсемейства *Beijerinckvirinae*, сгенерированный с помощью RAxML-NG. Аминокислотные последовательности белков *Pettyvirus petty* были использованы в качестве референса

исследуемые фаги, обладающие полисахарид-деполимеризующими ферментами, принадлежат к одной кладе с ранее известными бактериофагами рода *Friunavirus*, инфицирующими *A. baumannii*. Бактериофаг *Aristophanes* также является близкородственным (рис. 23).

Таким образом, анализ сходства нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов и филогенетический анализ консервативных белков показали, что выделенные в процессе работы бактериофаги АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 принадлежат к роду *Friunavirus* подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*. Полученные данные также свидетельствуют о том, что бактериофаг *Aristophanes* является первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae* семейства *Autographiviridae*.

4.6. Ферментативное взаимодействие рекомбинантных белков хвостовых шипов исследуемых бактериофагов с капсульными полисахаридами

Адсорбционный аппарат бактериофагов *Aristophanes*, АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 был представлен белками хвостового шипа *Aristophanes_gp41*, АРК09_gp48, АРК14_gp49, АРК16_gp47, АРК26_gp48, АРК37.1_gp49, АРК86_gp49, АРК127v_gp47 и АРК128_gp45, соответственно. Биоинформатический анализ с помощью BLAST и HHM установил модульную структуру данных белков: N-концевая часть белка представляет собой консервативный для белков хвостового шипа участок связывания с частицей фага, в то время как C-концевая часть белка проявляет ферментативную функцию и отвечает за взаимодействие со структурами оболочки бактериальной клетки, в данном случае – полисахаридами капсулы. C-концевые участки всех исследуемых белков хвостового шипа, за исключением C-концевого участка белка *Aristophanes_gp41*, были гомологичны фаговым деполимеразам. C-концевой участок белка хвостового шипа бактериофага *Aristophanes* по данным поиска HHpred структурно соответствовал белкам семейства GDSL-подобных липаз/ацилгидролаз *Neisseria meningitidis* с E-value=1.3e⁻⁷.

Рекомбинантные белки, представляющие собой белки хвостовых шипов с делецией консервативного N-концевого участка, были экспрессированы в *E. coli* и очищены с помощью металло-хелатной и ионообменной хроматографии. Препараты очищенных капсульных полисахаридов штаммов-хозяев исследуемых бактериофагов были обработаны рекомбинантными фаговыми ферментами, после чего структура полученных олигосахаридов была установлена с помощью метода ЯМР.

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* B05 была идентична структуре капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* MDR_TJ, капсульный тип K9 [100,191]. Повторяющееся звено (K unit) капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* B05 состоит из 4 моносахаридов: α -D-GalpNAcA (**A**), β -D-GlcpNAc (**C**), и два остатка 2-ацетамино-3,6-дидезокси-D-галактозы (FucNAc, **B** и **D**). Под воздействием деполимеразы бактериофага APK09 полисахарид разрушается на димер (**1**) и тример (**2**), как показано на рис. 24.

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5256 была идентична капсульному типу K14, описанному для штаммов *A. baumannii* O11 [192] и D46 [193]. Повторяющееся звено представлено пентасахаридом, состоящим из остатков α -D-GalpNAc (**A**), β -D-Galp (**B**), α -D-Galp (**C**), β -D-GalpNAc (**D**) и β -D-Glcp (**E**). Расщепление капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5256 под воздействием деполимеразы фага APK14 происходит по двум разным связям и приводит к образованию четырёх продуктов: двух мономеров (**3,4**) и двух димеров (**5,6**), как показано на рис. 25.

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* D4 была установлена ранее [166] и подтверждена ходе описываемой работы. Повторяющееся звено представлено трисахаридом, включающим остатки β -D-Galp (**A**), псевдоаминовой кислоты (**B**) и β -D-GalpNAc (**C**). Расщепление капсульного полисахарида под воздействием деполимеразы фага APK16 приводит к образованию мономера повторяющегося звена (**7**), как показано на рис. 26.



Рис. 24. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* B05 капсульного типа K9 и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK09

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1098 капсульного типа K26 была впервые установлена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено разветвленным гексаолигосахаридом (рис. 27).

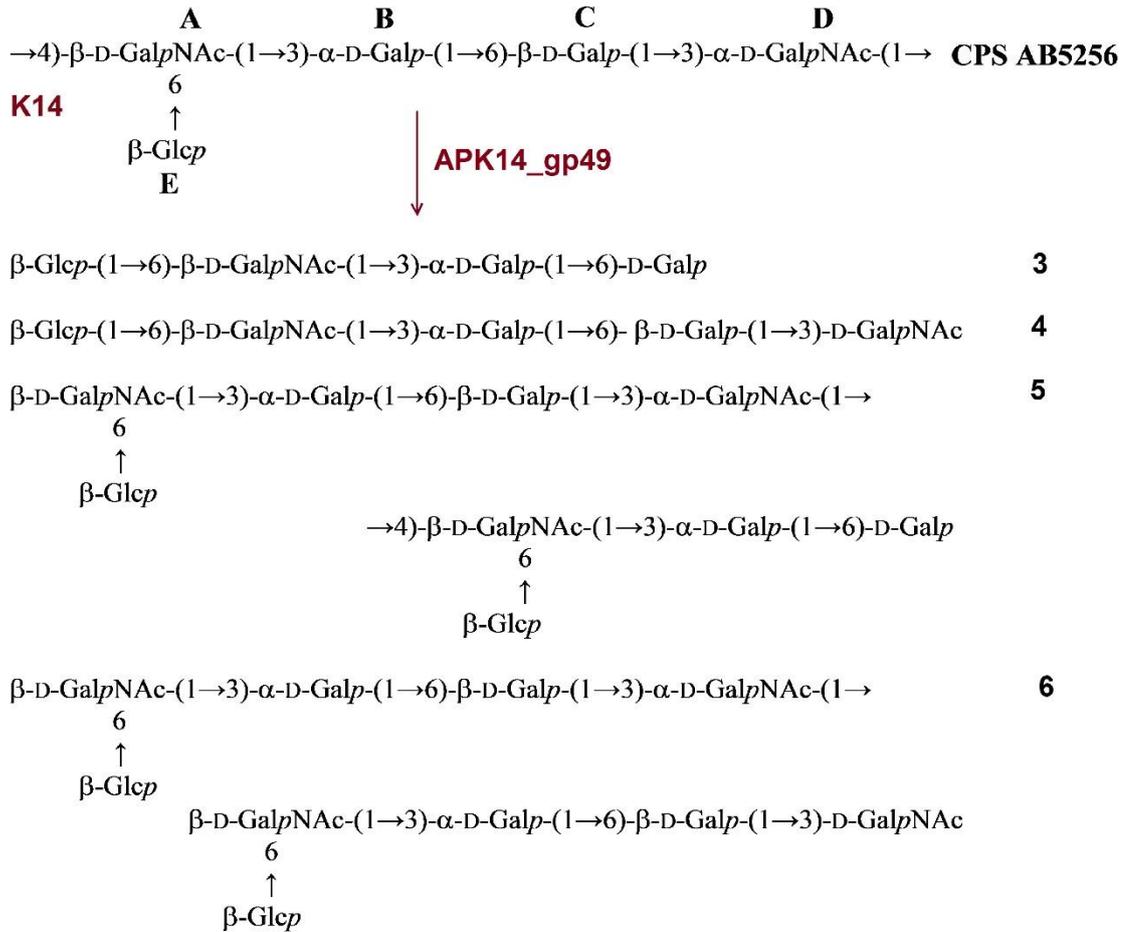


Рис. 25. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5256 капсульного типа K14 и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK14

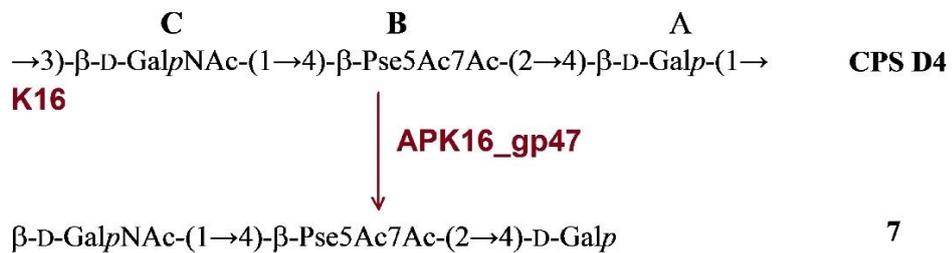


Рис. 26. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* D4 капсульного типа K16 и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK16

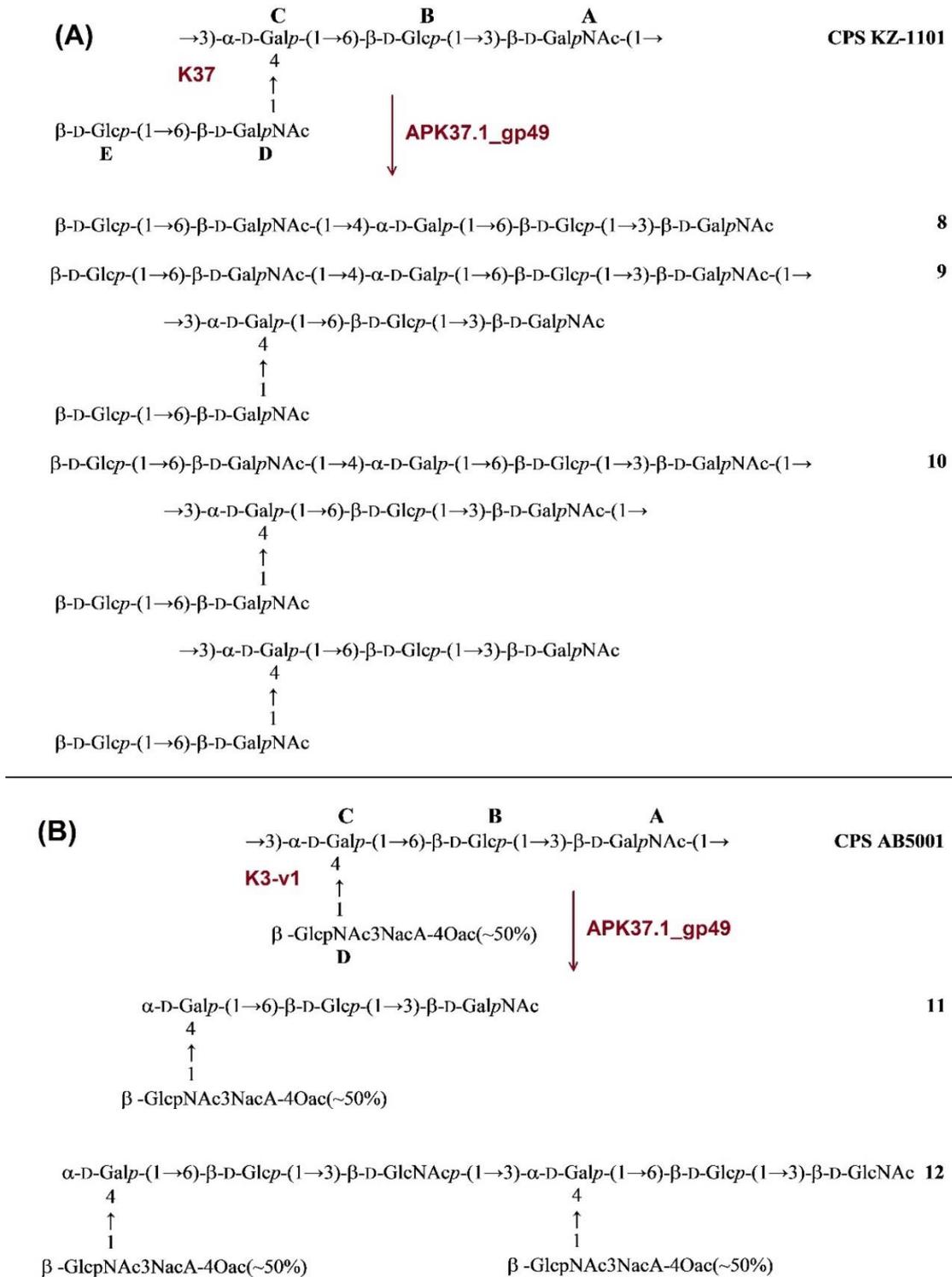


Рис. 28. (А) Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1101 капсульного типа К37 и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK37.1. (В) Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5001 капсульного типа К3 (дефектный) и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK37.1.

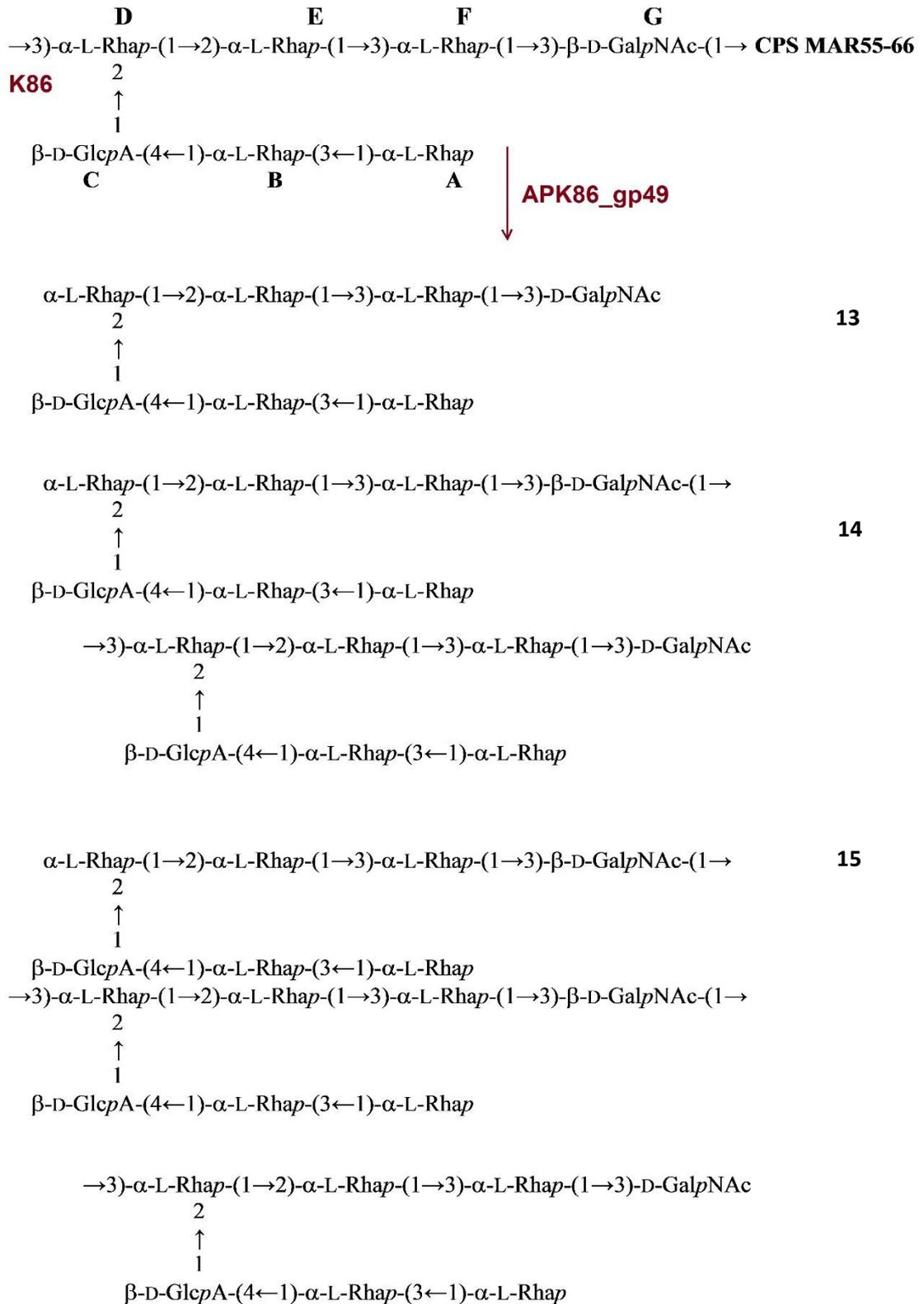


Рис. 29. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* MAR 55–66 капсульного типа K86 и продукты его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK86

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* AB5001 была охарактеризована как соответствующая дефектному капсульному типу КЗ. Повторяющееся звено представлено тетрасахаридом, включающим остатки β -D-GalpNAc (**A**), β -D-Glcp (**B**), α -D-Galp (**C**) и β -D-GlcpNAc3Ac (**D**). Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK37.1 приводит к образованию мономера (**11**) и димера (**12**) повторяющегося звена (рис. 28 B).

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* MAR-55-66 была установлена ранее [194] и подтверждена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено гептасахаридом, включающим остатки β -D-GlcpA (**C**), β -D-GalpNAc (**G**) и пять остатков L-рамнозы (L-Rha, **A**, **B**, **D**, **E**, **F**). Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK86 приводит к образованию мономера (**13**), димера (**14**) и тримера (**15**) повторяющегося звена (рис. 29).

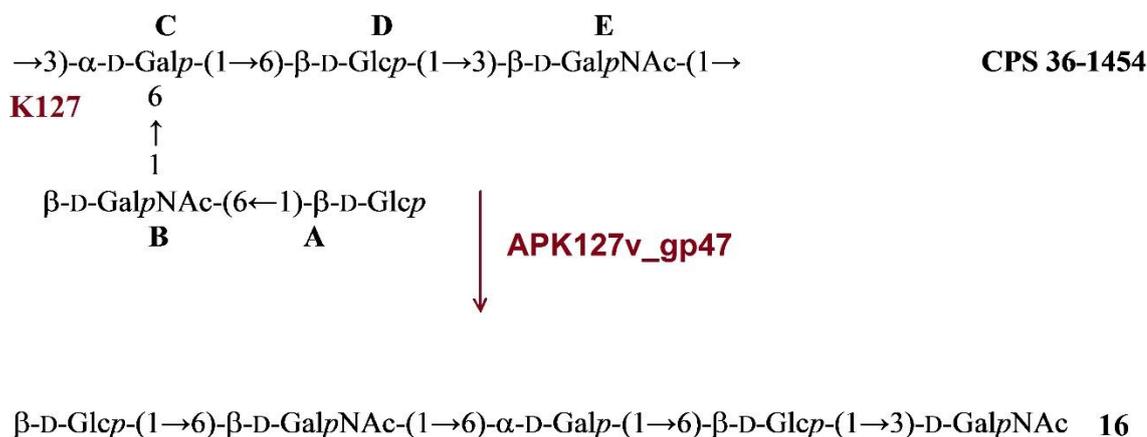


Рис. 30. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* 36-1454 капсульного типа K127 и продукт его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK127v

Повторяющееся звено капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* 36-1454 представлено пентасахаридом, включающим остатки β -D-Glcp (**A**, **D**), β -D-GalpNAc (**B**, **E**) и α -D-Galp (**C**). Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK127v приводит к образованию мономера повторяющегося звена (**16**), рис. 30.

Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1093 была установлена ранее [195] и подтверждена в ходе данной работы. Повторяющееся звено представлено разветвленным гексасахаридом, включающим остатки β -D-Glcp (**A**, **D**), α -D-Galp и β -D-GlcpNAc. Расщепление капсульного полисахарида деполимеразой фага APK128 приводит к образованию димера повторяющегося звена (**17**), рис. 31.

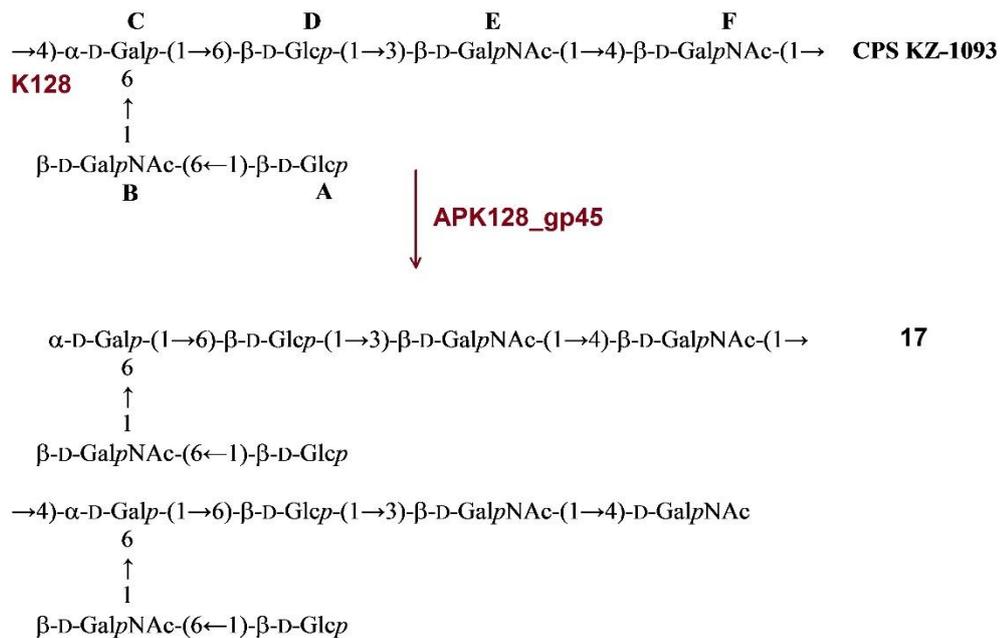


Рис. 31. Структура капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* KZ-1093 капсульного типа K128 и продукт его расщепления под воздействием деполимеразы бактериофага APK128

Принимая во внимание тот факт, что бактериофаг *Aristophanes* формирует бляшки без видимого гало на газоне штамма *A. baumannii* KZ-1098, а очищенный рекомбинантный белок, соответствующий С-концевой части белка хвостового шипа *Aristophanes_gp41*, образует слабые зоны просветления в отличие от фаговых деполимераз, мы пришли к выводу, что механизм ферментативного взаимодействия *Aristophanes_gp41* с капсульным полисахаридом штамма KZ-1098 не основан на полном расщеплении полисахарида на мономеры повторяющихся олигосахаридных единиц.

Полученные данные, таким образом, свидетельствуют о том, что белки хвостового шипа бактериофагов АРК09, АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 обладают полисахарид-деполимеразной активностью, в то время как белок хвостового бактериофага *Aristophanes* – деацетилазной. Перечень связей, гидролизующихся в составе капсульного полисахарида штамма *A. baumannii* в результате ферментативного воздействия белков хвостового шипа исследуемых бактериофагов, обозначен в табл. 6.

Табл. 6. Спектр связей, гидролизующихся белками хвостового шипа исследуемых бактериофагов

Фаг	Белок хвостового шипа	Штамм-хозяин	К-тип	Гидролизующая связь
<i>Aristophanes</i>	Aristophanes_gp41	KZ-1098	K26	6dTal-OAc
АРК09	АРК09_gp48	B05	K9	β -D-GlcpNAc-(1→3)- α -D-GalpNAc
АРК14	ABPK482_gp49	AB5256	K14	β -D-Galp-(1→3)- α -D-GalpNAc α -D-GalpNAc-(1→4)- β -D-GalpNAc
АРК16	АРК16_gp47	D4	K16	β -D-Galp-(1→3)- β -D-GalpNAc
АРК26	АРК26_gp48	KZ-1098	K26	β -D-GlcpNAc-(1→2)- α -Manp
АРК37.1	АРК37.1_gp49	KZ-1101	K37	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
		AB5001	K3-v1	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
АРК86	АРК86_gp49	MAR55-66	K86	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -L-Rhap
АРК127	АРК127v_gp47	36-1454	K127	β -D-GalpNAc-(1→3)- α -D-Galp
АРК128	АРК128_gp45	KZ-1093	K128	β -D-GalpNAc-(1→4)- α -D-Galp

5. Заключение

Разработка новых стратегий терапии инфекций, вызванных мультирезистентными бактериальными патогенами, является одной из приоритетных задач здравоохранения. Одним из возможных решений этой задачи может быть использование литических бактериофагов против проблемных возбудителей. Важной характеристикой фагов-кандидатов для включения в препараты для фаготерапии является диапазон штаммов-хозяев - способность фага проявлять литическую активность в отношении различных, клинически значимых штаммов патогена. Данная работа посвящена бактериофагам, инфицирующим *A. baumannii*. Принимая во внимание тот факт, что в большинстве известных случаев первичными рецепторами для фагов *A. baumannii* являются капсульные полисахариды, логично предположить, что рациональный подбор литических бактериофагов для включения в препараты для фаготерапии должен быть основан на понимании механизмов взаимодействия фаговых ферментов с экзополисахаридами, продуцируемыми штаммами *A. baumannii*. Высокое разнообразие и изменчивость структур капсульных полисахаридов штаммов *A. baumannii* подразумевают существование такого же разнообразия фаговых ферментов, способных специфически распознавать и расщеплять различные связи в структуре капсульных полисахаридов.

Таксономия бывшего подсемейства фагов *Autographivirinae* претерпела кардинальные изменения в 2019 году. Это подсемейство было возведено в ранг семейства, и в рамках нового семейства *Autographiviridae* был создан ряд новых подсемейств [196, р. 2018–2019]. По результатам данной работы было выделено из объектов окружающей среды (сточная и речная вода) 9 бактериофагов, инфицирующих штаммы *A. baumannii* девяти различных капсульных типов. По результатам биоинформатического анализа геномов все выделенные фаги принадлежали к семейству *Autographiviridae*, при этом восемь из них – к роду *Friunavirus*, и один - являлся первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*. Геномы бактериофагов АРК09,

АРК14, АРК16, АРК37.1, АРК26, АРК86, АРК127v и АРК128 демонстрировали высокую степень сходства с геномами ранее выделенных фриунавирусов, инфицирующих *A. baumannii*. Областью наибольшей вариабельности геномов был участок, кодирующий распознающие капсульные полисахариды домены белка хвостового шипа. Геном бактериофага *Aristophanes* несколько отличался по длине, количеству генов, длине концевых повторов, G+C – составу. Однако, принципиальная организация генома совпадала с таковой для остальных выделенных в ходе исследования фагов. Также существенным отличием бактериофага *Aristophanes* было наличие деацетилазной активности белка хвостового шипа, в то время как для остальных выделенных фагов наблюдалась классическая деполимеразная активность. Стратегия деацетилирования экзополисахаридов ранее была известна только для ряда бактериофагов, инфицирующих энтеробактерии [197]. Для фагов, инфицирующих *A. baumannii*, такой механизм взаимодействия с первичными рецепторами на поверхности бактериальной клетки был описан впервые.

Учитывая высокую специфичность выделенных бактериофагов рода *Friunavirus* по отношению к штаммам *A. baumannii* различных капсульных типов, а также их высокую литическую активность, можно сделать вывод о том, что исследуемые фаги могут быть включены в коллекцию вирусов для возможной фаготерапии.

6. Выводы

- 1) В ходе представленной работы была сформирована коллекция из девяти ранее не известных литических бактериофагов, специфически инфицирующих штаммы *A. baumannii* капсульных типов K09, K14, K16, K37/K3-v1, K26, K86, K127 и K128. Выделенные фаги, за исключением бактериофага *Aristophanes*, получили названия в соответствие с номером капсульного типа штамма-хозяина.
- 2) Изучены биологические и молекулярно-генетические характеристики выделенных бактериофагов. На основе биоинформатического анализа показано, что бактериофаги APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 являются представителями рода *Friunavirus*, а фаг *Aristophanes* - первым представителем ранее неопisanного рода вирусов внутри подсемейства *Beijerinckvirinae*.
- 3) Установлен механизм работы взаимодействующих с капсульными полисахаридами ферментов выделенных бактериофагов. Демполимеразы бактериофагов APK09, APK14, APK16, APK37.1, APK26, APK86, APK127v и APK128 расщепляют O-гликозидные связи капсульных полисахаридов по гидролитическому пути, то есть являются специфическими гликозидазами класса гидролаз.
- 4) Показано, что бактериофаг *Aristophanes* – первый и, на сегодняшний день, единственный представитель среди описанных фагов *A. baumannii*, в геноме которого закодирована структурная деацетилаза, ответственная за O-деацетилирование одного из остатков сахара капсульного полисахарида K26.

Список литературы:

1. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed [Electronic resource]. URL: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed: 26.02.2023).
2. Shek E.A. et al. Antimicrobial resistance, carbapenemase production, and genotypes of nosocomial *Acinetobacter* spp. isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016" // *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2019. Vol. 21, № 2. P. 171–180.
3. Lin M.-F., Lan C.-Y. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside // *World Journal of Clinical Cases*, 2014. Vol. 2, № 12. P. 787–814.
4. Тапальский Д.В., Бонда Н.А. *Acinetobacter baumannii*: распространенность, спектр и динамика антибиотикорезистентности, чувствительность к комбинациям антибиотиков. Журнал ГрГМУ, 2018. Vol. Т. 16, № № 3. P. С. 286-291.
5. Dexter C. et al. Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis // *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2015. Vol. 13, № 5. P. 567–573.
6. Чеботарь И.В. и др. *Acinetobacter*: микробиологические, патогенетические и резистентные свойства // *Вестник Российской академии медицинских наук*, 2014. Vol. 69, № 9–10. P. 39–50.
7. Lee C.-R. et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options // *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017. Vol. 0, № MAR. P. 55.
8. Bergogne-Bérézin E., Friedman H., Bendinelli M. *Acinetobacter*: Biology and Pathogenesis. 2008. Vol. 100, № 2. 220 p.
9. Doughari H.J. et al. The Ecology, Biology and Pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview // *Microbes and Environments*, 2011. Vol. 26, № 2. P. 101–112.
10. Public Health Image Library (PHIL) [Electronic resource]. URL: <https://phil.cdc.gov/> (accessed: 09.03.2023).

11. Zanaroli G. et al. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms // *Microbial Cell Factories*, 2010. Vol. 9, № 1. P. 1–13.
12. Peleg A.Y., Seifert H., Paterson D.L. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen // *Clinical Microbiology Reviews*, 2008. Vol. 21, № 3. P. 538.
13. Seifert H. et al. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods // *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. Vol. 35, № 11. P. 2819–2825.
14. Dijkshoorn L. et al. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals // *Clinical Microbiology and Infection*, 2005. Vol. 11, № 4. P. 329–332.
15. Wang X. et al. Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* ZW85-1 // *Genome Announcements*, 2014. Vol. 2, № 1. P. e01083-13.
16. Iacono M. et al. Whole-Genome Pyrosequencing of an Epidemic Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain Belonging to the European Clone II Group // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008. Vol. 52, № 7. P. 2616.
17. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2019 [Electronic resource]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2019> (accessed: 26.02.2023).
18. Moffatt J.H., Harper M., Boyce J.D. Mechanisms of Polymyxin Resistance // *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019. Vol. 1145. P. 55–71.
19. Singh J.K., Adams F.G., Brown M.H. Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii* // *Frontiers in Microbiology*. 2019. Vol. 9.
20. Cahill S. M., Hall R. M., Kenyon J. J. An update to the database for *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide locus typing extends the extensive and diverse repertoire of genes found at and outside the K locus // *bioRxiv*. – 2022. – C. 2022.05.19.492579.

21. Choi A.H.K. et al. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly-beta-1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation // J Bacteriol, 2009. Vol. 191, № 19. P. 5953–5963.
22. NamesforLife, LLC - A semantic services company [Electronic resource]. URL: <https://www.namesforlife.com/> (accessed: 26.02.2023).
23. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ | Microbiology Society [Electronic resource]. URL: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.004332#tab2> (accessed: 26.02.2023).
24. Alexandr Nemeč: Home page [Electronic resource]. URL: <http://apps.szu.cz/anemec/anemec.htm> (accessed: 27.02.2023).
25. Classification (n.d.). [Electronic resource]. URL: <http://apps.szu.cz/anemec/Classification.pdf> (accessed February 27, 2023).
26. Vijayakumar S., Biswas I., Veeraraghavan B. Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: an update // Future science OA. – 2019. – Т. 5. – №. 7. – С. FSO395.
27. Genome List - Genome - NCBI [Electronic resource]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/#!/prokaryotes/403/> (accessed: 26.02.2023).
28. Чеботарь И.В. et al. Генотипы и носительство генов β -лактамаз у карбапенеморезистентных штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в г. Москве: 11–12 // Антибиотики и Химиотерапия. 2017. Vol. 62, № 11–12. P. 29–34.
29. Bartual S.G. et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* // Journal of Clinical Microbiology. 2005. Vol. 43, № 9. P. 4382–4390.
30. Diancourt L. et al. The Population Structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding Multiresistant Clones from an Ancestral Susceptible Genetic Pool // PLOS ONE, 2010. Vol. 5, № 4. P. e10034.

31. Hamidian M., Nigro S.J., Hall R.M. Problems with the Oxford Multilocus Sequence Typing Scheme for *Acinetobacter baumannii*: Do Sequence Type 92 (ST92) and ST109 Exist? // J Clin Microbiol. 2017. Vol. 55, № 7. P. 2287–2289.
32. Gaiarsa S. et al. Comparative Analysis of the Two *Acinetobacter baumannii* Multilocus Sequence Typing (MLST) Schemes // Frontiers in Microbiology, 2019. – T. 10. – C. 930.
33. EUCAST: Expert rules and intrinsic resistance [Electronic resource]. URL: https://www.eucast.org/expert_rules_and_intrinsic_resistance (accessed: 21.02.2023).
34. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Electronic resource]. URL: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed: 20.07.2021).
35. AMRmap [Electronic resource]. URL: <https://amrmap.ru/> (accessed: 26.02.2023).
36. Kuzmenkov A.Y. et al. AMRmap: An Interactive Web Platform for Analysis of Antimicrobial Resistance Surveillance Data in Russia // Frontiers in Microbiology, 2021. Vol. 12.
37. Zarrilli R. et al. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities // J Infect Dev Ctries. 2009. Vol. 3, № 5. P. 335–341.
38. Meletis G., Skoura L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to Mcr Genes // Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2018. Vol. 13, № 3. P. 198–206.
39. Da Silva G.J., Domingues S. Interplay between Colistin Resistance, Virulence and Fitness in *Acinetobacter baumannii* // Antibiotics (Basel). 2017. Vol. 6, № 4. P. 28.
40. Ma F. et al. Identification of a Novel Plasmid Carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* Strain in China // Antimicrob Agents Chemother. 2019. Vol. 63, № 6. P. e00133-19.
41. Zusman O. et al. Polymyxin monotherapy or in combination against carbapenem-resistant bacteria: systematic review and meta-analysis // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford Academic, 2017. Vol. 72, № 1. P. 29–39.

42. Eljaaly K. et al. Plazomicin: A Novel Aminoglycoside for the Treatment of Resistant Gram-Negative Bacterial Infections // *Drugs*. 2019. Vol. 79, № 3. P. 243–269.
43. Harding C.M., Hennon S.W., Feldman M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence // *Nature Reviews Microbiology*, 2017. Vol. 16, № 2. P. 91–102.
44. Choi C.H. et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity // *Cellular Microbiology*, Ltd, 2008. Vol. 10, № 2. P. 309–319.
45. Choi C.H. et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells // *BMC Microbiol.* 2008. Vol. 8. P. 216.
46. Smani Y. et al. Role of OmpA in the Multidrug Resistance Phenotype of *Acinetobacter baumannii* // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014. Vol. 58, № 3. P. 1806–1808.
47. McConnell M.J., Actis L., Pachón J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models // *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford Academic, 2013. Vol. 37, № 2. P. 130–155.48.
49. Smani Y., Dominguez-Herrera J., Pachón J. Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii* // *J Infect Dis.* 2013. Vol. 208, № 10. P. 1561–1570.
50. Wong D. et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges // *Clinical Microbiology Reviews*, 2017. Vol. 30, № 1. P. 409–447.
51. Jacobs A.C. et al. Characterization of the *Acinetobacter baumannii* growth phase-dependent and serum responsive transcriptomes // *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012. Vol. 64, № 3. P. 403–412.
52. Tipton K.A., Rather P.N. An ompR-envZ Two-Component System Ortholog Regulates Phase Variation, Osmotic Tolerance, Motility, and Virulence in *Acinetobacter baumannii* Strain AB5075 // *Journal of Bacteriology*, 2017. Vol. 199, № 3.

53. Eijkelkamp B.A. et al. H-NS Plays a Role in Expression of *Acinetobacter baumannii* Virulence Features // *Infect Immun*. 2013. Vol. 81, № 7. P. 2574–2583.
54. Pérez-Varela M. et al. Mutations in the β -subunit of the RNA polymerase impair the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* // *Infection and Immunity*, 2017. Vol. 85, № 8.
55. Espinal P., Martí S., Vila J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces // *Journal of Hospital Infection*. 2012. Vol. 80, № 1. P. 56–60.
56. Boll J.M. et al. Reinforcing lipid acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival // *mBio*. American Society for Microbiology, 2015. Vol. 6, № 3. P. 1–11.
57. Aranda J. et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence // *Journal of Bacteriology*. 2011. Vol. 193, № 15. P. 3740–3747.
58. Wright M.S. et al. Assessment of Insertion Sequence Mobilization as an Adaptive Response to Oxidative Stress in *Acinetobacter baumannii* Using IS-seq // *J Bacteriol*. 2017. Vol. 199, № 9. P. e00833-16.
59. Hassan K.A. et al. Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. Vol. 110, № 50. P. 20254–20259.
60. Asplund M.B. et al. Alcohol impairs J774.16 macrophage-like cell antimicrobial functions in *Acinetobacter baumannii* infection // *Virulence*. 2013. Vol. 4, № 6. P. 467–472.
61. Thompson M.G. et al. Validation of a novel murine wound model of *Acinetobacter baumannii* infection // *Antimicrob Agents Chemother*. 2014. Vol. 58, № 3. P. 1332–1342.
62. Tomaras A.P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system // *Microbiology (Reading)*. 2003. Vol. 149, № Pt 12. P. 3473–3484.

63. de Breij A. et al. CsuA/BABCDE-dependent pili are not involved in the adherence of *Acinetobacter baumannii* ATCC19606T to human airway epithelial cells and their inflammatory response // *Research in Microbiology*. 2009. Vol. 160, № 3. P. 213–218.
64. Moon K.H., Weber B.S., Feldman M.F. Subinhibitory Concentrations of Trimethoprim and Sulfamethoxazole Prevent Biofilm Formation by *Acinetobacter baumannii* through Inhibition of Csu Pilus Expression // *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. Vol. 61, № 9. P. e00778-17.
65. Eijkelkamp B.A. et al. Comparative analysis of surface-exposed virulence factors of *Acinetobacter baumannii* // *BMC Genomics*. 2014. Vol. 15, № 1. P. 1020.
66. Loehfelm T.W., Luke N.R., Campagnari A.A. Identification and Characterization of an *Acinetobacter baumannii* Biofilm-Associated Protein // *Journal of Bacteriology*, 2008. Vol. 190, № 3. P. 1036.
67. de Gregorio E. et al. Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter* // *BMC Genomics*, 2015. Vol. 16, № 1. P. 1–14.
68. Gaddy J.A. et al. Role of Acinetobactin-Mediated Iron Acquisition Functions in the Interaction of *Acinetobacter baumannii* Strain ATCC 19606T with Human Lung Epithelial Cells, *Galleria mellonella* Caterpillars, and Mice // *Infect Immun*. 2012. Vol. 80, № 3. P. 1015–1024.
69. Proschak A. et al. Structure and Biosynthesis of Fimsbactins A–F, Siderophores from *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi* // *ChemBioChem*, 2013. Vol. 14, № 5. P. 633–638.
70. Penwell W.F. et al. Discovery and Characterization of New Hydroxamate Siderophores, Baumannoferrin A and B, produced by *Acinetobacter baumannii* // *Chembiochem*. 2015. Vol. 16, № 13. P. 1896–1904.
71. Hood M.I. et al. Identification of an *Acinetobacter baumannii* zinc acquisition system that facilitates resistance to calprotectin-mediated zinc sequestration // *PLoS Pathog*. 2012. Vol. 8, № 12. P. e1003068.

72. Harding C.M. et al. Pathogenic *Acinetobacter* species have a functional type I secretion system and contact-dependent inhibition systems // *Journal of Biological Chemistry*. 2017. Vol. 292, № 22. P. 9075–9087.
73. Harding C.M. et al. Medically Relevant *Acinetobacter* Species Require a Type II Secretion System and Specific Membrane-Associated Chaperones for the Export of Multiple Substrates and Full Virulence // *PLOS Pathogens*. Public Library of Science, 2016. Vol. 12, № 1. P. e1005391.
74. Johnson T.L. et al. *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and In Vivo Fitness // *J Bacteriol*. 2015. Vol. 198, № 4. P. 711–719.
75. Liu C.-C. et al. Prevalence and mapping of a plasmid encoding a type IV secretion system in *Acinetobacter baumannii* // *Genomics*. 2014. Vol. 104, № 3. P. 215–223.
76. Bentancor L.V. et al. Identification of Ata, a Multifunctional Trimeric Autotransporter of *Acinetobacter baumannii* // *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology, 2012. Vol. 194, № 15. P. 3950–3960.
77. Weber B.S. et al. Genomic and Functional Analysis of the Type VI Secretion System in *Acinetobacter* // *PLOS ONE*. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 1. P. e55142.
78. Carruthers M.D. et al. *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition // *PLOS ONE*, 2013. Vol. 8, № 3. P. e59388.
79. Bentancor L.V. et al. Evaluation of the Trimeric Autotransporter Ata as a Vaccine Candidate against *Acinetobacter baumannii* Infections // *Infect Immun*. 2012. Vol. 80, № 10. P. 3381–3388.
80. Weber B.S. et al. A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii* // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. Vol. 112, № 30. P. 9442–9447.
81. Kinsella R.L. et al. Defining the interaction of the protease CpaA with its type II secretion chaperone CpaB and its contribution to virulence in *Acinetobacter* species // *J Biol Chem*. 2017. Vol. 292, № 48. P. 19628–19638.

82. Tilley D. et al. CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation // FEMS Microbiology Letters. 2014. Vol. 356, № 1. P. 53–61.
83. Russo T.A. et al. The K1 Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Strain 307-0294 Is a Major Virulence Factor // Infection and Immunity. 2010. Vol. 78, № 9. P. 3993.
84. Lees-Miller R.G. et al. A common pathway for O-linked protein-glycosylation and synthesis of capsule in *Acinetobacter baumannii* // Molecular Microbiology. 2013. Vol. 89, № 5. P. 816–830.
85. Iwashkiw J.A. et al. Identification of a General O-linked Protein Glycosylation System in *Acinetobacter baumannii* and Its Role in Virulence and Biofilm Formation // PLOS Pathogens. Public Library of Science, 2012. Vol. 8, № 6. P. e1002758.
86. Brade H., Galanos C. Biological activities of the lipopolysaccharide and lipid A from *Acinetobacter calcoaceticus* // J Med Microbiol. J Med Microbiol, 1983. Vol. 16, № 2. P. 211–214.
87. King L.B., Pangburn M.K., McDaniel L.S. Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation // J Infect Dis. 2013. Vol. 207, № 7. P. 1128–1134.
88. Kenyon J.J., Hall R.M. Variation in the Complex Carbohydrate Biosynthesis Loci of *Acinetobacter baumannii* Genomes // PLOS ONE. 2013. Vol. 8, № 4. P. e62160.
89. Kenyon J.J. et al. K17 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* isolate G7 contains an amide of 2-acetamido-2-deoxy-d-galacturonic acid with d-alanine // International Journal of Biological Macromolecules. 2020. Vol. 144. P. 857–862.
90. Kasimova A.A. et al. Structure of the K82 Capsular Polysaccharide from *Acinetobacter baumannii* LUH5534 Containing a d-Galactose 4,6-Pyruvic Acid Acetal // Biochemistry (Moscow). 2018. Vol. 83, № 7. P. 831–835.
91. Arbatsky N.P. et al. K units of the K8 and K54 capsular polysaccharides produced by *Acinetobacter baumannii* BAL 097 and RCH52 have the same structure but

- contain different di-N-acyl derivatives of legionaminic acid and are linked differently // Carbohydrate Research. 2019. Vol. 483. P. 107745.
92. Cahill S. et al. Elucidation of the K32 Capsular Polysaccharide Structure and Characterization of the KL32 Gene Cluster of *Acinetobacter baumannii* LUH5549. // Biochemistry. Biokhimiia. 2020. Vol. 85, № 2. P. 241–247.
93. Kenyon J. J., Hall R. M. Updated analysis of the surface carbohydrate gene clusters in a diverse panel of *Acinetobacter baumannii* isolates // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2022. – T. 66. – №. 1. – C. e01807-21.
94. Wyres K.L. et al. Identification of *Acinetobacter baumannii* loci for capsular polysaccharide (KL) and lipooligosaccharide outer core (OCL) synthesis in genome assemblies using curated reference databases compatible with Kaptive // Microb Genom. 2020. Vol. 6, № 3. P. e000339.
95. Kasimova A.A. et al. *Acinetobacter baumannii* K106 and K112: Two Structurally and Genetically Related 6-Deoxy-1-talose-Containing Capsular Polysaccharides: 11 // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22, № 11. P. 5641.
96. Kenyon J.J. et al. *Acinetobacter baumannii* K11 and K83 capsular polysaccharides have the same 6-deoxy-1-talose-containing pentasaccharide K units but different linkages between the K units // International Journal of Biological Macromolecules. 2017. Vol. 103. P. 648–655.
97. Kenyon J.J. et al. 5,7-Di-N-acetyl-8-epiacinetaminic acid: A new non-2-ulosonic acid found in the K73 capsule produced by an *Acinetobacter baumannii* isolate from Singapore // Scientific Reports. 2017. Vol. 7, № 1. P. 11357.
98. Kenyon J.J. et al. 5,7-di-N-acetyl-acinetaminic acid: A novel non-2-ulosonic acid found in the capsule of an *Acinetobacter baumannii* isolate // Glycobiology. 2015. Vol. 25, № 6. P. 644–654.
99. Kenyon J.J. et al. *Acinetobacter baumannii* K13 and K73 capsular polysaccharides differ only in K-unit side branches of novel non-2-ulosonic acids: di-N-acetylated forms of either acinetaminic acid or 8-epiacinetaminic acid // Carbohydr Res. 2017. Vol. 452. P. 149–155.

100. Kenyon J.J., Hall R.M. Variation in the complex carbohydrate biosynthesis loci of *Acinetobacter baumannii* genomes // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 4. P. e62160.
101. Patro L.P.P., Rathinavelan T. Targeting the Sugary Armor of Klebsiella Species // Frontiers in cellular and infection microbiology. 2019. Vol. 9. P. 367.
102. Tickner J. et al. The Wzi outer membrane protein mediates assembly of a tight capsular polysaccharide layer on the *Acinetobacter baumannii* cell surface // Scientific Reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 21741.
103. Kenyon J. J. et al. The KL24 gene cluster and a genomic island encoding a Wzy polymerase contribute genes needed for synthesis of the K24 capsular polysaccharide by the multiply antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* isolate RCH51 // Microbiology. – 2017. – T. 163. – №. 3. – C. 355-363.
104. Kenyon J. J. et al. K19 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* is produced via a Wzy polymerase encoded in a small genomic island rather than the KL19 capsule gene cluster // Microbiology. – 2016. – T. 162. – №. 8. – C. 1479-1489.
105. Arbatsky N.P. et al. Involvement of a Phage-Encoded Wzy Protein in the Polymerization of K127 Units To Form the Capsular Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* Isolate 36-1454 // Microbiology Spectrum. 2022. Vol. 10, № 3. P. e0150321.
106. Nielsen T.B. et al. Monoclonal Antibody Protects Against *Acinetobacter baumannii* Infection by Enhancing Bacterial Clearance and Evading Sepsis // The Journal of Infectious Diseases. Oxford Academic, 2017. Vol. 216, № 4. P. 489–501.
107. Talyansky Y. et al. Capsule carbohydrate structure determines virulence in *Acinetobacter baumannii* // PLOS Pathogens. Public Library of Science, 2021. Vol. 17, № 2. P. e1009291.
108. Weber B.S., Harding C.M., Feldman M.F. Pathogenic *Acinetobacter*: From the cell surface to infinity and beyond // Journal of Bacteriology. American Society for Microbiology, 2016. Vol. 198, № 6. P. 880–887.
109. Fregolino E. et al. Identification and structural determination of the capsular polysaccharides from two *Acinetobacter baumannii* clinical isolates, MG1 and SMAL // Carbohydr Res. 2011. Vol. 346, № 7. P. 973–977.

110. Vinogradov E. V. et al. The structure of the carbohydrate backbone of the lipopolysaccharide from *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606 // *European journal of biochemistry*. – 2002. – Т. 269. – №. 2. – С. 422-430.
111. Fokine A., Rossmann M.G. Molecular architecture of tailed double-stranded DNA phages // *Bacteriophage*. 2014. Vol. 4, № 1. P. e28281.
112. Диссертация на тему «Капсулоспецифичные бактериофаги и их полисахарид-деградирующие ферменты, активные в отношении гипермукоидных штаммов *Klebsiella pneumoniae*», [Electronic resource]. URL: <https://www.dissercat.com/content/kapsulospetsifichnye-bakteriofagi-i-ikh-polisakharid-degradiruyushchie-fermenty-aktivnye-v> (accessed: 26.08.2021).
113. С ICTV [Electronic resource]. URL: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (accessed: 17.08.2021).
114. Turner D. et al. Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee // *Arch Virol*. 2023. Vol. 168, № 2. P. 74.
115. Turner D. et al. Comparative Analysis of 37 *Acinetobacter* Bacteriophages // *Viruses* 2018, Vol. 10, Page 5.
116. Renda B.A. et al. Emergence of a Competence-Reducing Filamentous Phage from the Genome of *Acinetobacter baylyi* ADP1 // *Journal of Bacteriology*. 2016. Vol. 198, № 23. P. 3209–3219.
117. Touchon M. et al. The Genomic Diversification of the Whole *Acinetobacter* Genus: Origins, Mechanisms, and Consequences // *Genome Biology and Evolution*. 2014. Vol. 6, № 10. P. 2866–2882.
118. Lin N.-T. et al. Isolation and characterization of ϕ AB2: a novel bacteriophage of *Acinetobacter baumannii* // *Research in Microbiology*. 2010. Vol. 161, № 4. P. 308–314.
119. Ackermann H.W., Brochu G., Emadi Konjin H.P. Classification of *Acinetobacter* phages // *Arch Virol*. 1994. Vol. 135, № 3–4. P. 345–354.
120. Oliveira H. et al. Genomic Diversity of Bacteriophages Infecting the Genus *Acinetobacter* // *Viruses*. 2022. Vol. 14, № 2. P. 181.

121. Popova A. V. et al. Characterization of myophage AM24 infecting *Acinetobacter baumannii* of the K9 capsular type // *Archives of virology*. – 2019. – T. 164. – C. 1493-1497.
122. Oliveira H. et al. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains // *Environmental microbiology*. – 2017. – T. 19. – №. 12. – C. 5060-5077.
123. Popova A. v. et al. Novel Fri1-like Viruses Infecting *Acinetobacter baumannii*—vB_AbaP_AS11 and vB_AbaP_AS12—Characterization, Comparative Genomic Analysis, and Host-Recognition Strategy. // *Viruses* 2017. Vol. 9, № 7. P. 188.
124. Lee I.-M. et al. Structural basis for fragmenting the exopolysaccharide of *Acinetobacter baumannii* by bacteriophage Φ AB6 tailspike protein // *Scientific Reports* 2017 7:1. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–13.
125. Popova A. v. et al. Specific Interaction of Novel *Friunavirus* Phages Encoding Tailspike Depolymerases with Corresponding *Acinetobacter baumannii* Capsular Types // *Journal of Virology*. 2021. Vol. 95, № 5.
126. Merabishvili M. et al. Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii* // *PloS one*. – 2014. – T. 9. – №. 8. – C. e104853.
127. Knirel Y.A. et al. Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* Capsular Polysaccharide Cleavage by Phage Depolymerases // *Biochemistry (Mosc)*. 2020. Vol. 85, № 5. P. 567–574.
128. Lai M.-J. et al. The Tail Associated Protein of *Acinetobacter baumannii* Phage Φ AB6 Is the Host Specificity Determinant Possessing Exopolysaccharide Depolymerase Activity // *PLOS ONE*. 2016. Vol. 11, № 4. P. e0153361.
129. Mumm I. P. et al. Complete genome of *Acinetobacter baumannii* podophage Petty // *Genome announcements*. – 2013. – T. 1. – №. 6. – C. e00850-13.
130. Lam M. M. C. et al. Kaptive 2.0: updated capsule and lipopolysaccharide locus typing for the *Klebsiella pneumoniae* species complex // *Microbial genomics*. – 2022. – T. 8. – №. 3.

131. Farmer N.G. et al. Complete Genome of *Acinetobacter baumannii* N4-Like Podophage Presley // Genome Announc. 2013. Vol. 1, № 6. P. e00852-13.
132. Wittmann J. et al. From Orphan Phage to a Proposed New Family—The Diversity of N4-Like Viruses: 10 // Antibiotics. 2020. Vol. 9, № 10. P. 663.
133. Popova A. v. et al. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii* // FEMS Microbiology Letters. 2012. Vol. 332, № 1. P. 40–46.
134. Yang H. et al. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage AB1 of *Acinetobacter baumannii* // BMC Microbiol. 2010. Vol. 10. P. 131.
135. Peng F. et al. Characterization, sequencing and comparative genomic analysis of vB_AbaM-IME-AB2, a novel lytic bacteriophage that infects multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // BMC Microbiol. 2014. Vol. 14. P. 181.
136. Li P. et al. Bioinformatic analysis of the *Acinetobacter baumannii* phage AB1 genome // Gene. 2012. Vol. 507, № 2. P. 125–134.
137. Popova A.V. et al. Complete Genome Sequence of *Acinetobacter baumannii* Phage BS46 // Microbiology Resource Announcements. American Society for Microbiology, 2020. Vol. 9, № 22. P. e00398-20.
138. Shchurova A. S. et al. Novel *Acinetobacter baumannii* Myovirus TaPaz Encoding Two Tailspike Depolymerases: Characterization and Host-Recognition Strategy // Viruses. – 2021. – T. 13. – №. 6. – C. 978.
139. Zhang L. et al. Therapeutic evaluation of the *Acinetobacter baumannii* phage Phab24 for clinical use // Virus Research. 2022. Vol. 320. P. 198889.
140. Loh B. et al. Complete genome sequence of the lytic bacteriophage Phab24, which infects clinical strains of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* // Microbiology Resource Announcements. – 2021. – T. 10. – №. 40. – C. e00669-21.
141. Wang X. et al. Colistin-phage combinations decrease antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* via changes in envelope architecture // Emerging microbes & infections. – 2021. – T. 10. – №. 1. – C. 2205-2219.

142. Oliveira H. et al. Functional analysis and antivirulence properties of a new depolymerase from a myovirus that infects *Acinetobacter baumannii* capsule K45 // *Journal of Virology*. – 2019. – T. 93. – №. 4. – C. e01163-18.
143. Lee Y. J. et al. Identification and biosynthesis of thymidine hypermodifications in the genomic DNA of widespread bacterial viruses // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – T. 115. – №. 14. – C. E3116-E3125.
144. Jin J. et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates // *BMC Microbiology*. 2012. Vol. 12, № 1. P. 156.
145. Jin J. et al. Genome organisation of the *Acinetobacter* lytic phage ZZ1 and comparison with other T4-like *Acinetobacter* phages // *BMC genomics*. – 2014. – T. 15. – №. 1. – C. 1-14.
146. Jansen M. et al. Enhanced antibacterial effect of the novel T4-like bacteriophage KARL-1 in combination with antibiotics against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* // *Scientific reports*. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 14140.
147. Essoh C. et al. Complete genome sequences of five *Acinetobacter baumannii* phages from Abidjan, Côte d’Ivoire // *Microbiology resource announcements*. – 2019. – T. 8. – №. 1. – C. e01358-18.
148. Wagemans J. et al. Structural Analysis of Jumbo Coliphage phAPEC6: 9 // *International Journal of Molecular Sciences*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2020. Vol. 21, № 9. P. 3119.
149. Kawato Y. et al. A novel jumbo *Tenacibaculum maritimum* lytic phage with head-fiber-like appendages // *Arch Virol*. 2020. Vol. 165, № 2. P. 303–311.
150. Buttner C. et al. Genome sequence of jumbo phage vB_AbaM_ME3 of *Acinetobacter baumannii* // *Genome Announcements*. – 2016. – T. 4. – №. 4. – C. e00431-16.
151. Bagińska N. et al. Biological Properties of 12 Newly Isolated *Acinetobacter baumannii*-Specific Bacteriophages: 1 // *Viruses*. 2023. Vol. 15, № 1. P. 231.

152. Turner D. et al. Characterisation and genome sequence of the lytic *Acinetobacter baumannii* bacteriophage vB_AbaS_Loki // *PLoS One*. – 2017. – T. 12. – №. 2. – C. e0172303.
153. Seul A. et al. Bacteriophage P22 tailspike: structure of the complete protein and function of the interdomain linker // *Acta Crystallographica Section D*. 2014. Vol. 70, № 5. P. 1336–1345.
154. Olszak T. et al. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence: 1 // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 7, № 1. P. 16302.
155. Squeglia F. et al. Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation // *Structure*. – 2020. – T. 28. – №. 6. – C. 613-624. e4.
156. Plattner M. et al. Structure and Function of the Branched Receptor-Binding Complex of Bacteriophage CBA120 // *Journal of Molecular Biology*. 2019. Vol. 431, № 19. P. 3718–3739.
157. Schooley R.T. et al. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection // *Antimicrob Agents Chemother*. 2017. Vol. 61, № 10. P. e00954-17.
158. Nir-Paz R. et al. Successful Treatment of Antibiotic-resistant, Poly-microbial Bone Infection With Bacteriophages and Antibiotics Combination // *Clinical Infectious Diseases*. 2019. Vol. 69, № 11. P. 2015–2018.
159. Chan B.K. et al. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa* // *Evol Med Public Health*. 2018. Vol. 2018, № 1. P. 60–66.
160. Chan B.K. et al. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*: 1 // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № 1. P. 26717.
161. Ho M.K.Y. et al. Bacteriophage endolysins against gram-positive bacteria, an overview on the clinical development and recent advances on the delivery and formulation strategies // *Crit Rev Microbiol*. 2022. Vol. 48, № 3. P. 303–326.

162. Majkowska-Skrobek G. et al. Capsule-Targeting Depolymerase, Derived from *Klebsiella* KP36 Phage, as a Tool for the Development of Anti-Virulent Strategy // *Viruses*. 2016. Vol. 8, № 12. P. 324.
163. Pan Y.-J. et al. Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment // *Antimicrob Agents Chemother*. 2015. Vol. 59, № 2. P. 1038–1047.
164. SNPTAb [Electronic resource]. URL: <https://snpt.antibiotic.ru/aba/#/> (accessed: 26.02.2023).
165. Zurawski D.V. et al. Genome sequences of four divergent multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients with sepsis or osteomyelitis // *J Bacteriol*. 2012. Vol. 194, № 6. P. 1619–1620.
166. Kenyon J.J. et al. Production of the K16 capsular polysaccharide by *Acinetobacter baumannii* ST25 isolate D4 involves a novel glycosyltransferase encoded in the KL16 gene cluster // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 128. P. 101–106.
167. Hamidian M., Hall R.M. The resistance gene complement of D4, a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, resides in two genomic islands and a plasmid // *J Antimicrob Chemother*. 2016. Vol. 71, № 6. P. 1730–1732.
168. Brenner S., Horne R.W. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses // *Biochim Biophys Acta*. 1959. Vol. 34. P. 103–110.
169. Bankevich A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // *J Comput Biol*. 2012. Vol. 19, № 5. P. 455–477.
170. Hyatt D. et al. Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification // *BMC Bioinformatics*. BioMed Central, 2010. Vol. 11, № 1. P. 1–11.
171. Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions // *Nucleic Acids Res*. 2001. Vol. 29, № 12. P. 2607–2618.
172. Delcher A.L. et al. Improved microbial gene identification with GLIMMER. // *Nucleic Acids Res*. 1999. Vol. 27, № 23. P. 4636–4641.

173. Söding J., Biegert A., Lupas A.N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № Web Server issue. P. W244-248.
174. Schattner P., Brooks A.N., Lowe T.M. The tRNAscan-SE, snoscan and snoGPS web servers for the detection of tRNAs and snoRNAs // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33, № Web Server issue. P. W686–W689.
175. Laslett D., Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 1. P. 11–16.
176. Liu B. et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface // *Nucleic Acids Research.* 2019. Vol. 47, № D1. P. D687–D692.
177. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers // *Comput Appl Biosci.* 1994. Vol. 10, № 2. P. 189–191.
178. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies // *Bioinformatics.* 2014. Vol. 30, № 9. P. 1312–1313.
179. Stamatakis A. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models // *Bioinformatics.* 2006. Vol. 22, № 21. P. 2688–2690.
180. Le S. Q., Gascuel O. An improved general amino acid replacement matrix // *Molecular biology and evolution.* – 2008. – T. 25. – №. 7. – C. 1307-1320.
181. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // *Bioinformatics.* 2003. Vol. 19, № 12. P. 1572–1574.
182. Lee I. et al. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* Microbiology Society, 2016. Vol. 66, № 2. P. 1100–1103.
183. Moraru C., Varsani A., Kropinski A.M. VIRIDIC—A Novel Tool to Calculate the Intergenomic Similarities of Prokaryote-Infecting Viruses // *Viruses* 2020, Vol. 12, № 11. P. 1268.
184. Sullivan M.J., Petty N.K., Beatson S.A. Easyfig: A genome comparison visualizer // *Bioinformatics.* 2011. Vol. 27, № 7. P. 1009–1010.

185. Kelley L.A. et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis // Nature Protocols. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 10, № 6. P. 845–858.
186. Taylor N.M.I. et al. Structure of the T4 baseplate and its function in triggering sheath contraction // Nature. 2016. Vol. 533, № 7603. P. 346–352.
187. Bacterial lipopolysaccharides : extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Academic, 1965. Vol. 5. P. 83–87.
188. Arbatsky N.P. et al. Structure of the neutral capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* NIPH146 that carries the KL37 capsule gene cluster // Carbohydrate Research. 2015. Vol. 413. P. 12–15.
189. Farrugia D. N. et al. The complete genome and phenome of a community-acquired *Acinetobacter baumannii* // PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 3. – C. e58628.
190. Orlov M. A., Sorokin A. A. DNA sequence, physics, and promoter function: Analysis of high-throughput data On T7 promoter variants activity // Journal of Bioinformatics and Computational Biology. – 2020. – T. 18. – №. 02. – C. 2040001.
191. Vinogradov E. V. et al. Structural and serological characterisation of two O-specific polysaccharides of *Acinetobacter* // European journal of biochemistry. – 1996. – T. 239. – №. 3. – C. 602-610.
192. Haseley S. R., Wilkinson S. C. Structural Studies of the Putative O-Specific Polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* O2 containing 3, 6-dideoxy-3-N-(d-3-hydroxybutyryl) amino-d-galactose // European journal of biochemistry. – 1995. – T. 233. – №. 3. – C. 899-906.
193. Kenyon J.J., Hall R.M., De Castro C. Structural determination of the K14 capsular polysaccharide from an ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate, D46 // Carbohydrate Research. 2015. Vol. 417. P. 52–56.
194. Kenyon J.J. et al. Correlation of *Acinetobacter baumannii* K144 and K86 capsular polysaccharide structures with genes at the K locus reveals the involvement of a novel multifunctional rhamnosyltransferase for structural synthesis // International Journal of Biological Macromolecules. 2021. Vol. 193. P. 1294–1300.

195. Arbatsky N. P. et al. Structure of the K128 capsular polysaccharide produced by *Acinetobacter baumannii* KZ-1093 from Kazakhstan //Carbohydrate research. – 2019. – T. 485. – C. 107814.
196. Adriaenssens E. M. et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: 2018-2019 update from the ICTV Bacterial and Archaeal Viruses Subcommittee //Archives of virology. – 2020. – T. 165. – №. 5. – C. 1253-1260.
197. Prokhorov N. S. et al. Function of bacteriophage G7C esterase tailspike in host cell adsorption //Molecular microbiology. – 2017. – T. 105. – №. 3. – C. 385-398.